

**DNA-Doppelstrangbruchreparatur-Dysfunktion bei
Brustkrebs: Etablierung und Evaluierung eines
funktionellen Tests als Biomarker für ein erhöhtes
Risiko**

Dissertation

**zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)**

**vorgelegt dem Rat der
Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena**

von Diplom Trophologin Marlen Keimling

geboren am 28.11.1979

in Sömmerda

Tag der Promotion: 08.02.2010

Erstgutachter: Prof. Dr. Frank Grosse, Jena

Zweitgutachter: Prof. Dr. Lisa Wiesmüller, Ulm

Drittgutachter: Prof. Dr. Günter Speit, Ulm

1	EINLEITUNG.....	1
1.1	Brustkrebs.....	1
1.2	Genetische Risikofaktoren zur Brustkrebsentstehung.....	2
1.3	Weitere Risikofaktoren zur Brustkrebsentstehung.....	3
1.4	Mechanismen der DNA-Doppelstrangbruchreparatur (DSBR).....	4
1.4.1	Homologe Rekombination (HR).....	4
1.4.2	<i>Single-Strand-Annealing</i> (SSA).....	6
1.4.3	<i>Non-homologous End-joining</i> (NHEJ).....	8
1.5	DSBR-Dysfunktionen und Mechanismen der Brustkrebsentstehung	9
1.5.1	Hochrisikogene der Brustkrebsentstehung	11
1.5.1.1	<i>BRCA1 und BRCA2</i>	11
1.5.1.2	<i>TP53</i>	13
1.5.1.3	<i>PTEN</i>	14
1.5.2	Moderate Risikogene der Brustkrebsentstehung	14
1.5.2.1	<i>ATM</i>	14
1.5.2.2	<i>CHEK2</i>	15
1.5.2.3	<i>NBN</i>	16
1.5.2.4	<i>RAD50</i>	17
1.5.2.5	<i>FANCI</i>	17
1.5.2.6	<i>FANCN</i>	18
1.6	Das auf <i>EGFP</i>-Rekonstitution basierende DSBR-Testsystem	18
1.7	Problemstellung.....	21
2	MATERIAL	24
2.1	Geräte.....	24
2.2	Chemikalien und Biochemikalien.....	26
2.3	Sonstige Materialien	29
2.4	Puffer und Lösungen	30
2.5	Nährmedien	32
2.6	Enzyme.....	34
2.7	Software	34
2.8	Antikörper	34
2.8.1	Primärantikörper.....	34
2.8.2	Sekundärantikörper.....	35

2.9 Nukleinsäuren.....	36
2.10 Biologisches Material.....	36
2.10.1 Bakterienstämme	36
2.10.2 Humane Zelllinien	37
3 METHODEN	39
3.1 Molekularbiologische und mikrobiologische Methoden	39
3.1.1 Herstellung kompetenter Bakterien	39
3.1.2 Transformation kompetenter Bakterien	39
3.1.3 Einfrieren von Bakterien.....	39
3.1.4 Isolierung der Plasmid-DNA aus Bakterien	39
3.1.5 Isolierung genomischer DNA aus eukaryotischen Zellen	39
3.1.6 Fällung genomischer DNA mit Ethanol	40
3.1.7 Konzentrations- und Reinheitsbestimmung der DNA.....	40
3.1.8 Spaltung der Plasmid-DNA mit Restriktionsendonukleasen.....	40
3.1.9 DNA-Agarosegel-Elektrophorese.....	41
3.2 Zellkulturtechniken	41
3.2.1 Kultivierung der Zelllinien	41
3.2.2 Einfrieren und Auftauen von Zelllinien.....	41
3.2.3 Isolierung und Kultivierung der Lymphozyten aus Vollblut.....	42
3.2.4 Kultivierung der primären Zellen aus Brusttumorgewebe	43
3.2.4.1 <i>Isolierung der primären Zellen aus Brusttumorgewebe</i>	<i>43</i>
3.2.4.2 <i>Trypsinierung reiner Fibroblasten und EMT-Zellkulturen.....</i>	<i>43</i>
3.2.4.3 <i>Trypsinierung reiner Epithelzellkulturen.....</i>	<i>43</i>
3.2.4.4 <i>Differentielle Trypsinierung.....</i>	<i>44</i>
3.2.4.5 <i>Trennung von Zellgemischen durch Positivselektion.....</i>	<i>44</i>
3.2.5 Zellzahl- und Vitalitätsbestimmung der Zellen	45
3.2.6 Transfektion von humanen Zellen	45
3.2.6.1 <i>Transfektion der Suspensionszellen durch Elektroporation</i>	<i>45</i>
3.2.6.2 <i>Transfektion der adhärennten Brustkrebszellen durch</i> <i>Nukleofektion.....</i>	<i>46</i>
3.2.6.3 <i>Transfektion der primären Epithelzellen, EMT-Zellen und</i> <i>Fibroblasten aus Brusttumorgewebe durch Nukleofektion</i>	<i>46</i>
3.2.6.4 <i>Transfektion der primären Lymphozyten aus dem Blut durch</i> <i>Nukleofektion.....</i>	<i>47</i>

3.2.7	Durchflusszytometrie.....	47
3.2.7.1	<i>DSBR-Messung (EGFP) am Durchflusszytometer</i>	47
3.2.7.2	<i>Einparametrische Zellzyklusanalyse (DNA-Gehalt-Bestimmung nach Propidiumiodid-Färbung)</i>	49
3.2.8	Immunfluoreszenzanalyse (γ -H2AX-Färbung)	50
3.2.9	Immunhistochemie (IHC)-Analyse	51
3.3	Proteinanalytische Methoden.....	54
3.3.1	Herstellung von Zelllysaten.....	54
3.3.2	Bestimmung der Proteinkonzentration (nach Bradford).....	55
3.3.3	Probenvorbereitung für die SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE).....	55
3.3.4	SDS-PAGE	55
3.3.5	Transfer von Proteinen auf Membranen (Western-Blot).....	56
3.3.6	Immundetektion der Proteine auf dem Western-Blot mit Chemilumineszenz-reaktion (ECL)	56
4	ERGEBNISSE.....	58
4.1	Charakterisierung von DNA-Doppelstrangbruch-Reparatur (DSBR)-Defekten zur Identifizierung von erhöhtem Brustkrebsrisiko bei Frauen.....	58
4.1.1	Detektion eines DSBR-Defektmusters in lymphoblastoiden Zelllinien mit verschiedenen <i>BRCA1</i> -Mutationen.....	59
4.1.2	Detektion eines DSBR-Defektmusters in lymphoblastoiden Zelllinien mit verschiedenen <i>BRCA2/FANCD1</i> -Mutationen	62
4.1.3	Detektion eines DSBR-Defektmusters in lymphoblastoiden Zelllinien mit <i>NBN</i> - bzw. <i>RAD50</i> -Mutation.....	65
4.1.4	Detektion eines DSBR-Defektmusters in lymphoblastoiden Zelllinien mit verschiedenen <i>ATM</i> -Mutationen.....	68
4.1.5	Detektion eines DSBR-Defektmusters in lymphoblastoiden Zelllinien mit verschiedenen <i>CHEK2</i> -Mutationen	74
4.1.6	Western-Blot-Analyse zu den lymphoblastoiden Zelllinien.....	78
4.1.7	Nachweis eines DSBR-Defektmusters in adhärenen Zelllinien mit verschiedenen <i>TP53</i> -Mutationen	81
4.1.7.1	<i>DSBR-Aktivitäten in verschiedenen Brustepithelzelllinien mit differentiellen TP53-Status</i>	81

4.1.7.2	<i>Veränderung der DSBR-Aktivitäten nach p53-knockdown in Brustepithel-zelllinien mit differentiellem TP53-Status</i>	87
4.2	Anwendung der etablierten DSBR-Defektmuster auf isolierte primäre Zellen aus Brusttumorgewebe und Lymphozyten aus dem Blut derselben Brustkrebspatientinnen	91
4.2.1	Etablierung der primären Zellkultur, Transfektion und Messung der DSBR-Frequenzen	91
4.2.1.1	<i>Kultivierung der primären Zellen aus Brusttumorgewebe</i>	<i>91</i>
4.2.1.2	<i>Bestimmung der Zellarten mit der IHC-Färbung</i>	<i>95</i>
4.2.1.3	<i>Bestimmung der geeigneten Transfektionsmethode für primäre Zellen aus Brusttumorgewebe</i>	<i>95</i>
4.2.1.4	<i>Messung der DSBR-Frequenzen primärer Zellen aus Brusttumorgewebe am Durchflusszytometer und Analyse der Ergebnisse</i>	<i>96</i>
4.2.1.5	<i>Bestimmung der γH2AX-Immunantwort nach Behandlung der primären Zellen aus Brusttumorgewebe mit Bleomycin</i>	<i>97</i>
4.2.1.6	<i>DNA-Schadenswirkung von Bleomycin auf die Kontrollzelllinie MCF7.....</i>	<i>97</i>
4.2.1.7	<i>DNA-Schadenswirkung von Bleomycin auf die Kontrollzelllinie MCF12a.....</i>	<i>99</i>
4.2.2	Ergebnisse der DSBR-Messungen mit primären Zellen aus Brusttumorgewebe und Lymphozyten aus dem Blut derselben Brustkrebspatientinnen	99
4.2.2.1	<i>Detektion des putativ hereditären BRCA1-DSBR-Defektmusters in den primären Zellen des Tumormaterials B1926/08 und Lymphozyten aus derselben Brustkrebspatientin</i>	<i>101</i>
4.2.2.2	<i>Detektion des putativ hereditären BRCA2-DSBR-Defektmusters in den primären Zellen des Tumormaterials B1905/08 und Lymphozyten aus derselben Brustkrebspatientin</i>	<i>104</i>
4.2.2.3	<i>Detektion des putativ hereditären NBN/RAD50-DSBR-Defektmusters in den primären Zellen des Tumormaterials B4841/08 und Lymphozyten aus derselben Brustkrebspatientin.....</i>	<i>107</i>

4.2.2.4	<i>Detektion des putativ nicht hereditären BRCA1-DSBR-Defektmusters in den primären Zellen des Tumormaterials G1676/06 und Lymphozyten aus derselben Brustkrebspatientin</i>	110
4.2.2.5	<i>Detektion des putativ nicht hereditären TP53-DSBR-Defektmusters in den primären Zellen des Tumormaterials B12666/07 und Lymphozyten derselben Brustkrebspatientin</i>	112
4.2.3	DSBR-Defektmuster vergleichend für die verschiedenen Zellarten	115
4.2.4	Vergleichende Analyse zwischen den DSBR-Frequenzen und der DNA-Reparaturkapazität der primären Epithel- und EMT-Zellen nach Bleomycinschadwirkung	117
4.3	Anwendung des <i>EGFP</i>-basierten DSBR-Testsystems auf primäre Lymphozyten aus dem Blut von Brustkrebspatientinnen, Mitgliedern aus Hochrisikofamilien und Kontrollprobandinnen	124
4.3.1	Etablierung der primären Lymphozytenkultur, Transfektion und Messung der DSBR-Frequenzen	124
4.3.1.1	<i>Auswahl der optimalen Bedingungen für die Kultivierung der primären Lymphozyten</i>	124
4.3.1.2	<i>Identifizierung der geeigneten Transfektionsmethode</i>	125
4.3.1.3	<i>Messung der DSBR-Frequenzen am Durchflusszytometer und Auswertung der Ergebnisse</i>	126
4.3.2	Nachweis von DSBR-Defekten in primären Lymphozyten zur Identifizierung von erhöhtem Brustkrebsrisiko	127
4.3.2.1	<i>Zunahme von Mikrohomologie-gerichtetem NHEJ bei Brustkrebspatientinnen und Mitgliedern aus Hochrisikofamilien ...</i>	128
4.3.2.2	<i>Zunahme der mutagenen DSBR-Aktivitäten bei benigner Läsion, Brustkrebs und Mitgliedern aus Hochrisikofamilien</i>	129
4.3.2.3	<i>Altersabhängigkeit der DSBR-Aktivitäten</i>	130
4.3.2.4	<i>Einfluss der Menopause auf die DSBR-Aktivitäten</i>	132
4.3.2.5	<i>Einfluss von Kinderlosigkeit auf die DSBR-Aktivitäten</i>	134
4.3.2.6	<i>Einfluss von ionisierender Strahlenexposition auf die NHEJ-Aktivität von Kontrollprobandinnen und Brustkrebspatientinnen ...</i>	134
4.3.2.7	<i>Einfluss des Differenzierungsgrades der Brusttumorzellen auf die DSBR in primären Lymphozyten</i>	135

4.3.2.8 Einfluss des Rezeptorstatus im Tumor auf die DSBR-Aktivität der primären Lymphozyten	136
5 DISKUSSION	139
5.1 Der BRCA1-DSBR-Defekttyp	139
5.2 Der BRCA2-DSBR-Defekttyp	142
5.3 Der NBN/RAD50-DSBR-Defekttyp	143
5.4 Der TP53-DSBR-Defekttyp	145
5.5 Klassifizierung von CHEK2- und ATM-Mutationen gemäß der etablierten DSBR-Defektmuster	148
5.6 Anwendung der etablierten DSBR-Defektmuster auf primäre Zellen aus Brusttumorgewebe und Lymphozyten aus denselben Brustkrebspatientinnen	160
5.7 Anwendung des EGFP-basierten DSBR-Testsystems als diagnostischer Marker zur Brustkrebsrisikobewertung	169
6 ZUSAMMENFASSUNG	176
7 SUMMARY	179
8 LITERATURVERZEICHNIS	181
9 ANHANG	200
9.1 Abkürzungsverzeichnis	200
9.2 Abbildungsverzeichnis.....	205
9.3 Tabellenverzeichnis.....	207
9.4 Zusätzliche Tabellen und Abbildungen	209
9.5 Danksagung	218
9.6 Lebenslauf.....	219

1 EINLEITUNG

1.1 Brustkrebs

Das Mammakarzinom stellt weltweit die häufigste Krebserkrankung dar. Nach Angaben der *International Association on Research of Cancer* erkranken weltweit jährlich etwa 1,2 Millionen Frauen an Brustkrebs (Parkin *et al.*, 2005). Nach Schätzungen des Robert Koch-Institutes und der Gesellschaft des epidemiologischen Krebsregisters in Deutschland erkrankten im Jahr 2004 etwa 57.000 Frauen in Deutschland neu an Brustkrebs und ca. 18.000 Frauen starben daran (Batzler *et al.*, 2008). Das Mammakarzinom ist damit in Deutschland die häufigste Krebserkrankung sowie -todesursache bei Frauen (Batzler *et al.*, 2008). Seit 1970 haben sich die Erkrankungszahlen für Brustkrebs bei Frauen in Deutschland verdoppelt (Giersiepen K., 2005). Dies entspricht einem jährlichen Anstieg der Brustkrebsinzidenz von 2,5 %. Des Weiteren offenbart die Inzidenz eine deutliche Abhängigkeit vom Alter. Das gegenwärtige mittlere Brustkrebserkrankungsalter einer Frau liegt bei 63 Jahren (Batzler *et al.*, 2008). Nichtsdestoweniger treten jedoch ca. 40 % der Brustkrebserkrankungen vor dem 60. Lebensjahr auf (Abb. 1). Das derzeitige Risiko einer Frau, bis zum 75. Lebensjahr an Brustkrebs zu erkranken, beträgt 9-10 %. Dies deutet darauf hin, dass etwa jede 10.-11. Frau im Laufe ihres Lebens an Brustkrebs erkranken und jede 40.-50. am Mammakarzinom sterben wird (Giersiepen K., 2005). Im Unterschied dazu erkranken Männer seltener an Brustkrebs. Hierzu werden jährlich ca. 400 Neuerkrankungen in Deutschland registriert. Dies entspricht einem Verhältnis von Brustkrebserkrankungen bei Männern zu Frauen von ca. 1:100 (Backe, 2002).

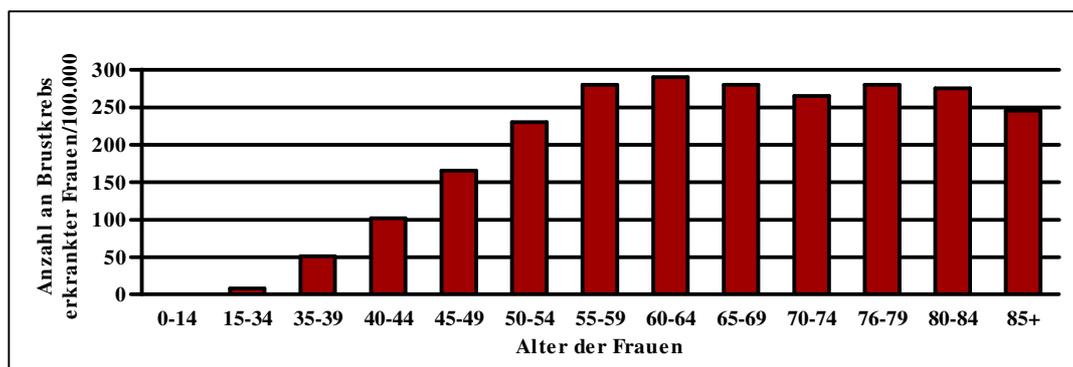


Abb. 1 Inzidenz des Mammakarzinoms in Abhängigkeit vom Alter (Batzler *et al.*, 2008)

Schätzung der altersspezifischen Inzidenz in Deutschland 2004, Neuerkrankung in Altersgruppen je 100.000 Frauen

Die gesunde Brust einer Frau besteht zum Großteil aus Fett und dem darin eingebetteten Drüsengewebe, wobei letzteres aus den milchausscheidenden Drüsenläppchen (Lobula) sowie den Milchgängen (Ductuli) aufgebaut ist (Beckmann, 2005). Tritt der Tumor in den

Milchgängen auf, wird dieser als Duktales Karzinom *in situ* (DCIS) bezeichnet. In diesem Frühstadium haben die entarteten Zellen die Basalmembran des Milchganges noch nicht durchbrochen (Koubenec, 2003). Als invasive duktales Karzinome (IDC) werden Tumore bezeichnet, die sich in den Milchgängen gebildet haben und in das umliegende Gewebe eingedrungen sind. Diese Form stellt mit ca. 70-80 % die am häufigsten auftretende Variante des Mammakarzinoms dar. Das sich in den Drüsenläppchen oder intralobulären Milchgängen entwickelnde, nicht-invasive lobuläre Karzinom *in situ* (LCIS) ist seltener vertreten. In ca. 20-30 % der Fälle kann es sich zu einem invasiv lobulären Karzinom (ILC) transformieren. Der Anteil der ILCe entspricht ca. 10-20 % aller Mammakarzinome. Mit 1-4 % ist das inflammatorische Mammakarzinom die seltenste Brustkrebserkrankung. Unabhängig vom Ursprung des Tumors verbreitet sich dieser sehr schnell über die Lymphbahnen und imitiert Entzündungsreaktionen, wie zum Beispiel Brustschwellungen (Koubenec, 2003).

1.2 Genetische Risikofaktoren zur Brustkrebsentstehung

Die Ursachen für die Entstehung der unter Abschnitt 1.1 eingeführten Brustkrebserkrankungen sind sehr komplex und können in genetische, hormonelle und den Lebensstil betreffende Risikofaktoren eingeteilt werden (Balmain *et al.*, 2003; Bradbury and Olopade, 2007; Brody *et al.*, 2007; Michels *et al.*, 2007), wobei 10-25 % aller Brustkrebserkrankungen erblich bedingt sind (Antoniou and Easton, 2006; Balmain *et al.*, 2003; Hopper, 2001). Für die Entstehung dieser hereditären Erkrankungen spielen vor allem Keimbahnmutationen in den Brustkrebssuszeptibilitätsgenen *BRCA1* (*Breast cancer 1*, kodiert für Brca1) und *BRCA2* (*Breast cancer 2*, kodiert für Brca2) eine wichtige Rolle (Futreal *et al.*, 1994; Miki *et al.*, 1994; Tavtigian *et al.*, 1996). Die Wahrscheinlichkeit, im Laufe des Lebens an Brustkrebs zu erkranken, beträgt für Trägerinnen einer *BRCA1*-Mutation ca. 65 %, für *BRCA2*-Mutation ca. 45 % (Antoniou *et al.*, 2003). Selten auftretende Keimbahnmutationen in den Genen *TP53* (kodiert für p53) und *PTEN* (kodiert für *Phosphatase and tensin homolog*, PTEN) führen ebenso zu einer sehr hohen Wahrscheinlichkeit an Brustkrebs zu erkranken. Frauen mit Keimbahnmutationen in Genen mit hoher Penetranz, wie *BRCA1*, *BRCA2*, *TP53* und *PTEN* weisen ein bis zu zehnfach erhöhtes Risiko auf, Frauen mit Mutationen in den Genen *ATM* (kodiert für *Ataxia telangiectasia mutated kinase*, ATM), *CHEK2* (kodiert für *Checkpoint kinase 2*, Chk2), *FANCI* (kodiert für *Fanconi anemia complementation group J*, FanciJ), *NBN* (kodiert für Nibrin), *FANCN* (kodiert für *Fanconi anemia complementation group N*, FanciN) und *RAD50* (kodiert für Rad50) ein moderates, zweifach erhöhtes Risiko (Martin and Weber, 2000; Walsh and King, 2007). Die stetig wachsende Anzahl an neu

identifizierten Brustkrebs susceptibilitäts genen verdeutlicht, dass ein Großteil dieser Gene noch nicht identifiziert ist (Abb. 2). Dabei handelt es sich vorwiegend um Gene mit niedriger Penetranz (Easton *et al.*, 2007; Szpirer and Szpirer, 2007; Walsh and King, 2007). Mutationen in diesen Genen führen zu einer Erhöhung des Brustkrebsrisikos um 1,25 % bis 1,65 % (Hemminki *et al.*, 2009).

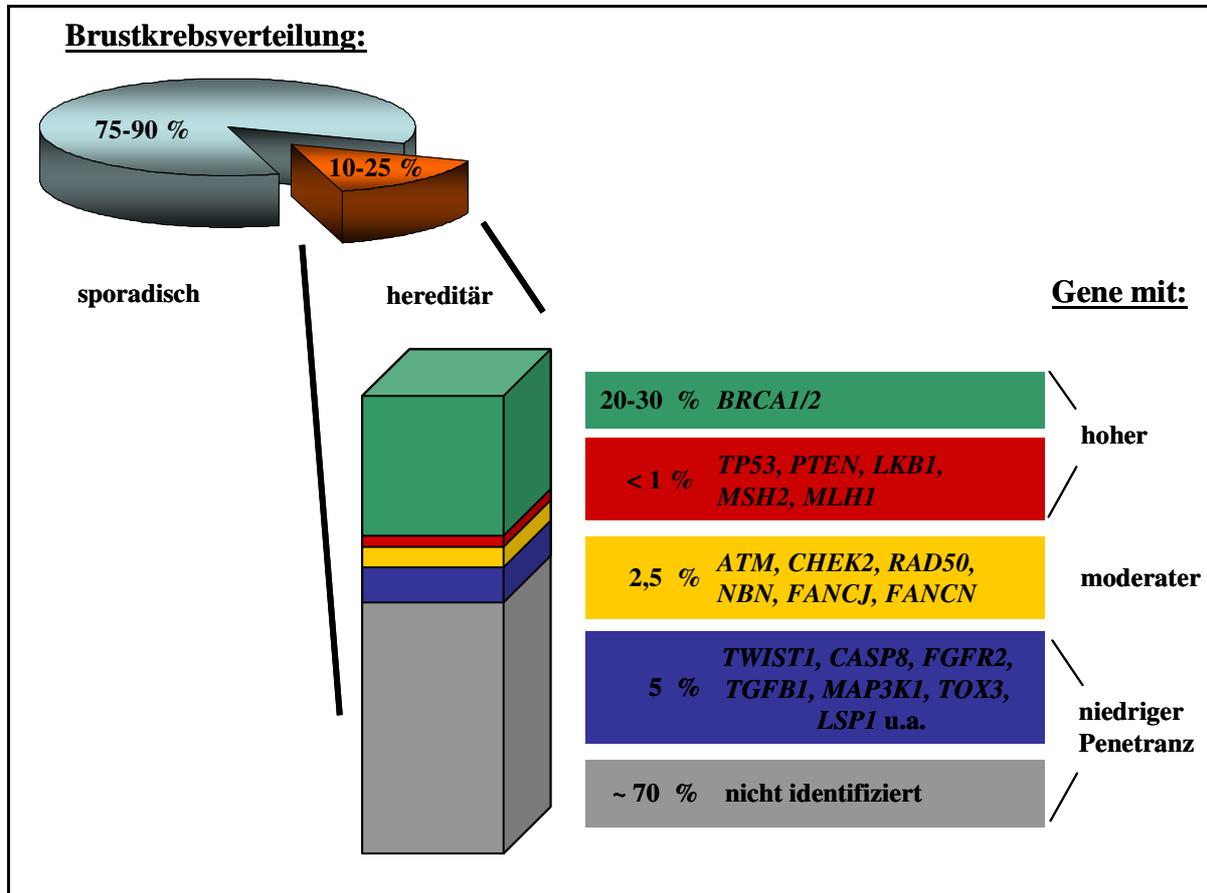


Abb. 2 Schematische Darstellung der Brustkrebsverteilung und Anteil der Brustkrebs-susceptibilitäts gene auf das genetisch bedingte Brustkrebsrisiko (Szpirer and Szpirer, 2007)

1.3 Weitere Risikofaktoren zur Brustkrebsentstehung

Neben den genetischen Risikofaktoren spielen das Alter und vor allem hormonell beeinflusste Faktoren eine wichtige Rolle bei der Brustkrebsentstehung. So führen frühe Menarche, späte Menopause, ein hoher *Body-Mass-Index*, Kinderlosigkeit, späte Geburt des ersten Kindes und langfristige Hormonersatztherapie zu einer Erhöhung des Brustkrebsrisikos (Brinton *et al.*, 1988; MacMahon *et al.*, 1970; Rossouw *et al.*, 2002; Tretli, 1989; Trichopoulos *et al.*, 1972; Ursin *et al.*, 2002). Weiterhin verursachen hoher Alkoholkonsum, starkes Zigarettenrauchen und Vitamin D-Mangel erhöhtes Brustkrebsrisiko (Brody *et al.*, 2007). Dabei können vor allem die karzinogenen Substanzen aus dem Zigarettenrauch, wie N-Nitrosamine, polyzyklische Kohlenwasserstoffe und aromatische Amine, zu DNA-(*Deoxyribonucleic*

acid)-Schädigungen beitragen, die, falls fehlerhaft repariert, zu genomischer Instabilität und Krebsentstehung führen (Terry and Rohan, 2002). Zur Aufrechterhaltung der genomischen Stabilität verfügen die Zellen daher über unterschiedliche DNA-Reparaturmechanismen (Christmann *et al.*, 2003).

1.4 Mechanismen der DNA-Doppelstrangbruchreparatur (DSBR)

Eukaryotische, somatische Zellen sind einer Vielzahl von exo- und endogenen DNA-schädigenden Agenzien ausgesetzt, die zu verschiedenen DNA-Läsionen führen (Friedberg *et al.*, 1995). DNA-Doppelstrangbrüche (DSBe) stellen dabei die toxischste Art der DNA-Schäden dar und können zum Beispiel durch ionisierende Strahlung, reaktive Sauerstoffspezies, Topoisomerase Inhibitoren oder den Kollaps der Replikationsmaschinerie beim Auftreffen auf Einzelstrangbrüche in der DNA-Matrize erzeugt werden. Können diese mutagenen DNA-Schäden nicht repariert werden, kann das zum induzierten Zelltod, genomischer Instabilität und Krebsentstehung führen (Bassing *et al.*, 2002; Haber, 2000; Norbury and Hickson, 2001). Für die Reparatur von DSBen stehen der Zelle zwei unterschiedliche, zum Teil Zellzyklus-abhängige Mechanismen zur Verfügung, das *Non-homologous End-joining* (NHEJ) sowie die Homologie-gerichtete Reparatur, die weiterführend in die konservative homologe Rekombination (HR) und die nicht-konservative homologe Rekombination (*Single-Strand-Annealing*, SSA) unterteilt wird (Haber, 2000; Helleday *et al.*, 2007; Kanaar *et al.*, 1998). Während NHEJ und SSA durch Informationsverlust weitgehend zu fehlerhafter Reparatur führen, gilt die HR als eine Möglichkeit für die fehlerfreie Reparatur, die jedoch Zellzyklus-abhängig nur in der späten S-/G2-Phase abläuft (Barnes, 2001; Helleday *et al.*, 2007; Pierce and Jasin, 2001; Shrivastav *et al.*, 2008; Thompson and Schild, 2001). Im Gegensatz dazu konnten Untersuchungen in Vertebraten zeigen, dass die Reparaturwege NHEJ und SSA unabhängig vom Zellzyklus ablaufen (Haber, 2000; Karagiannis and El-Osta, 2004; Lieber *et al.*, 2003; Morrison *et al.*, 2000). Da die Funktion der DSBR für das Verständnis dieser Arbeit von großer Bedeutung ist, werden die Reparaturwege HR, SSA und NHEJ im folgenden Abschnitt kurz beschrieben.

1.4.1 Homologe Rekombination (HR)

Die HR benötigt für die exakte Reparatur der DSBe die homologe Sequenz zum Beispiel auf dem Schwesterchromatid. Nach Entstehung eines DSBes wird ATM durch den MRN (Mre11-Rad50-Nibrin)-Komplex an den DSB rekrutiert. ATM bindet in der Nähe des DSBes an die DNA und phosphoryliert H2AX (Histon 2AX) spezifisch an Ser139. Brca1 wird rekrutiert und zusammen mit Nibrin ebenfalls durch ATM phosphoryliert. Dabei fungiert Brca1 als ein

Koordinator der Reparatur, während Nibrin als Bestandteil des MRN-Komplexes die Resektion der DNA-Enden unterstützt (Ralhan *et al.*, 2007). CtIP bindet an die BRCT (*Breast cancer carboxy-terminal*)-Domäne von Brca1 und wird ebenfalls an den DSB rekrutiert. CtIP interagiert mit dem MRN-Komplex und kontrolliert und unterstützt die Resektion der DNA-Enden (Huertas and Jackson, 2009; Sartori *et al.*, 2007; Yu and Chen, 2004). Die Prozessierung der DNA-Enden in 5'-3'-Richtung führt zur Bildung von 3'-ss-(Einzelstrang)-DNA-Überhängen, die von RPA (*Replication protein A*) umhüllt werden. Hierbei wird die Rekrutierung und Phosphorylierung von RPA ebenfalls von CtIP unterstützt (Huertas and Jackson, 2009). Im weiteren Schritt bindet Brca2 direkt in der Nähe des DSBs an die DNA und unterstützt die Rekrutierung von Rad51 an die 3'-ssDNA-Enden. Es ist bekannt, dass Brca2 und Rad51 physikalisch miteinander interagieren und Brca2 für die Lokalisation von Rad51 an den DSB verantwortlich ist (Pellegrini *et al.*, 2002). Aus biologischen *in vitro* Daten geht hervor, dass weitere Ko-Faktoren, wie die Rad51 Paraloge Rad51B, C, D, Xrcc2, Xrcc3 (*X-ray cross complementing 2, 3*) sowie Rad52 und Rad54, die Rad51-Aktivität und dessen Rolle in der HR unterstützen (Baumann *et al.*, 1996; Ralhan *et al.*, 2007; Stracker *et al.*, 2004; Valerie and Povirk, 2003). Rad51 bildet zusammen mit den 3'-ssDNA-Überhängen und der homologen ds-(Doppelstrang)-DNA Nukleoprotein-Filamente, katalysiert die Bindung an die homologe Sequenz des Schwesterchromatides und den Austausch der DNA-Stränge. Durch die Hydrolyse von ATP (Adenosintriphosphat) ist Rad51 in der Lage, stabile Verbindungsstrukturen zwischen den DNA-Molekülen zu generieren (Shim *et al.*, 2004). Dabei entsteht die Holliday-Struktur. Rad52 beschleunigt die Verdrängung des RPA von der DNA (Sugiyama and Kowalczykowski, 2002). Rad54, eine DNA-abhängige ATPase, unterstützt die Suche nach der geeigneten Homologie auf dem Schwesterchromatid und katalysiert das Eindringen des 3'-ssDNA-Überhangs in die homologe Matrize durch Entwindung und Öffnung der DNA (Valerie and Povirk, 2003). Xrcc2 erhöht die ATPase-Aktivität von Rad51 durch den Austausch des ADP (Adenosindiphosphat) durch ATP. Dadurch wird die ADP-abhängige Akkumulation von inaktiven Rad51-Aggregaten verhindert (Shim *et al.*, 2004). Rad51D dient als Adapterprotein zur Lokalisation von Xrcc2 an Rad51, während das Heterodimer Rad51C-Xrcc3 nach dem Austausch der homologen Sequenz die Auflösung der Holliday-Struktur beschleunigt (Thacker, 2005; Valerie and Povirk, 2003). Die Bindung von p53 an Rad51 dient der Genauigkeitskontrolle, wobei nach fehlerhafter Rekombination die Holliday-Struktur aufgelöst wird und die HR erneut abläuft (Gatz and Wiesmüller, 2006). Nach der Paarung der homologen Sequenzen und der Invasion des 3'-ssDNA-Überhangs in die homologe Matrize wird die Holliday-Struktur aufgelöst (Abb. 3).

Dies führt zu *Non-Crossing-Over* bzw. *Crossing-Over*-Ereignissen (Johnson and Jasin, 2000). Abschließend werden die DNA-Lücken aufgefüllt und die DNA-Stränge versiegelt.

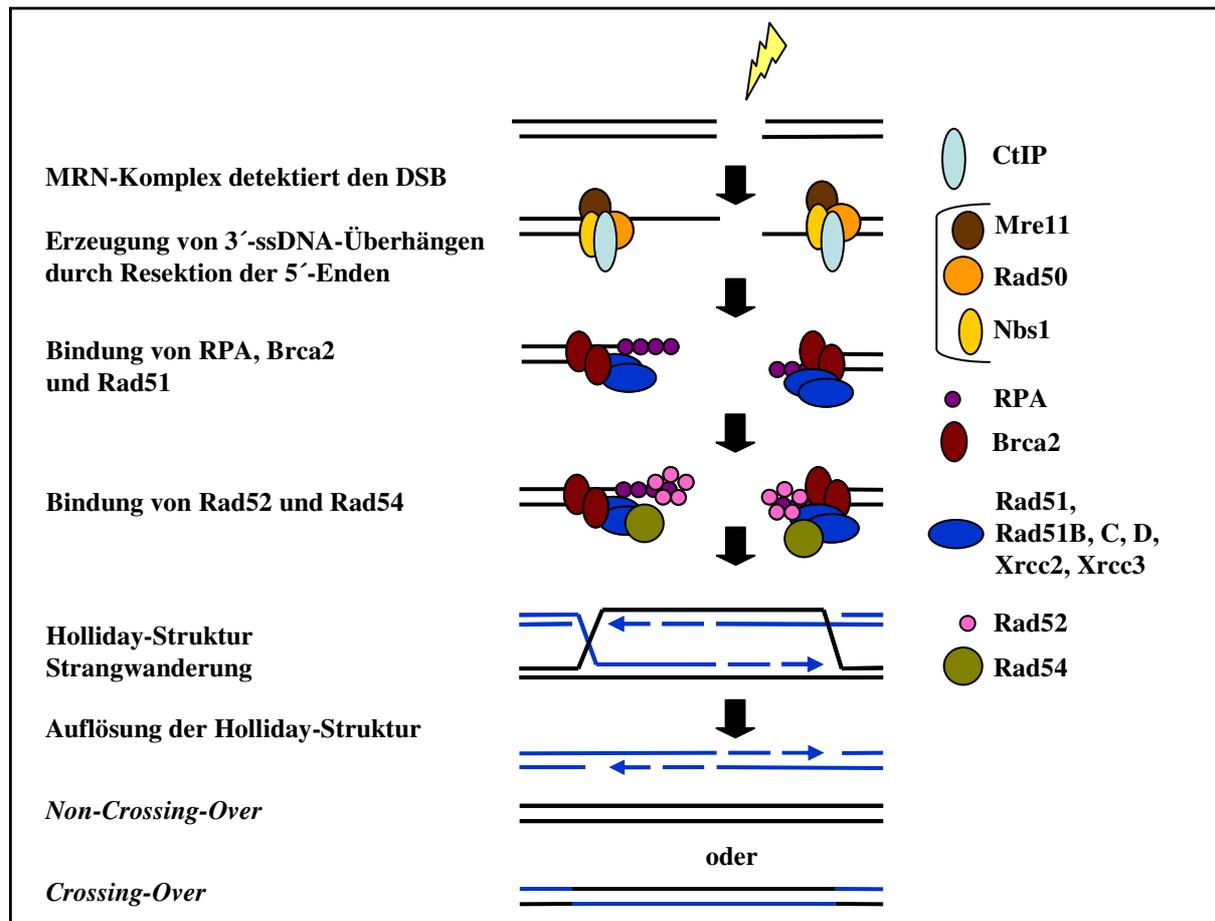


Abb. 3 Schematischer Ablauf der HR

Die beteiligten Proteine und deren Funktion sind angegeben nach Valerie und Povirk, 2003. Die DNA-Moleküle sind durch schwarze und blaue Doppellinien dargestellt. CtIP und der MRN-Komplex führen über Resektion der 5'-DNA-Enden zu 3'-ssDNA-Überhängen. Brca2 ermöglicht die Bindung von Rad51 an RPA-gebundene DNA-Überhänge. Rad51 und seine Paraloge bilden mit den 3'-ssDNA-Überhängen die Nukleoprotein-Filamente, katalysieren die Bindung an die homologe Sequenz und den Austausch der DNA-Stränge. Dies führt zur Bildung von Holliday-Strukturen und zur anschließenden Strangwanderung über eine ausreichende Homologielänge. Nach Auflösung der Holliday-Strukturen, die zu *Non-Crossing-Over* oder *Crossing-Over*-Ereignisse führen können, erfolgt die Auffüllung und Ligation der DNA durch Polymerasen und Ligasen.

1.4.2 *Single-Strand-Annealing* (SSA)

Das SSA benötigt für die Reparatur der DSBs eine homologe Matrize in Form einer Wiederholungssequenz. Diese Rad51-unabhängige Homologie-gerichtete DSBR benötigt eine Homologielänge von mindestens 60-90 Basenpaaren (Van Dyck *et al.*, 2001). Nach der Detektion des DSBs erfolgt die Resektion der DNA-Enden in 5'-3'-Richtung durch den MRN-Komplex im selben oder in unterschiedlichen Chromosomen (Jasin, 2002). Hierbei interagiert CtIP mit dem MRN-Komplex und kontrolliert und unterstützt die Resektion der DNA-Enden (Huertas and Jackson, 2009; Sartori *et al.*, 2007; Yu and Chen, 2004). Die dabei erzeugten 3'-ssDNA-Überhänge dienen der Suche nach kurzen homologen Sequenzen und

werden durch die Bindung des RPA an die DNA-Enden umhüllt, wobei die Rekrutierung und Phosphorylierung von RPA CtIP-abhängig ist (Huertas and Jackson, 2009). An dieser Stelle könnten bei vorhandenem Schwesterchromatid die ssDNA-Überhänge diese als Matrize verwenden und die HR als Reparaturweg einleiten. Beim SSA erfolgt jedoch die Hybridisierung homologer Einzelstränge im selben oder in unterschiedlichen Chromosomen. Anschließend wird die Prozessierung nicht komplementärer Sequenzen eingeleitet, DNA-Lücken aufgefüllt und DNA-Enden ligiert (Abb. 4). Aufgrund der Resektion repetitiver und möglicher intermediärer Sequenzen führt SSA zu Informationsverlust. Durch Bindung von Rad52 an die DSBe werden nukleolytische Abbauprozesse gehemmt und Wechselwirkungen zwischen den beiden Einzelsträngen erleichtert. Dabei bildet Rad52 heptamerische Ringstrukturen an den 3'-ssDNA-Überhängen und hält die zwei DNA-Moleküle zusammen, bevor diese durch die strukturspezifische Endonuklease Ercc1-XPF (*Excision repair cross complementing group 1- Xeroderma pigmentosum complementation group F*) an der Grenze zwischen homologen Sequenzen und heterogenen Überlappungen entfernt werden (Valerie and Povirk, 2003).

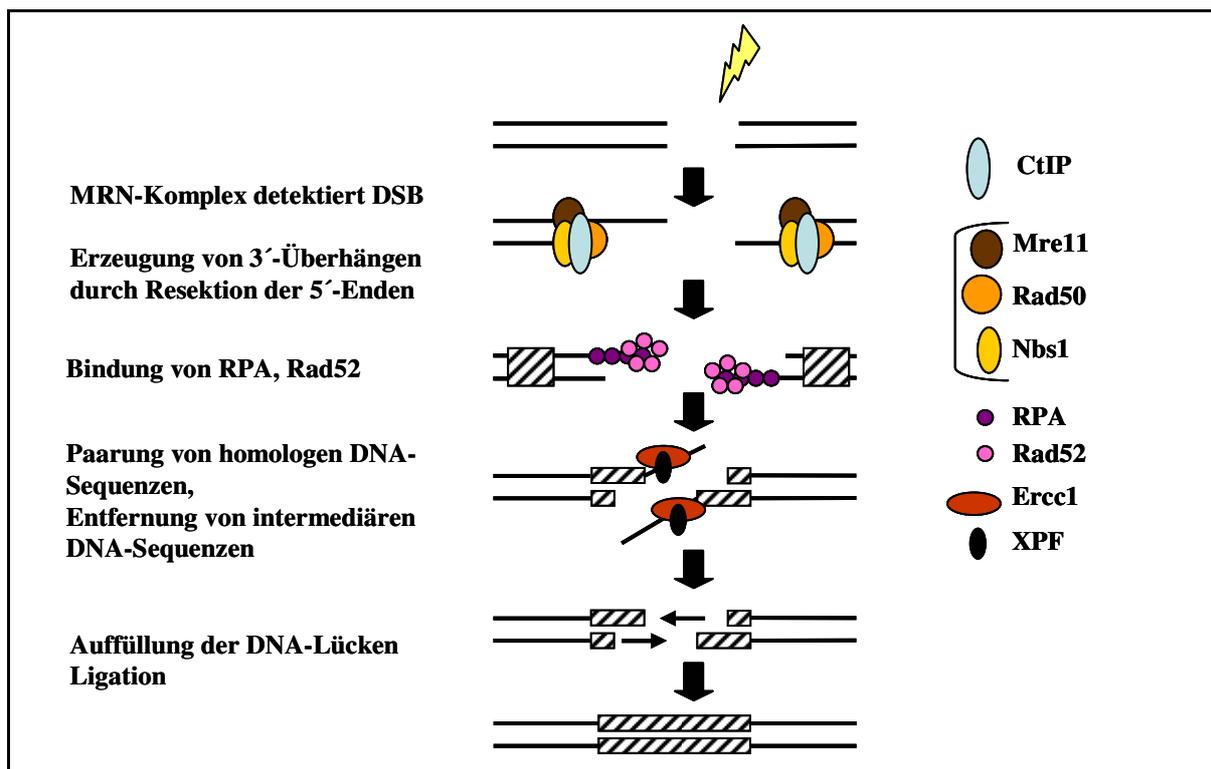


Abb. 4 Schematischer Ablauf von SSA

Die beteiligten Proteine und deren Funktion sind angegeben nach Valerie und Povirk, 2003. Die DNA-Moleküle sind durch schwarze Doppellinien dargestellt. CtIP und der MRN-Komplex führen über Resektion der 5'-DNA-Enden zu 3'-ssDNA-Überhängen. RPA und Rad52 erleichtern die Paarung der DNA-Enden, während Ercc1/XPF die DNA-Überhänge entfernt. Auftretende Lücken werden durch DNA-Polymerasen aufgefüllt und die DNA-Enden über Ligasen versiegelt.

1.4.3 *Non-homologous End-joining* (NHEJ)

Das NHEJ zweier dsDNA-Enden benötigt prinzipiell keine Homologien und kann sowohl fehlerhaft als auch fehlerfrei verlaufen. Häufig werden jedoch den DSB flankierende Mikrohomologien von 2-6 Basenpaaren verwendet (Bennardo *et al.*, 2008; Haber, 2000; Johnson and Jasin, 2001; Kanaar *et al.*, 1998). Durch das Verbinden der DNA-Enden können durch Degradation, Insertion oder Inversion beim Mikrohomologie-gerichteten NHEJ Sequenzveränderungen auftreten (Rass *et al.*, 2009).

Beim klassischen NHEJ-Weg erfolgt nach der Detektion des DSBes die Lokalisation des Ku-Heterodimers, bestehend aus Ku70 und Ku80, an die freien Enden des DSBes (Abb. 5). Ku70/Ku80 kann mit der Nuklease Artemis-DNA-PKcs, den Polymerasen μ und λ sowie dem Ligasekomplex, bestehend aus XLF-Xrcc4-DNA-Ligase IV, interagieren. Artemis und DNA-PKcs (*dsDNA-protein-kinase catalytic-subunit*) liegen in der Zelle komplexiert vor und binden an den DNA-Ku70/Ku80-Komplex. Durch die Bindung der DNA-PKcs an die DNA erfolgt die Aktivierung ihrer Serin/Threonin-Kinase, die zur Autophosphorylierung von DNA-PKcs führt. Diese Aktivierung von DNA-PKcs ermöglicht die Phosphorylierung einer Vielzahl von anderen Faktoren. Die DNA-PKcs-abhängige Phosphorylierung von Artemis führt zum Beispiel zur Aktivierung der Endonukleasefunktion, die zur Entfernung sogenannter *hairpins* notwendig ist. Anschließend wird durch die Bindung von Polymerase μ und λ die Synthese der fehlenden Nukleotide katalysiert. Die Ligase IV kann dsDNA-Moleküle mit kompatiblen DNA-Überhängen oder glatten Enden ligieren, wobei die Lokalisation von Xrcc4 (*X-ray cross complementing 4*) und an die DNA-Enden zur Stabilisierung der Ligase IV dient. Dadurch wird auch die Effizienz der Ligase IV erhöht (Lieber *et al.*, 2003; Pastwa and Blasiak, 2003; van Gent and van der Burg, 2007).

Derzeit werden neben diesem klassischen NHEJ-Reparaturweg weitere NHEJ-Mechanismen diskutiert. Dabei spielt der MRN-Komplex, der für die Prozessierung der DNA-Enden benötigt wird, vorwiegend für das fehlerhafte, alternative, Mikrohomologie-gerichtete NHEJ eine Rolle (Bennardo *et al.*, 2008; Rass *et al.*, 2009), wobei für das klassische, überwiegend fehlerfreie NHEJ das Heterodimer Ku70/Ku80 und die DNA-PKcs die initialen Komponenten darstellen. Weiterhin wurde bereits gezeigt, dass Ligase III zusammen mit Xrcc1 (*X-ray cross complementing 1*) und Poly(ADP-Ribose) Polymerase (PARP1) in die DSBR involviert sind und einen weiteren alternativen NHEJ-Weg darstellen, der den klassischen NHEJ-Reparaturweg unterstützt (Nussenzweig and Nussenzweig, 2007).

Diesbezüglich werden im alternativen, Mikrohomologie-gerichteten NHEJ-Weg zur Prozessierung der DNA-Enden Komponenten aus anderen DNA-Reparaturwegen benötigt

(Bennardo *et al.*, 2008; Nussenzweig and Nussenzweig, 2007; Rass *et al.*, 2009; Sartori *et al.*, 2007).

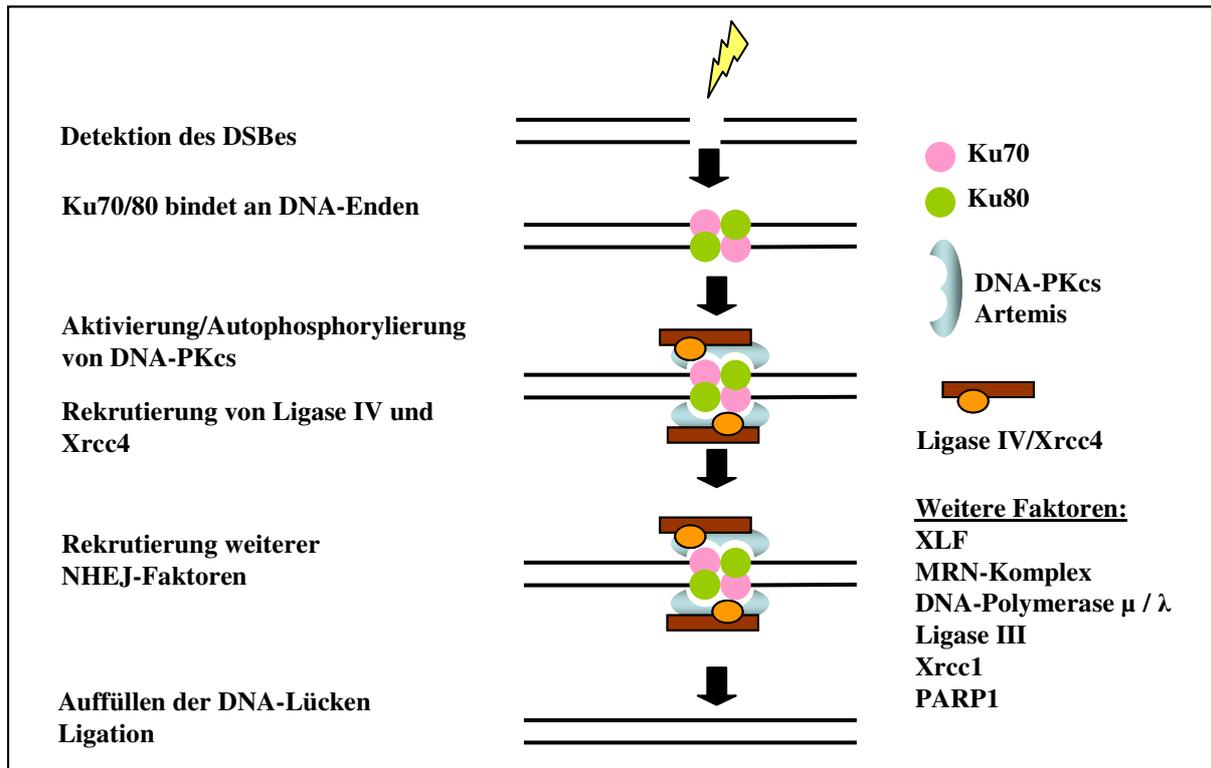


Abb. 5 Schematischer Ablauf von NHEJ

Die beteiligten Proteine und deren Funktion sind angegeben nach DC van Gent, 2007 und Nussenzweig und Nussenzweig, 2007. Die DNA-Moleküle sind durch schwarze Doppellinien dargestellt. Ku70/80 bindet an die DNA-Enden des DSBes und rekrutiert DNA-PKcs. Die Aktivierung der DNA-PKcs-Kinaseaktivität führt zur Autophosphorylierung von DNA-PKcs und zur Rekrutierung/Aktivierung weiterer NHEJ-Faktoren. Auftretende DNA-Lücken werden durch DNA-Polymerasen aufgefüllt und die DNA-Enden über Ligase IV versiegelt.

In einer Vielzahl von Studien wurde bestätigt, dass Fehlregulationen der soeben beschriebenen DSBR-Mechanismen zu genomischer Instabilität und Krebsentstehung führen können. Die Entwicklung von Brustkrebs hängt dabei eng mit Mutationen in Genen zusammen, die eine wichtige Rolle in der DSBR und bei Aufrechterhaltung der genomischen Stabilität spielen (Gatz and Wiesmüller, 2006; Golding *et al.*, 2004; Jasin, 2002; Ralhan *et al.*, 2007; Walsh and King, 2007).

1.5 DSBR-Dysfunktionen und Mechanismen der Brustkrebsentstehung

Eine Ursache der Brustkrebsentstehung ist die auf DSBR-Defekte zurückzuführende Chromosomeninstabilität (Stark *et al.*, 2004; Thompson and Schild, 2002). Mutationen in den Brustkrebs-suszeptibilitätsgenen *BRCA1*, *BRCA2*, *TP53* und *ATM* führen, u.a. durch die bevorzugte Nutzung von fehlerhaften mutagenen Reparaturmechanismen, wie dem Mikrohomologie-gerichteten NHEJ oder SSA, zu Defekten in der DSBR. Entsprechend dieser Erkenntnisse konnte mit dem Mikronukleus-Testsystem demonstriert werden, dass nach

Bestrahlung die Lymphozyten von *BRCA1*-Mutationsträgerinnen im Vergleich zur Kontrollpopulation erhöhte Mikronukleus-Frequenzen und damit chromosomale Schäden aufwies (Rothfuss *et al.*, 2000; Speit and Trenz, 2004). Dies deutet auf einen spezifischen Zusammenhang zwischen DSBR-Dysfunktionen und Brustkrebsentstehung hin (Ralhan *et al.*, 2007; Walsh and King, 2007). Zusätzlich konnte nachgewiesen werden, dass die Genprodukte der Tumorsuppressorgene *BRCA1*, *BRCA2* und *TP53* direkt und indirekt an den DSBR-Mechanismen beteiligt sind (Gatz and Wiesmüller, 2006; Jasin, 2002; Szpirer and Szpirer, 2007). Neben der genetischen Prädisposition spielen auch Umwelteinflüsse eine entscheidende Rolle in der Bewertung von Brustkrebsrisiken (Abb. 6). In diesem Hinblick könnte die Akkumulation kanzerogener Östrogenmetabolite, infolge der hormonellen Behandlung von Personen mit genetischer Prädisposition, das Risiko für die Brustkrebsentstehung erhöhen. Die Aufsummierung von Polymorphismen/Mutationen in Genen mit geringer Brustkrebs-Penetranz, die die Effizienz der DSBR mindern, könnte ebenfalls zu einer Akkumulation von DSBen führen. Werden die auftretenden DSBe nicht effizient und korrekt durch die HR sondern durch mutagene Reparaturmechanismen wie dem Mikrohomologie-gerichteten NHEJ und SSA repariert, kommt es zur Anhäufung von Mutationen. Treten dadurch Defekte in Genen auf, die das Zellwachstum, die DNA-Reparatur oder die Apoptose der Zellen regulieren, kann dies zur Brustkrebsentstehung führen. Diese multiplen Prozesse verdeutlichen, weshalb Frauen mit verminderter DSBR-Kapazität ein erhöhtes Brustkrebsrisiko aufweisen (Ralhan *et al.*, 2007). Folglich werden die bisher identifizierten Brustkrebs-prädisponierenden Gene mit Einfluss auf die DSBR kurz beschrieben.

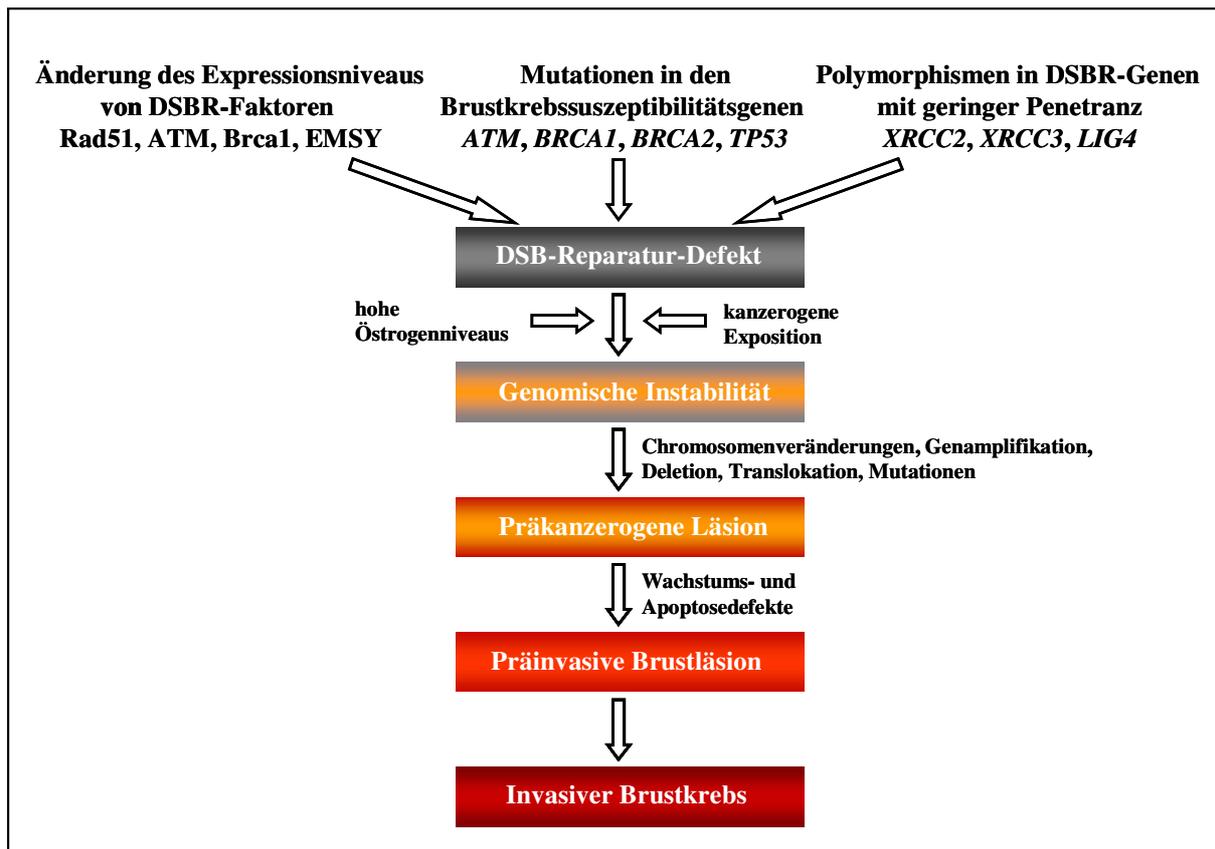


Abb. 6 Abfolge der Brustkrebsentstehung

In Verbindung mit äußeren Faktoren (wie die Exposition mit kanzerogenen Substanzen oder Hormontherapie) können Defekte in der DSBR-Kapazität oder -Qualität (durch Mutationen in Brustkrebs-suszeptibilitätsgenen, Polymorphismen oder Veränderungen der Expressionsniveaus von DSBR-Faktoren) Brustkrebsentstehung verursachen. (siehe Ralhan *et al.* 2007)

1.5.1 Hochrisikogene der Brustkrebsentstehung

1.5.1.1 *BRCA1* und *BRCA2*

Das *BRCA1*-Gen liegt auf dem langen Arm von Chromosom 17 auf der Bande 21.31 und kodiert ein Protein aus 1863 Aminosäuren bestehend aus einer N-terminal lokalisierten Ring-, einer DNA-Binde- und C-terminal lokalisierten BRCT-Domäne (Narod and Foulkes, 2004; Rosen *et al.*, 2003).

Das *BRCA2*-Gen, auch als *FANCD1*-Gen bezeichnet, ist auf dem langen Arm von Chromosom 13 auf der Bande 12.3 lokalisiert. Das Brca2-Protein besteht aus 3418 Aminosäuren und enthält acht Wiederholungssequenzen der BRC-Regionen sowie eine Transaktivierungs- und DNA-Bindedomäne (Narod and Foulkes, 2004).

Mutationen in den zwei bekanntesten Brustkrebs-suszeptibilitätsgenen *BRCA1* und *BRCA2* stehen in Verbindung mit der Entstehung von Brust- und Ovarialkarzinomen.

Ihre Genprodukte unterstützen die Homologie-gerichtete DSBR (Chen *et al.*, 1999), wobei ihr mutationsbedingter Ausfall zu genomischer Instabilität und damit letztendlich zur

Karzinogenese führen kann (Ralhan *et al.*, 2007). Brca1 interagiert über die N-terminale Ringdomäne und die C-terminale BRCT-Domäne mit einer Vielzahl von Proteinen, die in die Zellzykluskontrolle und DNA-Reparatur involviert sind (Rosen *et al.*, 2003). Ein Interaktionspartner von Brca1 ist zum Beispiel FancJ, eine DNA-abhängige ATPase und 5'-3'-DNA-Helikase, welche die DNA-Reparaturfunktion von Brca1, möglicherweise durch die rechtzeitige Entfernung von Rad51 in den Nukleoprotein-Filamenten, unterstützt (Cantor and Andreassen, 2006).

Nach Detektion eines DSBes wird H2AX unter anderem von ATM phosphoryliert. Diesbezüglich ist phosphoryliertes H2AX (γ H2AX) für die Akkumulation von MDC1 (*Mediator of DNA damage checkpoint protein 1*) und RNF8 (*Ring finger 8*) an DSBen verantwortlich, die wiederum für die Rekrutierung des Brca1-Rap80 (*Receptor-associated protein 80*)-Komplexes, 53BP1 (*p53 binding protein 1*) und anderer Checkpoint-Proteine notwendig sind (Huen *et al.*, 2007). Infolge dieser Rekrutierungskaskade liegt Brca1 mit einer Vielzahl von Faktoren wie dem MRN-Komplex, ATM, Bard1 (*BRCA1 associated RING domain 1*), BLM (*Bloom's syndrom protein*), Rad50, Rad51, H2AX, den mismatch Reparatur-Proteinen Msh2 (*MutS-Homolog 2*), Msh6 (*MutS-Homolog 6*), Mlh1 (*MutL-Homolog 1*) in dem Multiproteinkomplex BASC (*BRCA1-associated super complex*) in der Nähe der DSBen assoziiert vor. Mutationen in den Protein-bindenden Domänen von Brca1, welche die Proteininteraktionen inhibieren, haben Auswirkungen auf die Brusttumorentstehung. In Bezug dazu konnten bereits mehrere brustkrebsrelevante Mutationen in der Ring- und BRCT-Domäne identifiziert werden, die die Interaktion mit Bard1 bzw. FancJ betreffen (Couch and Weber, 1996; Mirkovic *et al.*, 2004). Weiterhin wurde demonstriert, dass die DNA-Schäden induzierte Rad51-Proteinkonzentrierung (Focibildung) in Zellen mit einem *BRCA1*-Defekt beeinträchtigt ist. Brca1 kann über eine zentrale Region von Aminosäure 452 bis 1079 strukturspezifisch an verzweigte, kreuzförmige DNA-Intermediate binden (Paull *et al.*, 2001), während die C-terminale BRCT-Domäne spezifisch an DSB-Enden bindet (Yamane *et al.*, 2000). Dies verdeutlicht, dass Brca1 als ein Hauptakteur sowohl direkt als auch indirekt die Mechanismen der DSBR und die Aufrechterhaltung der genomischen Stabilität steuert (Narod and Foulkes, 2004).

Parallel dazu interagiert Brca2 physikalisch über die zentrale BRC-Region (BRC3 und BRC4) mit Rad51 und stimuliert die konservative HR durch Rekrutierung von Rad51 an den DSB. Damit kontrolliert Brca2 den Rad51-abhängigen Aufbau der Nukleoprotein-Filamente und folgend die DNA-Strangpaarung und den DNA-Strangaustausch (Pellegrini *et al.*, 2002). Während Brca2 durch die Lokalisation von Rad51 an den DSB die HR einleitet (Ralhan *et al.*,

2007), ist p53 für die Genauigkeitskontrolle der HR verantwortlich (Gatz and Wiesmüller, 2006).

1.5.1.2 TP53

Das *TP53*-Gen liegt auf dem Chromosom 17 auf der Bande 13.1 und kodiert ein Protein mit 393 Aminosäuren bestehend aus der N-terminal lokalisierten transkriptionellen Transaktivierungs- sowie einer Prolin-reichen Domäne, einer spezifischen DNA-Bindedomäne, die in der Kernregion lokalisiert ist sowie der C-terminal lokalisierten Oligomerisations- und DNA-Bindedomäne (Lavin and Gueven, 2006).

Mutationen im Tumorsuppressorgen *TP53* sind die am häufigsten detektierten, genetischen Veränderungen bei Krebspatienten und konnten in über 50 % aller Tumore nachgewiesen werden, wobei der Großteil der Mutationen in der DNA-Bindedomäne lokalisiert ist. (Hamroun *et al.*, 2006; Olivier *et al.*, 2002). In 20-40 % aller Brustkarzinome wurden Veränderungen im *TP53*-Gen detektiert (Borresen-Dale, 2003). Weiterhin sind *Li-Fraumeni syndrom* (LFS)-Patientinnen durch eine Keimbahnmutation im *TP53*-Gen gekennzeichnet und entwickeln mit einer zehnfach erhöhten Wahrscheinlichkeit prämenopausalen Brustkrebs (Varley, 2003).

Der zellulär präzise regulierte Proteingehalt von p53 steigt nach DNA-Schädigung rapide an (Bode and Dong, 2004) und ist verantwortlich für die transkriptionelle Aktivierung einer Vielzahl von Faktoren, die in Zellzykluskontrolle, Apoptose-Induktion, Seneszenz und DNA-Reparatur involviert sind (Lavin and Gueven, 2006). Nach DNA-Schädigung kann p53 die betroffenen Zellen im G1/S- und G2/M-Arrest arretieren und so Zeit für DNA-Reparaturprozesse ermöglichen, bevor die Zellen in die S-Phase bzw. Mitose eintreten (Lane, 1992; Levine, 1997). Bei irreparablen DNA-Schäden induziert p53 jedoch den programmierten Zelltod. Unabhängig von der transkriptionellen Transaktivierungsfunktion kann p53 die DSBR durch Senkung der fehlerhaften HR- und NHEJ-Prozesse regulieren. Der C-Terminus von p53 erkennt DNA-Schäden wie DSBe, Lücken sowie Fehlpaarungen; die zentrale Region kann direkt an drei- und viersträngige Holliday-Strukturen binden. Zusätzlich kann p53 durch direkte physikalische Interaktion mit Rad51 die Rad51-abhängige ssDNA-Nukleoprotein-Filament-Bildung und den Strangaustausch inhibieren und so genetischer Instabilität vorbeugen. Neben Rad51 interagiert p53 mit weiteren DSBR-Proteinen wie Brca1, Brca2, BLM, WRN (*Werner's syndrome protein*), RPA, Rad54 und nach Phosphorylierung von Ser15 durch ATM auch mit dem MRN-Komplex. Die Aufgabe von p53 besteht demzufolge darin die Genauigkeit der HR zu überwachen, um nachteilige

Genomveränderungen wie Chromosomenaberrationen zu verhindern (Borresen-Dale, 2003; Gatz and Wiesmüller, 2006; Ralhan *et al.*, 2007; Sengupta and Harris, 2005).

Interessanterweise konnte auch gezeigt werden, dass p53 durch Stimulierung der Topoisomerase I (Topo I)-Aktivität die HR fördert. Hierbei wurde demonstriert, dass Topo I-DNA-Komplexe von einer zusätzlichen Topo I erkannt werden können um einen sogenannten DNA-Doppel-Spaltungskomplex zu bilden. Die Freisetzung von einem Spaltungskomplex zusammen mit dem Oligonukleotid, welches die DNA-Läsion einschließt, führt zu einer einzelsträngigen DNA-Lücke. Diese Lücke stellt eine mögliche Invasionsstelle für einen fremden komplementären DNA-Strang dar. p53 wiederum hat einen signifikanten stimulatorischen Effekt auf diese Doppel-Spaltungsreaktion und auf die resultierenden Rekombinations-vermittelten Reparaturereignisse (Soe and Grosse, 2003; Soe *et al.*, 2002; Stephan *et al.*, 2002).

1.5.1.3 *PTEN*

PTEN ist auf dem langen Arm von Chromosom 10 auf der Bande 23.3 lokalisiert und kodiert eine 403 Aminosäure lange Lipidphosphatase mit einer *Tensin-like*- sowie einer katalytischen Domäne (Planchon *et al.*, 2008).

Im Vergleich zu *BRCA1*, *BRCA2* und *TP53* werden Mutationen im *PTEN*-Gen selten bei Brustkrebspatienten (< 5 %) detektiert, führen aber zu einem zehnfach erhöhten Brustkrebsrisiko (Eng, 2003; Walsh and King, 2007). 25 % aller Brusttumore weisen jedoch ein signifikant vermindertes *PTEN*-Expressionsniveau auf (Saal *et al.*, 2005). Die Expression von mutiertem *PTEN* (R189X) in MEFs (*Mouse embryonic fibroblasts*) führte zu verschiedenen chromosomalen Veränderungen, die auf eine Fehlregulation der DSBRR hindeutete (Planchon *et al.*, 2008). Durch die Regulierung der Rad51-Proteinexpression kontrolliert das nukleär-lokalisierte *PTEN* die fehlerfreie HR und spielt so eine entscheidende Rolle bei der Aufrechterhaltung der genomischen Stabilität (Shen *et al.*, 2007).

Während die Hochrisikogene das Brustkrebsrisiko ca. zehnfach erhöhen, führen die folgenden Gene zu einem moderaten, zwei- bis vierfach erhöhten Brustkrebsrisiko (Walsh and King, 2007).

1.5.2 Moderate Risikogene der Brustkrebsentstehung

1.5.2.1 *ATM*

Das *ATM*-Gen liegt auf dem langen Arm von Chromosom 11 auf der Bande 22.3 und kodiert für ein Protein mit 3056 Aminosäuren. Das *ATM*-Protein besteht aus einer *leucine-zipper*-

FAT (*FRAP/ATM/TRRAP*)-, Kinase-Domäne sowie einer C-terminal lokalisierten FATC (FAT *carboxy-terminal*)-Domäne (Sandoval *et al.*, 1999). Während homozygote *ATM*-Mutationen zum *Ataxia telangiectasia syndrom* führen, konnte für heterozygote Mutationen im *ATM*-Gen ein zweifach erhöhtes Brustkrebsrisiko bei Frauen assoziiert werden. Derzeit sind über 300 verschiedene *ATM*-Mutationen bekannt, wobei über 80 % durch Basensubstitutionen, Insertionen oder Deletionen zu frühzeitigen Trunkierungen oder *Splicing*-Anomalien führen (Dork *et al.*, 2001; Swift *et al.*, 1987). Es wurde gezeigt, dass Lymphozyten mit heterozygoten *ATM*-Mutationen signifikant erhöhte Frequenzen an strahleninduzierten Chromosomenabberationen aufweisen. Dies deutet auf DSBR-Dysfunktionen hin (Sanford *et al.*, 1990). Die Rekrutierung und Aktivierung von ATM an den DSB erfolgt meist MRN-abhängig, wobei auch Veränderungen der Chromatinstruktur allein zur partiellen Lokalisation und Aktivierung von ATM führen können (Lavin, 2007; Mirzoeva and Petrini, 2001). Vermutlich durch Autophosphorylierung von ATM an derzeit drei bekannten Stellen (pSer367, pSer1892, pSer1981) erfolgt die Dissoziation der inaktiven ATM-Dimere in aktive Monomere und führt zu ATM-abhängigen Phosphorylierungen von mehr als 30 Faktoren. Über die Phosphorylierungen von p53, Chk2, Brca1, H2AX, SMC1 (*Structural maintenance of chromosomes protein 1*), FancD2 (*Fanconi anemia complementation group D2*), Artemis, Nibrin, 53BP1, MDC1, BLM, c-Abl (*c-Abelson tyrosin kinase*) werden Zellzyklusarreste in G1/S, intra-S und G2/M initiiert und DNA-Reparatur unterstützt (Lavin, 2007; Lee and Paull, 2007). ATM-abhängig erfolgt zum Beispiel die Phosphorylierung und Aktivierung von Chk2 nach der Detektion des DSBes und ermöglicht die Regulation der Reparaturprozesse in Richtung fehlerfreie Reparatur (Wang *et al.*, 2006).

1.5.2.2 *CHEK2*

Das *CHEK2*-Gen ist auf dem langen Arm von Chromosom 22 auf der Bande 11 lokalisiert und kodiert das Chk2-Protein mit 543 Aminosäuren. Das Chk2-Protein ist charakterisiert durch eine N-terminal lokalisierte Domäne mit vielen Serin- oder Threonin-Resten, einer FHA (*Fork-head associated*)- und Kinase-Domäne sowie einem nukleären Lokalisationssignal (Antoni *et al.*, 2007). Die Identifikation von drei verschiedenen *CHEK2*-Mutationen in *Li-Fraumeni syndrom* (LFS)-Patientinnen führte zu der Erkenntnis, dass *CHEK2* neben *TP53* ein alternatives Gen für die LFS-Veranlagung darstellt (Bell *et al.*, 1999). Eine Vielzahl von Studien zeigte, dass Mutationen im *CHEK2*-Gen das Brustkrebsrisiko für Frauen zweifach erhöhen (Bogdanova *et al.*, 2005; Meijers-Heijboer *et al.*, 2002; Sodha *et al.*, 2002; Vahteristo *et al.*, 2002; Varley and Haber, 2003). Dabei wirkt Chk2 als Verstärker der zellulären Antwort auf DSBs durch Phosphorylierung und

Aktivierung einer Vielzahl von Faktoren, die in DNA-Reparatur-Prozesse, Zellzyklusarrest, Seneszenz und Apoptose-Induktion involviert sind (Antoni *et al.*, 2007). Chk2 phosphoryliert zum Beispiel Brca1 und reguliert folglich die Brca1-abhängige Unterdrückung von fehlerhaftem NHEJ und unterstützt die fehlerfreie HR (Zhang *et al.*, 2004). Chk1 (*Checkpoint kinase 1*) und Chk2 phosphorylieren die C-terminale Domäne von Brca2 und regulieren darüber möglicherweise die Dissoziation von Rad51 und Brca2 nach DNA-Schädigung. Dies führt zur Lokalisation von Rad51 an einzelsträngige DNA und katalysiert den Strangaustausch zwischen homologen Sequenzen (Bahassi *et al.*, 2008).

1.5.2.3 NBN

Das *NBN*-Gen liegt auf dem langen Arm von Chromosom 8 auf der Bande 21 und kodiert das 754 Aminosäure lange Nibrin-Protein bestehend aus FHA-Domäne, BRCT-Domäne, Mre11- und ATM-Bindedomäne (Difilippantonio *et al.*, 2007). Mutationen im *NBN*-Gen führen zum *Nijmegen breakage syndrom* (NBS). NBS-Patienten weisen neben Immundefekten, Mikrozephalie und Wachstumsverzögerungen auch ein erhöhtes Krebsrisiko auf und zeigen ein mit AT (*Ataxia telangiectasia*)-Patienten überlappenden Phänotyp. Zellen von NBS- und AT-Patienten sind durch ein erhöhtes Niveau an Chromosomenschäden, Strahlensensitivität, genomischer Instabilität und Defekten in der Zellzykluskontrolle gekennzeichnet. Diese überlappende klinische Manifestation könnte durch Defekte in der funktionellen Wechselwirkung der Genprodukte im DSB-R-Weg erklärt werden (Demuth and Digweed, 2007; Gatei *et al.*, 2000). Nibrin, als regulatorische Komponente des trimeren MRN-Komplexes, ist verantwortlich für die Lokalisation von Mre11 und Rad50 im Nukleus und kann bereits 30 min nach ionisierender Bestrahlung von Zellen am DSB detektiert werden. Dabei weist Nibrin Phosphorylierungen an mehreren Stellen auf. Untersuchungen konnten beweisen, dass ATM nicht nur oberhalb der Signaltransduktionskaskade von Nibrin agiert, sondern umgekehrt, dass Nibrin auch für die Rekrutierung und Aktivierung von ATM notwendig ist. (Carson *et al.*, 2003; Difilippantonio *et al.*, 2005; Horejsi *et al.*, 2004). So wurde festgestellt, dass *NBN*-deletierte Zellen nach Behandlung mit ionisierender Strahlung eine starke Beeinträchtigung der ATM-Autophosphorylierung und der ATM-abhängigen Substratphosphorylierung aufweisen (Difilippantonio, *et al.*, 2005). In einem Modell nach Difilippantonio erfolgt kurz nach DSB-Induktion die Detektion des DSBes durch den MRN-Komplex. Durch vielfältige Interaktionen mit dem MRN-Komplex, inklusive des C-Terminus von Nibrin, wird ATM an den DSB rekrutiert und Nibrin-abhängig aktiviert. In der Folge kann ATM weitere DNA-Reparaturfaktoren phosphorylieren und aktivieren. Während der N-Terminus von Nibrin den Zellzyklusarrest und die DNA-Reparatur reguliert, scheint der C-

Terminus die Apoptoseprozesse durch ATM-abhängige Substrataktivierung zu beeinflussen (Difilippantonio and Nussenzweig, 2007). Unabhängig von der DSB-Detektion und ATM-Aktivierung spielt Nibrin eine wesentliche Rolle in der HR durch die Lokalisation von Mre11 an DSBs. Mutationen in der N-terminalen FHA/BRCT-Domäne und C-terminalen Mre11-Bindedomäne von Nibrin sind mit einer dramatischen Reduktion der HR assoziiert (Sakamoto *et al.*, 2007; Tauchi *et al.*, 2002). Weitere Untersuchungen konnten markante Beeinträchtigungen der DSBR-Mechanismen SSA und Mikrohomologie-gerichteten NHEJ in Nibrin-defizienten Zellen nachweisen (Howlett *et al.*, 2006). Mutationen, die den Komplexpartner Rad50 betreffen, sind ebenfalls mit einem moderat erhöhten Brustkrebsrisiko assoziiert.

1.5.2.4 RAD50

Das *RAD50*-Gen liegt auf dem langen Arm von Chromosom 13 auf der Bande 31 und kodiert für das Rad50-Protein bestehend aus 1312 Aminosäuren. Rad50, als Bestandteil des MRN-Komplexes, besteht strukturell aus zwei endseitig liegenden ATPase-Domänen, die von zwei langen, anti-parallel verlaufenden, spiralenförmigen Regionen unterbrochen sind. Angrenzend dazu befinden sich die Mre11-Bindestellen (Assenmacher and Hopfner, 2004).

Durch Bindung eines Mre11-Dimers an zwei Rad50-Proteine in der Nähe der ATPase-Domäne entsteht ein Komplex, bei dem die spiralförmigen Arme der Rad50-Proteine seitlich ausstrahlen. Dieser Komplex bindet an lineare DNA und kann DNA-Moleküle zusammenhalten, indem die Arme der Rad50-Moleküle über Zink-Komplexierung miteinander interagieren und die DNA-Moleküle so einschließen. Nach der Detektion eines DSBs kann dieser Komplex die entstandenen DNA-Enden innerhalb eines Schwesterchromatides oder zwischen einem gebrochenen und intakten Schwesterchromatid zusammenhalten und spielt somit eine wesentliche Rolle in der nicht-homologen sowie Homologie-gerichteten DSBR (de Jager and Kanaar, 2002). Neuere Untersuchungen zeigten, dass Rad50 auch im Komplex mit Nibrin, unabhängig von Mre11, DNA-Moleküle binden und in Position halten kann (van der Linden *et al.*, 2009).

Die heterozygote *RAD50*-Mutation (687delT/wt) führt zu einem vierfachen Anstieg des Brustkrebsrisikos bei Frauen (Heikkinen *et al.*, 2006).

1.5.2.5 FANCI

Das *FANCI*-Gen, auch als *BRIP1* und *BACH1* bezeichnet, ist auf dem langen Arm von Chromosom 17 auf der Bande 22 lokalisiert. Das Fanci-Protein besteht aus 1249 Aminosäuren (De Nicolo *et al.*, 2008). Fanci ist eines von bisher dreizehn identifizierten

Fanconi anemia-Proteinen. Die *Fanconi anemia* ist eine äußerst seltene, autosomal-rezessive Erbkrankheit, die durch angeborene Fehlbildungen, kleine Statur, Rückbildung des Knochenmarks und ein extrem hohes Krebsrisiko charakterisiert ist (Jacquemont and Taniguchi, 2007). Mutationen in den Genen *FANCI*, *FANCD1/BRCA2* sind mit einem erhöhten Brustkrebsrisiko assoziiert und führen zu Beeinträchtigungen der Homologiegerichteten DSBR (Litman *et al.*, 2008). Zellen mit Defekten in der C-terminal, an Brca1 assoziierten FancJ-Helikase zeigten zum Beispiel eine hohe Sensitivität gegenüber dem DNA quervernetzenden Agens Mitomycin C (MMC) und führten zu MMC-induzierter Chromosomeninstabilität (Litman *et al.*, 2005). Biochemisch kann FancJ durch seine katalytische ATPase-Funktion Protein-DNA-Komplexe destabilisieren und DNA-Strukturen entwinden. Insgesamt spielt FancJ eine wichtige Rolle in der DNA-Reparatur, der Rekombination und bei der Auflösung von aberranten DNA-Strukturen. Weiterhin kann FancJ den Rad51-vermittelten Strangaustausch inhibieren und somit möglicherweise die Genauigkeit der HR kontrollieren (Sommers *et al.*, 2009).

1.5.2.6 *FANCN*

FANCN, auch als *PALB2* bekannt liegt auf dem kurzen Arm von Chromosom 16 auf der Bande 12.2 und kodiert für ein 1186 Aminosäure langes Protein. FancN zählt wie FancJ zu den *Fanconi anemia*-Proteinen und Mutationen im *FANCN*-Gen sind mit einem 2,3-fach erhöhten Brustkrebsrisiko assoziiert (Erkko *et al.*, 2007; Rahman *et al.*, 2007; Walsh and King, 2007). FancN ist ein Bindungspartner von Brca2 und kolokalisiert mit Brca1 und Brca2 in nukleären Foci. Dabei bindet FancN an den N-Terminus von Brca2, stabilisiert dessen Proteinstruktur im Nukleus und ermöglicht die Funktion von Brca2 in der fehlerfreien HR (Howlett, 2007; Walsh and King, 2007; Xia *et al.*, 2006). *BRCA2*- und *FANCN*-defiziente Zellen weisen einen deutlichen Defekt in der Rad51-Focibildung und eine verminderte Effizienz der HR auf (Moynahan *et al.*, 2001; Xia *et al.*, 2007; Xia *et al.*, 2006).

1.6 Das auf *EGFP*-Rekonstitution basierende DSBR-Testsystem

Um den Einfluss von Mutationen, der unter Abschnitt 1.5 aufgeführten Gene zu untersuchen, wurde das *EGFP* (*Enhanced green fluorescent protein*)-basierte DSBR-Testsystem von Akyüz *et al.* 2002 eingesetzt. Dieses System beruht auf der genetischen Rekonstitution von wt(Wildtyp)-*EGFP* nach DSB-Induktion. Diese DSBs werden unter Verwendung der ortsspezifischen Endonuklease I-SceI künstlich erzeugt. Die Erkennungssequenz, der aus den Mitochondrien der Hefe isolierten Endonuklease I-SceI, umfasst 18 Nukleotide und kommt nicht im humanen Genom vor. Durch die Verwendung unterschiedlich mutierter *EGFP*-Gene

können verschiedene DSBR-Mechanismen untersucht werden. Hierbei sind die für die Chromophorregion kodierenden Aminosäuren der *EGFPs* durch die *I-SceI*-Erkennungssequenz oder durch Mutation/Deletion nicht funktionsfähig. Durch Rekonstitution des *wtEGFP*-Genes nach erfolgreicher Reparatur des künstlich initiierten DSBes erfolgt die Expression des EGFP-Proteins und die Zellen leuchten grün und können am Durchflusszytometer detektiert und analysiert werden (Abb. 7). In Abb. 8 werden jedem verwendeten DSBR-Plasmid die damit detektierbaren DSBR-Mechanismen zugeordnet.

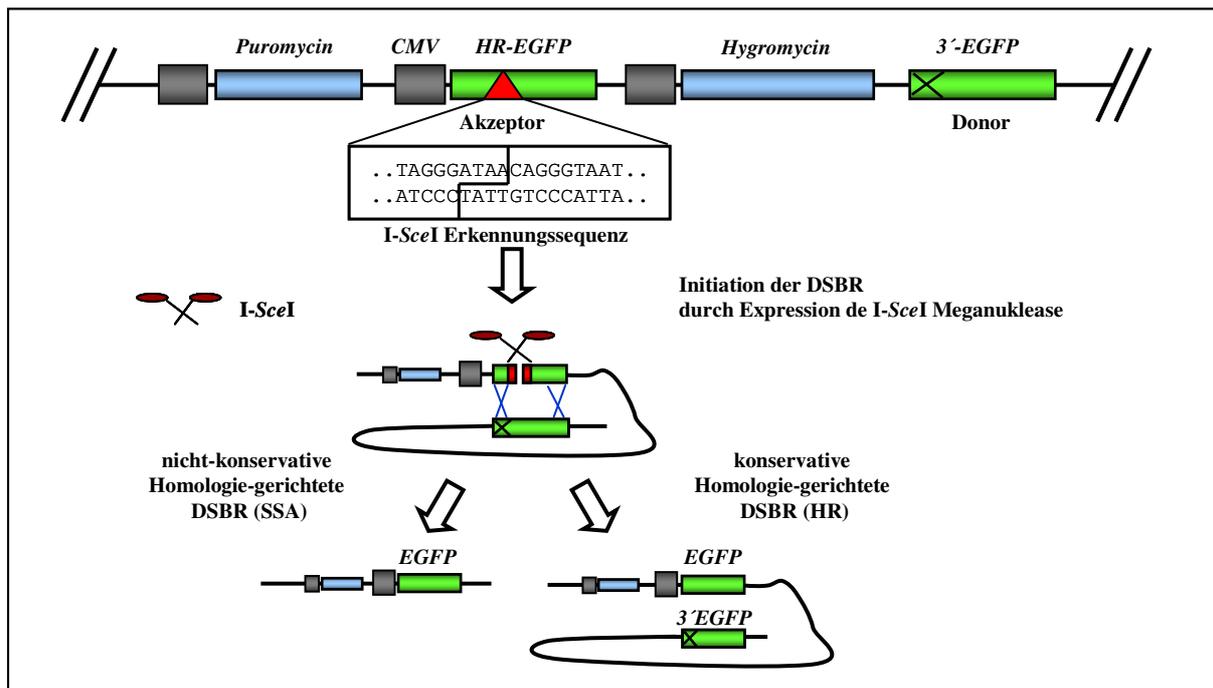


Abb. 7 Prinzip des auf *EGFP*-Rekonstitution basierenden DSBR-Testsystems

Nach Initiierung der DSBR durch Expression von *I-SceI* und Restriktion an der *I-SceI* Erkennungssequenz im Akzeptorgen (*HR-EGFP*) kommt es zur Rekonstitution des *wtEGFP*-Genes durch DSBR und anschließend zur Expression von EGFP-Protein. Diese Zellen fluoreszieren grün und werden am Durchflusszytometer detektiert (modifiziert nach Akyüz *et al.* 2002).

Das *EJ-EGFP*-Konstrukt dient zur Untersuchung von Mikrohomologie-gerichtetem NHEJ und besteht aus einem *EGFP*-Gen, das durch die *I-SceI*-Erkennungssequenz unterbrochen wurde. Diese Sequenz ist in eine fünf Basenpaare lange Duplikation der *EGFP*-Chromophorregion eingebettet. Ein funktionelles *EGFP* entsteht nur nach Deletion eines der 5 Basenpaare und der dazwischenliegenden *I-SceI*-Erkennungssequenz.

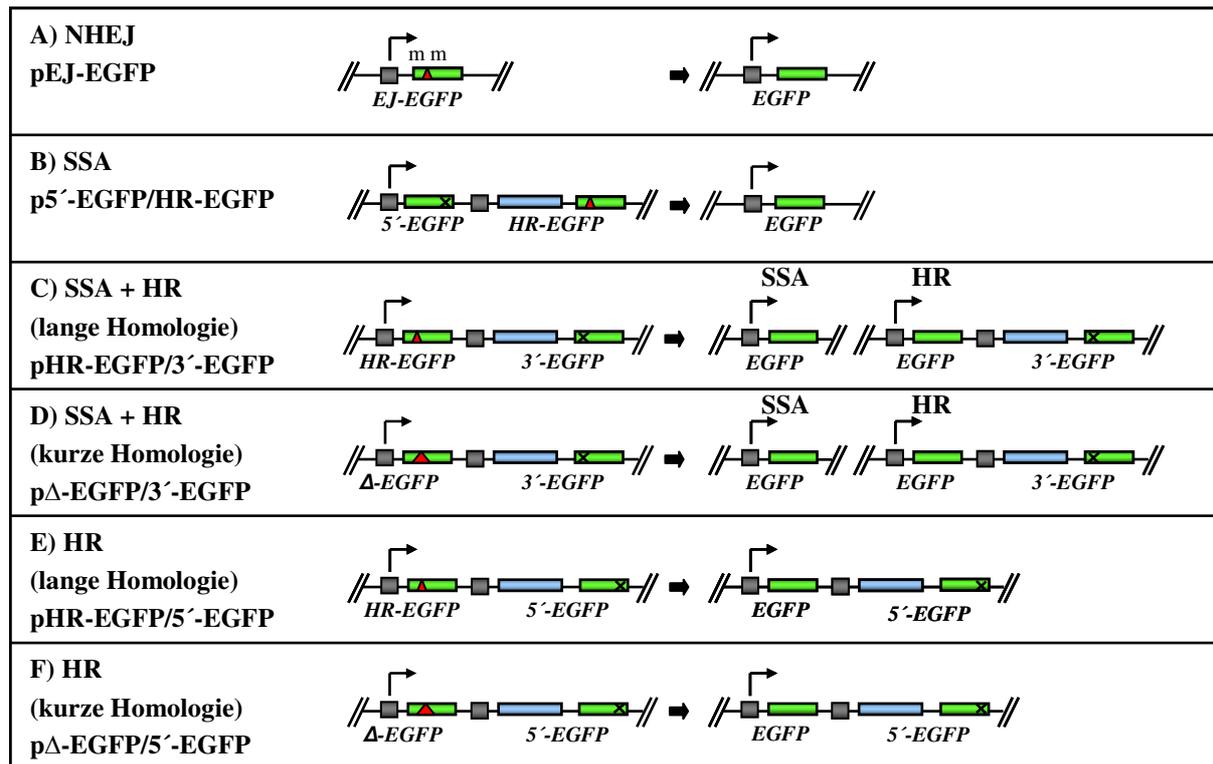


Abb. 8 Schematische Darstellung der DSBR-Plasmide und Ergebnisse der DSBR nach I-SceI-Restriktion und Rekonstitution des wtEGFP

Die wtEGFP Rekonstitution wurde ermöglicht durch die Kombinationen aus jeweils einem der drei Akzeptorgene (*EJ-EGFP*, Δ -EGFP, *HR-EGFP*) mit I-SceI-Erkennungssequenz (rotes Dreieck) sowie dem 5'-trunkiertem Donorgen (3'-EGFP), dem 3'-trunkiertem Donorgen (5'-EGFP), oder ohne Donorgen (*EJ-EGFP*). Der CMV-Promotor ist grau und Platzhaltergene (Antibiotikaresistenzgen oder *RED*-Gen) sind blau gekennzeichnet. **A)** In pEJ-EGFP wurde die I-SceI-Erkennungssequenz zwischen einer Duplikation von 5 Basenpaaren (m), zur Ermittlung von Mikrohomologie-gerichtetem NHEJ eingebettet **B)** Akzeptor/Donor-Kombination zur Detektion von nicht konservativer DSBR (SSA) **C)** Kombination zur Ermittlung von nicht konservativer Homologie-gerichteter DSBR (SSA)/konservativer Homologie-gerichteter DSBR (HR) mit langer Homologie, **D)** Kombination zur Ermittlung von nicht konservativer Homologie-gerichteter DSBR (SSA)/konservativer Homologie-gerichteter DSBR (HR) mit kurzer Homologie, **E)** zur Detektion von konservativer Homologie-gerichteter DSBR (HR) mit langer Homologie, **F)** zur Detektion von konservativer Homologie-gerichteter DSBR (HR) mit kurzer Homologie (modifiziert nach Keimling *et al.* 2008)

Alle weiteren DSBR-Plasmide bestehen aus zwei nicht-funktionellen *EGFP*-Genen, den Akzeptorgenen Δ -EGFP oder *HR-EGFP* und den Donorgenen 3'-EGFP oder 5'-EGFP. Im Akzeptorgen Δ -EGFP erfolgte eine Deletion von 46 Basenpaaren um die Codons 65-67, welche für die chromophoren Aminosäuren kodieren. Somit steht nur eine verkürzte Homologielänge für die DSBR zur Verfügung. Demgegenüber wurde das Akzeptorgen *HR-EGFP* durch die I-SceI-Erkennungssequenz und durch eine Deletion von 4 Basenpaaren innerhalb des Codons 65-67 unterbrochen. Für DSBR-Ereignisse ist eine ausreichende Homologielänge vorhanden (Abb. 9). Die Donorgene weisen ebenfalls ein unterschiedliches Design auf. Bei dem Donorgen 3'-EGFP wurde das Startcodon Methionin durch zwei Stoppcodons ersetzt, während das 5'-EGFP eine Deletion am 3'-Ende aufweist.

Die Namensgebung der Donorgene bezieht sich auf die intakten Genabschnitte.

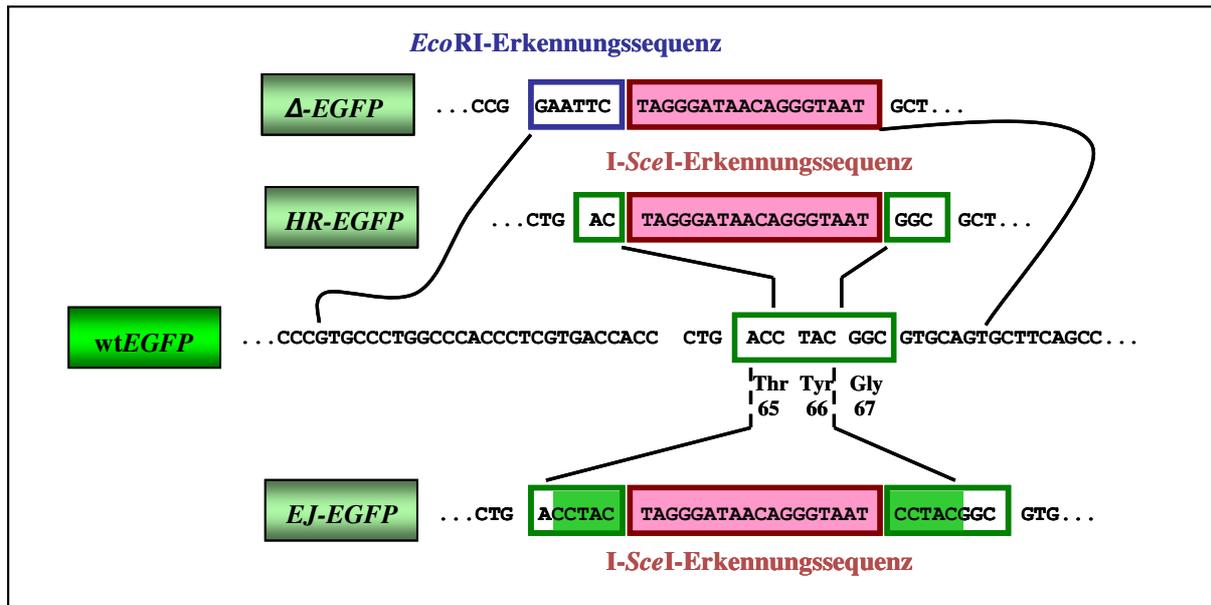


Abb. 9 Darstellung der Akzeptorgene Δ -, HR- und EJ-EGFP

Die wtEGFP-Sequenz mit der Chromophorregion, bestehend aus den drei Aminosäuren T65-Y66-G67 wurde zentral durch ein grünes Kästchen hervorgehoben. Die I-SceI-Erkennungssequenz ist rot, die EcoRI-Erkennungssequenz blau umrandet. Die deletierten/inserierten Sequenzen sind durch grüne Umrandungen hervorgehoben (modifiziert nach Akyüz *et al.* 2002).

1.7 Problemstellung

In den letzten Jahren wurde die Sequenzierung der beiden wichtigsten Brustkrebs-suszeptibilitätsgene *BRCA1* und *BRCA2* als Standardmethode zur Brustkrebsrisikoabschätzung etabliert. Dabei handelt es sich um ein sehr kostspieliges Verfahren, da die Mutationen vielfältig und die Gene *BRCA1* und *BRCA2* sehr groß sind. Weiterhin kann durch die Sequenzierung allein das tatsächliche Zusammenwirken der Genprodukte nicht untersucht werden, womit eine genaue Risikoabschätzung für die Brustkrebsentstehung bisher nur begrenzt möglich ist (Ralhan *et al.*, 2007). Die Erkenntnis, dass die Genprodukte alle bisher identifizierten Brustkrebs-suszeptibilitätsgene in die DSBR involviert sind, ermöglicht die Anwendbarkeit des EGFP-basierten DSBR-Testsystems von Akyüz *et al.* 2002 zur Identifizierung spezifischer DSBR-Dysfunktionen und möglicherweise zur genaueren Brustkrebsrisikoabschätzung, da nicht einzelne Gene untersucht, sondern das Zusammenspiel der Genprodukte erforscht wird. (Akyüz *et al.*, 2002; Keimling *et al.*, 2008; Ralhan *et al.*, 2007). Die Verwendung eines Testsystems zur Identifizierung von DSBR-Defektmustern wurde von der Erkenntnis unterstützt, dass *unclassified variants* von *BRCA2*, die mit erhöhtem Brustkrebsrisiko assoziiert sind, eine signifikante Senkung der HR aufwiesen (Wu *et al.*, 2005). Interessanterweise konnte jedoch mit Methoden zur Detektion von DNA-Schäden, wie dem Comet Assay keine eindeutige Charakterisierung von *BRCA1*-Mutationsträgern und Kontrollprobanden erfolgen (Rothfuss *et al.*, 2000; Speit and Trenz,

2004), so dass diese Systeme für die Brustkrebsrisikoeinschätzung nur beschränkt geeignet sind. Da mit dem *EGFP*-basierten DSBR-Testsystem von Akyüz *et al.* 2002 verschiedene DSBR-Mechanismen untersucht werden können und damit eine vielschichtige Charakterisierung verschiedener DSBR-Defekttypen möglich ist, sollten im ersten Teil der Arbeit immortalisierte Zelllinien mit Mutationen in den bekannten Brustkrebs susceptibilitäts genen *BRCA1*, *BRCA2*, *TP53*, *ATM*, *NBN*, *RAD50* und *CHEK2* für die Klassifizierung von spezifischen DSBR-Defektmustern verwendet werden. Der Einsatz unterschiedlicher DSBR-Plasmide ermöglichte die Analyse von NHEJ-, SSA- und HR-Aktivitäten der Zellen unter gleich bleibenden experimentellen Bedingungen. Parallel zu den DSBR-Messungen sollte die Zellzyklusverteilung analysiert werden, um mögliche Einflüsse auf die HR berücksichtigen zu können.

Im zweiten Teil der Arbeit stand die Charakterisierung der DSBR-Aktivitäten von primären, aus Brusttumorgewebe isolierten Zellen im Vordergrund. Hierfür sollte zunächst die Kultivierung der primären Epithel-, EMT (*Epithelial-mesenchymal transition*)- und Fibroblastenzellen etabliert werden. Des Weiteren mussten verschiedene Verfahren zur Transfektion der Zellen mit dem *EGFP*-basierten DSBR-Testsystem überprüft und optimale Bedingungen für die Analyse von NHEJ-, SSA- und HR-Aktivitäten gefunden werden. Parallel zu den DSBR-Messungen mit primären Zellen aus dem Brusttumor sollten die DSBR-Aktivitäten der Lymphozyten aus dem Blut der jeweiligen Patientin analysiert werden. Diese Untersuchungen sollten die Charakterisierung von hereditären versus nicht hereditären Brustkrebsformen ermöglichen. Durch immunhistochemische Färbungen sollten die aus dem Tumor isolierten primären Zellen eindeutig als Epithel-, EMT- und Fibroblastenzellen identifiziert werden, um festzustellen, welche Zellen sich am besten für den Nachweis der DSBR-Aktivitäten als Surrogat-Marker für Brustkrebsrisiko eignen. Um die DSBR-Aktivitäten mit einem ebenfalls kürzlich etablierten Test zu vergleichen, sollten die primären Zellen auch der γ H2AX-Fociquantifizierung nach Induktion von DSBen durch Behandlung mit dem radiomimetrischen Agens Bleomycin unterzogen werden.

Im dritten Teil der Arbeit sollte das Auftauchen der im ersten Teil identifizierten DSBR-Defekte in primären Lymphozyten von Brustkrebspatientinnen, Kontrollprobandinnen sowie Mitgliedern aus Hochrisikofamilien untersucht werden. Auf diese Weise sollte die Verwendbarkeit des *EGFP*-basierten DSBR-Testsystems als Biomarker für Brustkrebs susceptibilität geprüft werden. In diesem Zusammenhang musste ein Verfahren zur Kultivierung, Transfektion und Detektion der DSBR-Aktivitäten in primären Lymphozyten etabliert werden. Nach Etablierung der Testbedingungen sollte untersucht werden, ob

Unterschiede in der DSBR-Aktivität zwischen den einzelnen Gruppen erkennbar sind und in wieweit die Ergebnisse von spezifischen Einflüssen, wie dem Alter der Probanden oder veränderter Östrogenexposition beeinflusst werden.

2 MATERIAL

2.1 Geräte

Agarosegelelektrophorese-Kammern:

RunOne

Embitec, San Diego, USA

PerfectBlue Mini M

PeqLab, Erlangen

Amaxa Nucleofector I or II

Lonza, Köln

Analysenwaagen:

P1200

Mettler, Gießen

Sartorius BP61

Sartorius, Göttingen

Autoklav, Varioklav 75S

H+P, Oberschleißheim

Brutschränke:

Inkubator B6760

Heraeus, Hanau

Inkubator 311

Thermo, Egelsbach

Inkubator 3862

Forma Scientific, Marietta, USA

Concentrator 5301

Eppendorf, Hamburg

Durchflußzytometer:

FACSCalibur™

Becton Dickinson, Heidelberg

Eismaschine

Ziegra, Isernhagen

Gefrier- und Kühlsysteme:

-86 °C, HFU3285SITOP-V37

Kendro, Asheville, USA

-86 °C, *Forma Scientific 917*

Thermo, Fremont, USA

Premium NoFrost

Liebherr, Ochsenhausen

Froster-520

Kirsch, Offenburg

Geldokumentationsanlage:

MultiImageTMLight Cabinet

Biozym Diagnostik, Oldenburg

Gelgießkammer SE200

Hofer, San Francisco, USA

Gene Pulser® mit Pulse Controller

Biorad, München

Magnetrührer:

Heidolph MR1

Heidolph Instruments, Schwabach

IKA-Combimag RCO

Janke&Kunkel, Staufen im Breisgau

Mikroskope:

Axiovert 25

Zeiss, Jena

Olympus IX50-S8F

Olympus, Tokyo, Japan

Olympus BX51	Olympus, Tokyo, Japan
Mikrotiterplatten-Photometer MRX	Dynatech Laboratories, Chantilly, VA, USA
Mikrowelle MS-1915H	LG Electronics, Seoul, Korea
PCR-Geräte Primus	MWG-Biotech, Ebersberg
pH-Meter MP230	Mettler-Toledo, Greifensee, Schweiz
Photometer DU640	Beckman, München
Polyacrylamid-Gelelektrophoresesystem:	
SE250	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
<i>Mighty Small II</i>	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Power Supply:	
EPS 1000	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
EPS 1001	Amersham Biosciences, Piscataway, USA
EPS 2A 200	Amersham Biosciences, Piscataway, USA
Schüttelinkubatoren:	
Certomat®R	B. Braun Biotech Int., Melsungen
<i>Phero-Shaker</i>	Biotec-Fischer, Reiskirchen
<i>Variospeed</i>	Biotec-Fischer, Reiskirchen
Easia®Shaker	Medgenix, Ratingen
Sterilbänke:	
<i>Clean Air DLF/REC6</i>	Clean Air Techniek, Woerden, Niederlande
<i>Clean Air DLF/BSS6</i>	Clean Air Techniek, Woerden, Niederlande
Stickstofftanks:	
Apollo200	Messer-Griessheim, Euteneuen
BT40	L'air Liquide, Champigny, Frankreich
<i>Test-Tube-Rotator</i>	Snijders, Tilburg, Niederlande
Ultraschallbad Sonorex RK31	Bandelin, Berlin
Western-Blot-Kammer TE Series	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
VortexGenie 2	Bender und Hobein, Zürich
Zentrifugen:	
Biofuge 13	Heraeus-Sepatech, Osterode
Biofuge pico	Kendro, Osterode
Multifuge 1 _{S-R}	Kendro, Osterode
Multifuge 3 _{S-R}	Kendro, Osterode

Rotanta 96R

Hettich, Tuttlingen

2.2 Chemikalien und Biochemikalien

Die in dieser Arbeit verwendeten, handelsüblichen Chemikalien wurden von den Firmen Merck KGaA (Darmstadt), Serva Feinbiochemica GmbH & Co. KG (Heidelberg), Riedel de Hään AG (Seelze) Fluka und Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Deisenhofen) bezogen. Spezielle Chemikalien, Enzyme und Produkte stammten von folgenden Firmen:

Aceton	Sigma-Aldrich, Steinheim
Acrylamide/Bisacrylamide (30:0,8) (w/v)	National Diagnostics, USA, Atlanta
Agarose	Invitrogen, Karlsruhe
Ammoniak	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ammoniumchlorid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Bio-Rad Laboratories, USA, Hercules
Ampicillin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ascorbinsäure	Sigma-Aldrich, Steinheim
Bacto Agar	Becton Dickinson, USA, Sparks
Bacto Trypton	Becton Dickinson, USA, Sparks
Bacto Hefe-Extract	Becton Dickinson, USA, Sparks
Bleomycin	Sigma-Aldrich, Steinheim
<i>Bovine Pituitary Extract</i>	Gibco BRL Life Technologies, Eggenstein
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Steinheim
BSA (IgG frei, Proteasefrei)	Jackson-Immuno Research
BSA	New England Biolabs, Frankfurt/M.
CaCl ₂	Sigma-Aldrich, Steinheim
Choleratoxin	Biomol, Hamburg
Chloramphenicol	Roche, Mannheim
<i>Coomassie Brilliant Blue G250</i>	Bio-Rad Laboratories, USA, Hercules
Cryomaxx S (Einfriermedium)	PAA, Pasching
DABCO	Sigma-Aldrich, Steinheim
DAPI	Sigma-Aldrich, Steinheim
ddH ₂ O	Fresenius Kabi, Bad Homburg, Apotheke Universität, Ulm
<i>DetachKit</i>	Promocell, Heidelberg

Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt
DMEM <i>High Glucose Medium</i>	PAA, Pasching
DMEM /Ham's F12	PAA, Pasching
dNTPs	New England Biolabs, Frankfurt/M.
DTT	Sigma-Aldrich, Steinheim
EDTA-Dinatriumsalz-Dihydrat	Applichem, Darmstadt
Essigsäure	Sigma-Aldrich, Steinheim
Eisessig	Sigma-Aldrich, Steinheim
<i>Epidermal Growth Factor</i> (EGF)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ethylenglykoldiamintetraessigsäure (EGTA)	Roth, Karlsruhe
Estradiol	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ethanol absolute	Sigma-Aldrich, Seelze
Ethanolamine	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, Steinheim
<i>Fetal Bovine Serum Gold</i> (FBS)	PAA, Pasching
FACS-Clean	Becton-Dickinson, Heidelberg
FACS-Rinse	Becton-Dickinson, Heidelberg
FACS-Flow	Becton-Dickinson, Heidelberg
<i>FcR Blocking Reagent</i>	Miltenyibiotec, Bergisch Gladbach
Ficoll 400	Amersham Biosciences, Piscataway, USA
Formaldehydlösung 37 %	Sigma-Aldrich, Steinheim
Gentamycin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Glutamine	PAA, Pasching
Glycerol	J.T.Baker, Holland, Deventer
β -Glycerolphosphat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Glycin	Applichem, Darmstadt
Größenstandards:	
<i>HiMark Pre-Stained HMW Protein Standard</i>	Invitrogen, Karlsruhe
<i>Gene RulerTM DNA Ladder-Mix</i> (100-10.000 bp)	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
<i>Page RulerTM Pre-Stained Protein Ladder</i>	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
<i>Page RulerTM Pre-Stained Protein Ladder Plus</i>	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Hämalaunlösung	Merck, Darmstadt
HEPES-Puffer	Gibco BRL Life Technologies, Eggenstein
<i>Horse Serum</i>	Invitrogen, Karlsruhe

<i>Hydrocortison Solution</i>	Sigma-Aldrich, Steinheim
Hygromycin B	Roche, Mannheim
Insulin	Invitrogen, Karlsruhe
Isopropanol	Sigma-Aldrich, Seelze
Isoseptol	Apotheke, Universität Ulm
Kaliumacetat	Merck, Darmstadt
Kaliumhydrogencarbonat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Kanamycin Monosulfat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Laurylsulfat Natriumsalz (LDS)	Merck, Darmstadt
L-Glutamine (200 mM)	Biochrome, Berlin
LSM 1077 Lymphozyten Separationsmedium	PAA, Pasching
MACS Separationssäulen	Milenyi Biotec, Tübingen
<i>Mammary epithelial cell growth media</i>	Promocell, Heidelberg
Methanol	Sigma-Aldrich, Seelze
Magermilchpulver Marvel	Premier Foods Ltd., UK, Long Sutton
2-Mercaptoethanol	Bio-Rad Laboratories, USA, Hercules
MgCl ₂	Sigma-Aldrich, Seelze
MgSO ₄	Sigma-Aldrich, Seelze
MnCl ₂	Sigma-Aldrich, Seelze
MOPS	Sigma-Aldrich, Steinheim
Mowiol 4-88	Calbiochem, Darmstadt
Natriumchlorid	Applichem, Darmstadt
Natriumcitrat	Merck, Darmstadt
Natriumfluorid	Merck, Darmstadt
Natriumperiodat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumpyruvat	Invitrogen, Karlsruhe
Natriumvanadat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Nicht-essentielle Aminosäuren	Invitrogen, Karlsruhe
Nonidet P40	Fluka, Neu Ulm
NuPAGE [®] Antioxidant	Invitrogen, Karlsruhe
<i>Orange G</i>	Merck, Darmstadt
PBS (1x/10x)	PAA, Pasching
Penicillin	Invitrogen, Karlsruhe
Penicillin/Streptomycin	Invitrogen, Karlsruhe

Penicillin/Streptomycin/Glutamine	Invitrogen, Karlsruhe
Phosphoethanolamine	Sigma-Aldrich, Steinheim
Phytohemagglutinin (PHA)	PAA, Pasching
Ponceau S Lösung	Sigma-Aldrich, Steinheim
Propidiumiodid (PI)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Proteaseinhibitor-Tabletten, EDTA frei	Roche, Mannheim
Puromycin	PAA, Pasching
<i>Quantum 286 for Epithelial Cells</i>	PAA, Pasching
<i>Quantum PBL</i>	PAA, Pasching
RbCl	Sigma-Aldrich, Steinheim
Refobacin 80 mg	Merck, Darmstadt
Rotiphorese 10 x SDS Page-Puffer	Roth, Karlsruhe
RPMI 1640	PAA, Pasching
Salzsäure	Merck, Darmstadt
Sodium Selenite	Sigma-Aldrich, Steinheim
Streptomycin	Invitrogen, Karlsruhe
TEMED	Roth, Karlsruhe
Transferrin, human	Sigma-Aldrich, Steinheim
<i>Triiodo-L-thyronine sodium salt</i>	Sigma-Aldrich, Steinheim
Trisma-Base	Sigma-Aldrich, Steinheim
Tris/HCl	Roth, Karlsruhe
Triton-X-100	Sigma-Aldrich, Steinheim
Trypanblau-Solution	Sigma-Aldrich, Steinheim
Trypsin-EDTA (1x)	PAA, Pasching
Tween 20	Merck, Darmstadt
Vectashield®	Vector Laboratories, USA, Burlingame

2.3 Sonstige Materialien

<i>Avidin/Biotin Blocking Kit</i>	Vector Laboratories, USA, Burlingame
<i>BCA Protein Assay Kit</i>	Thermo scientific, USA, Rockford Illinois
<i>Blood and Cell Culture DNA Mini Kit (25)</i>	QIAGEN, Hilden
<i>Cell Line Nucleofector Kit V</i>	Lonza, Köln
Chemilumineszenz Substrate: <i>Super Signal® West Pico</i>	Thermo scientific, USA, Rockford Illinois

<i>Super Signal West Dura Extended Duration</i>	Thermo scientific, USA, Rockford Illinois
Einfrierröhrchen	Greiner-Bio-One, Frickenhausen
Elektroporationsküvetten (0,4 mm)	Bio-Rad Laboratories, USA, Hercules
FACS-Rundbodenröhrchen (5 mL)	Becton-Dickinson, Heidelberg
Falconröhrchen 15 mL/50 mL	Becton-Dickinson, Heidelberg
Filterpapier Whatman 3 MM	Schleicher und Schüll, Dassel
<i>FuGENE[®] HD Transfection Reagent</i>	Roche, Mannheim
<i>FuGENE[®] 6 Transfection Reagent</i>	Roche, Mannheim
<i>High Purity Plasmid Maxiprep System</i>	Marligen, USA, Ijamsville
<i>Human B Cell Nucleofector Kit</i>	Lonza, Köln
<i>Human Mammary Epithelial Cell Kit (HMEC)</i>	Lonza, Köln
<i>Human T Cell Nucleofector Kit</i>	Lonza, Köln
Hybond-C-Extra, Nitrocellulose	Amersham Biosciences, Freiburg
Hyperfilm ECL	Amersham Biosciences, Freiburg
Immobilon-P Membran (PVDF)	Millipore, Eschborn
Lithium-Heparin Monovette (7,5 mL/9 mL)	Sarstedt, Nümbrecht
Pasteurpipetten	Brand, Wertheim
<i>QIAprep Miniprep Kit (50)</i>	QIAGEN, Hilden
<i>QIAamp DNA Blood Mini Kit (50)</i>	QIAGEN, Hilden
Reaktionsgefäße 0,5 mL/1,5 mL/2 mL	Eppendorf, Hamburg; Sarstedt, Nümbrecht
Skalpell	Braun, Tuttlingen
96, 24- und 6-Well-Platte	Sarstedt, Nümbrecht; Nunc, Wiesbaden
Zellkultur (ZK)-Flasche 25 cm ² /75 cm ²	Nunc, Wiesbaden
ZK-Platte 9 cm/15 cm (besch./unbeschichtet)	Sarstedt, Nümbrecht; Nunc, Wiesbaden

2.4 Puffer und Lösungen

Ammoniakwasser	1 mL	Ammoniak
	999 mL	ddH ₂ O
DABCO-Stammlösung	200 mg	DABCO/mL PBS
Erythrozyten-Lyse-Puffer	155 mM	Ammoniumchlorid
	19 mM	Kaliumhydrogencarbonat
	0,1 mM	EDTA Dinatriumsalz, pH 7,4
SE-Puffer	75 mM	Natriumchlorid
	25 mM	EDTA Dinatriumsalz, pH 8,0
4x SDS Sammelgelpuffer	0,5 M	Tris/HCl, pH 6,8
	0,4 %	SDS

4xSDS-Trenngelpuffer	1,5 M 0,4 %	Tris/HCl, pH 8,8 SDS
5 x DNA-Probenpuffer	50 % 0,1 g/L 100 mM 0,25 %	Glycerin SDS EDTA Bromphenolblau (BPB)
Fixierlösung	40 % (v/v) 50 % (v/v) 10 % (v/v)	Ethanol Aceton ddH ₂ O
10 x High-Molecular-Weight (H.M.W.) Puffer	495 mM 400 mM	Tris-Base "Trisma Base" Glycin
1x H.M.W.-Puffer	100 mL 900 mL	10 x H.M.W.-Puffer dd H ₂ O
20 x MOPS-Puffer	50 mM 50 mM 0,1 % 1 mM pH 7,7	MOPS Tris Base "Trisma Base" SDS EDTA
1 x MOPS-Puffer mit Antioxidantien	10 mL 190 mL 500 µL	20 x MOPS-Puffer ddH ₂ O NuPAGE [®] Antioxidant
Mowiol-Stammlösung	20 g in 80 mL 40 mL 24 h bei RT rühren, pH-Kontrolle (6-7) 15 min Zentrifugation 12.000 upm, 20°C Überstand portioniert wegfrieren (-20°C)	Mowiol 4-88 PBS für 24 h bei RT rühren Glycerin (100 %) zugeben
Mowiol-DABCO-Gemisch	75 % (v/v) 25 % (v/v)	Mowiol DABCO
PBS-T	0,05 % in 1 L PBS (1x)	Tween 20
10 x PI-Färbelösung	500 µg/mL 38 mM	Propidiumiodid Natriumcitrat, pH 7,0
1 x PI-Färbelösung zur Zellzyklusanalyse	50 µg/mL in mit PBS verdünnter 1 x PI-Färbelösung	RNAseA
50 x TAE-Puffer	2 M 1 M 0,1 mM pH 8,3 mit konz. Essigsäure einstellen	Tris-Base „Trisma Base“ Eisessig EDTA
TBS-T	20 mM 137 mM 0,2 %	Tris/HCl, pH 7,6 Natriumchlorid Tween 20
TBS-T-5 % MP	5%	Magermilchpulver in TBS-T lösen

MATERIAL

TE-Puffer	10 mM	Tris
	1 mM	EDTA, pH 8,0
TFB-I-Puffer	100 mM	RbCl
	50 mM	MnCl ₂
	10 mM	CaCl ₂
	30 mM	Kaliumacetat
	15 %	Glycerol
	pH 5,8 mit 0,2 M Essigsäure einstellen	
TFB-II-Puffer	10 mM	MOPS
	10 mM	RbCl
	75 mM	CaCl ₂
	15 %	Glycerol,
	pH 7,0 mit NaOH einstellen	
Tris-Glycin-Puffer	250 mM	Glycin
	50 mM	Tris/HCl, pH 8,3
Waschpuffer	1 x	PBS
	0,5 %	BSA
	2 mM	EDTA
Zell-Lysepuffer für Proteinextraktion	50 mM	Tris-Base "Trisma Base"
	150 mM	NaCl
	2 mM	EGTA
	2 mM	EDTA
	25 mM	Natriumfluorid
	25 mM	β-Glycerolphosphat
	0,1 mM	Natrium-Vanadat
	0,2 %	Triton X-100
	0,3 %	Nonidet P40
	1 Proteaseinhibitorcocktailtablette	

2.5 Nährmedien

Medium für Brustkrebszellen:	10 %	FBS
	1 %	nicht-essentielle Aminosäuren
	1 %	Glutamine
	1 %	Penicillin/ Streptomycin/ Glutamine
	5 µg	EGF
	2 mg	Insulin
	in 500 mL DMEM <i>High Glucose-Medium</i>	
Medium für Suspensionszellen:	15 %	FBS
	1 %	Penicillin/ Streptomycin
	3 M	Glutamine
	in 500 mL RPMI 1640-Medium	
Medium für primäre Zellen aus Brustgewebe:	2/3	Medium für Brustkrebszellen
	1/3	<i>Quantum 286 for Epithelial Cells</i>

Medium für MCF10a und MCF12a:	5 %	<i>Horse Serum</i>
	10 mg	EGF
	5 mg	Insulin
	2 %	Glutamine
	20 mg	Refobacin
	25 nM	Hydrocortison
	50 µg	Choleratoxin
	in 500 mL DMEM/Ham's F12 Medium	
Medium für 76NTERT	15 mM	HEPES
	2,5 mM	Glutamine
	1 %	FBS
	12,5 ng/mL	EGF
	10 nM	Triiodothyronine
	50 µM	frisch gelöste Ascorbinsäure
	2 nM	Estradiol
	1 µg/mL	Insulin
	2,8 µM	Hydrocortisone
	0,1 mM	Ethanolamine
	0,1 mM	Phosphoethanolamine
	10 µg/mL	Transferrin
	15 nM	Sodium Selenite
	1 ng/mL	Choleratoxin
	35 µg/mL	<i>Bovine Pituitary Extract</i>
	100 U/mL	Penicillin
	100 U/mL	Streptomycin
	20 µg/mL	Gentamycin
Einfrüermedium für Lymphozyten:	70 %	Medium Suspensionszellen
	20 %	FBS
	10 %	Glycerol
	sterilfiltrieren (0,2 µm Filter)	
Transfektionsmedium für primäre Lymphozyten:	20 %	FBS
	1 %	Glutamine
	25 mg	Gentamycin
	in 500 mL RPMI 1640-Medium	
LB-Medium:	10 g	Bacto-Trypton
	5 g	Bacto Hefe-Extract
	10 g	NaCl in 1l ddH ₂ O, pH 7,4
	Das LB-Medium wurde mit verschiedenen Antibiotika in folgenden Konzentrationen versetzt:	
	100 µg/mL	Ampicillin oder
	30 µg/mL	Kanamycin oder
	30 µg/mL	Streptomycin
LB-Agar:	15 g	Bacto Agar in 1L LB-Medium (autoklavieren, abkühlen und mit Antibiotika versetzt ausplattieren)
Ψ-Broth-Medium	10 mg	MgSO ₄
	10 mg	MgCl ₂
	in LB-Medium auf pH 7,6 einstellen	

2.6 Enzyme

Proteinase K	Sigma-Aldrich, Steinheim
RNAse A	Sigma-Aldrich, Steinheim

2.7 Software

<i>BDTM PlateManager 1.0.1</i>	BD Biosciences, Heidelberg
<i>BD Cell Quest™ Pro 4.0.2</i>	BD Biosciences, Heidelberg
<i>BD Cell Quest™ Pro 5.2.1</i>	BD Biosciences, Heidelberg
<i>cellF 2.5</i>	Soft Imaging System, Münster
<i>ChemiImager™5500</i>	Alpha Innotech, SanLeandro, USA
DU640 Benutzersoftware	Beckman, München
Gimp 2.6.4	FSFE, Düsseldorf
Magellan 3	Tecan, Crailsheim
<i>Microsoft Office Professional 2003</i>	Microsoft, Redmond, USA
<i>Reference Manager Professional 10</i>	Thomson ResearchSoft, Stamford, USA
<i>GraphPad Prism 5.01</i>	GraphPad Software Inc., La Jolla, USA

2.8 Antikörper

2.8.1 Primärantikörper

Anti-Aktin	Monoklonaler Maus-Antikörper (IgM), erkennt α -, β - und γ -Aktin-Isoformen [Calbiochem (Ab-1, CP01), Darmstadt, Deutschland]
Anti-ATM	Monoklonaler Maus-Antikörper zur Erkennung von humanem ATM-Protein [Abcam (ab2618, 5C2), Cambridge, USA]
Anti-Brcal	Monoklonaler Maus-Antikörper erkennt das Epitop am N-Terminus (Aminosäure 304) des humanen Brcal-Proteins [Calbiochem (MS110, Ab1), Darmstadt, Deutschland]
Anti-Brc2	Monoklonaler Maus-Antikörper gegen humanes Brc2, erkennt Epitop von Aminosäure 1651 bis 1821 [Calbiochem (Ab1, Klon 2B, OP95), Darmstadt, Deutschland]
Anti-Chk2	Polyklonales Kaninchen-Serum zur Detektion von humanem Chk2-Protein am N-Terminus (Aminosäure 1-300) [Santa Cruz (H-300, sc-9064), Heidelberg, Deutschland]
Anti-Cytokeratin 8/18	Monoklonale Maus-Antikörper-Lösung erkennt Cytokeratin 8/18 [Biogenex (Klon 5D3, AM131-5M), Hamburg, Deutschland]

Anti-DNA-PKcs	Monoklonaler Maus-Antikörper-Cocktail erkennt humanes DNA-PKcs [Neo Markers (ab-4, MS-423-P1), Fremont, USA]
Anti-EMA	Monoklonale Maus-Antikörper-Lösung zur Detektion von <i>Epithelial membrane antigen</i> (EMA) [Dako (Clone E29, N1504), Clostrup, Dänemark]
Anti-GAPDH	Monoklonaler Maus-Antikörper zur Detektion von humanem GAPDH-Protein [Abcam (ab9484), Cambridge, USA]
Anti- γ H2AX	Polyklonales Kaninchen-Serum gegen phosphoryliertes H2AX pSer139, erkennt das Antigen zwischen Aminosäure 134 und 142. [Chemicon (AB3369, 07-164), Billerica, USA]
Anti-Nbs1	Monoklonaler Maus-Antikörper erkennt humanes Nibrin, Epitop in der Nähe des C-Terminus [Epitomics (1507-1, Y112), Burlingame, USA]
Anti-p21	Monoklonaler Maus-Antikörper gegen humanes p21, Erkennungssequenz sind die Aminosäuren 145 bis 164. [BD Pharmingen (SX118, 556430), Heidelberg, Deutschland]
Anti-Phospho-p53pSer15	Polyklonales Kaninchen-Serum zur Detektion von an Serin 15 phosphoryliertem p53-Protein [Cell Signaling (9284), Boston, USA]
Anti-p53 DO1	Monoklonaler Maus-Antikörper gegen humanes p53, erkennt das Peptid zwischen Aminosäure 21 und 25 [Calbiochem (Ab-6, OP43), Darmstadt, Deutschland]
Anti-Rad51	Polyklonales Kaninchen-Serum detektiert das Epitop am N-Terminus (Aminosäure 1-92) von humanem Rad51 [Santa Cruz (H-92, sc-8349), Heidelberg, Deutschland]
Anti- α -Tubulin	Monoklonaler Maus-Antikörper detektiert das Epitop zwischen Aminosäure 426 und 450 des α -Tubulin-Proteins [Abcam (DM1A, Ab7291), Cambridge, USA]
Anti-Vimentin	Monoklonale Maus-Antikörper-Lösung gegen Vimentin [Dako (Klon V9, N1521), Clostrup, Dänemark]

2.8.2 Sekundärantikörper

Ziege-Anti-Maus	konjugiert mit Peroxidase [Pierce, (32430) Rockford, USA]
Ziege-Anti-Kaninchen	konjugiert mit Peroxidase [Pierce, (32460) Rockford, USA]
Ziege-Anti-Maus (IgM)	konjugiert mit Peroxidase [Calbiochem (JA1200-5UG), Darmstadt, Deutschland]
Ziege-Anti-Kaninchen	konjugiert mit orange-fluoreszierendem Alexa-Fluor-555 Farbstoff [Invitrogen, (A21434) Karlsruhe, Deutschland]

2.9 Nukleinsäuren

Die verwendeten Plasmide sind in Tab. 1 aufgeführt, die shRNAs in Tab. 2 zusammengefasst.

Plasmide	Funktion	Herkunft
pBlueScriptII KS ^(+/-)	Ein Plasmidderivat des pBR322 mit einer multiplen Klonierungsstelle. Das Plasmid wird im Text als pBS abgekürzt.	Stratagene, Heidelberg
pCMV-I-SceI	Vektor zur Expression der I-SceI Meganuklease unter der Kontrolle des CMV-Promotors.	Maria Jasin (Rouet <i>et al.</i> 1994)
p5bPuro-CMV-wtEGFP	Vektor zur Expression des EGFP-Gens unter der Kontrolle des CMV-Promotors dient als Positivkontrolle bei DSBR-Analysen (Transfektionskontrolle)	Nuray Akyüz (Akyüz <i>et al.</i> 2002)
p5bPuro-CMV-EJ	Retroviraler Vektor zur Untersuchung von fehlerhaften NHEJ-DSBR-Ergebnissen (Verlust von 5 Nukleotiden)	Nuray Akyüz (Akyüz <i>et al.</i> 2002)
p5xtrshSV40Hygb-Puro-CMV-Δ	Retroviraler Vektor zur Untersuchung von DSBR-Ereignissen konservativer und nicht konservativer homologer Rekombination mit limitierter Homologielänge	Nuray Akyüz (Akyüz <i>et al.</i> 2002)
p5xtrshSV40Hygb-Puro-CMV-HR	Retroviraler Vektor zur Untersuchung von DSBR-Ereignissen konservativer und nicht konservativer homologer Rekombination mit ausreichender Homologielänge	Nuray Akyüz (Akyüz <i>et al.</i> 2002)
p5xESHygbPuro-CMV-Δ	Retroviraler Vektor zur Untersuchung von DSBR-Ereignissen konservativer homologer Rekombination mit limitierter Homologielänge	Nuray Akyüz (Akyüz <i>et al.</i> 2002)
p5xESHygbPuro-CMV-HR	Retroviraler Vektor zur Untersuchung von DSBR-Ereignissen konservativer homologer Rekombination mit ausreichender Homologielänge	Nuray Akyüz (Akyüz <i>et al.</i> 2002)
p5PuroCMV-N'EGFP-CMV-Red-HR	Retroviraler Vektor zur Untersuchung von DSBR-Ereignissen nicht konservativer homologer Rekombination mit ausreichender Homologielänge. Er erlaubt zusätzlich die Expression des RFP unter der Kontrolle des CMV-Promotors.	Karen Hinsch

Tab. 1 Plasmide

shRNA	Zielsequenz/Funktion	Herkunft
pSuper	shRNA Kontrollvektor, Amp ^r	Brummelkamp <i>et al.</i> 2002
pSuper-p53	Expressionsvektor für humane p53-shRNA, Amp ^r Zielsequenz: <i>GAC TCC AGT GGT AAT CTA C</i>	Brummelkamp <i>et al.</i> 2002

Tab. 2 shRNA

2.10 Biologisches Material

2.10.1 Bakterienstämme

Die verwendeten Bakterienstämme wurden in Tab. 3 aufgelistet.

Bakterienstamm	Merkmal	Herkunft
<i>E. coli</i> DH5α	F'/endA1 hsdR17 (r _k -m _k +) glnV44 thi-1 recA1 gyrA (Nal ^r) relA1 Δ (lacIZYA-argF)U169 deoR(φ80dlacΔ(lacZ)M15)	NEB, Frankfurt/M. Hanahan, 1983
<i>E. coli</i> SURE	El4-(McrA-) Δ(mcrCB-hsdSMR-Mrr)171 endA1 gyrA96 thi-1supE44 relA1 lac recB recJ sbcC sbcC umuC::Tn5 (kan ^r) uvrC [F' proAB lacIqZΔM15 Tn10(Tet ^r)]	Stratagene, La Jolla, CA, USA

Tab. 3 Bakterienstämme

2.10.2 Humane Zelllinien

Die im Rahmen dieser Doktorarbeit verwendeten humanen Zelllinien sind in Tab. 4 zusammengefasst.

Zelllinien	Klinischer Phänotyp	Zelltyp	Mutation	Herkunft
BT-20	Brustkrebs	Brustkrebs-zelllinie	<i>TP53</i> (132Q/132Q)	S. Wang-Gohrke, Ulm
HT1080	Fibrosarkom	Brustkrebs-zelllinie	p53-Status unbekannt	S. Wang-Gohrke, Ulm
MCF7	Adenokarzinom	Brustkrebs-zelllinie	wt <i>TP53</i>	R. Girgert, Stuttgart
MCF10a	fibrozystische Veränderung der Brustdrüse	Brustepithel-zelllinie	wt <i>TP53</i>	M. Weigand, Ulm
MCF12a	keine Erkrankung	Brustepithel-zelllinie	wt <i>TP53</i>	M. Weigand, Ulm
MDA-MB-134 IV	Brustkrebs	Brustkrebs-zelllinie	<i>TP53</i> (285K/wt)	S. Wang-Gohrke, Ulm
MDA-MB-157	Brustkrebs	Brustkrebs-zelllinie	<i>TP53</i> (261del26)/p53 null	S. Wang-Gohrke, Ulm
MDA-MB-231	Brustkrebs	Brustkrebs-zelllinie	<i>TP53</i> (280K/280K)	S. Wang-Gohrke, Ulm
MDA-MB-436	Brustkrebs	Brustkrebs-zelllinie	<i>TP53</i> (204ins7CGTGTGG/273H)	S. Wang-Gohrke, Ulm
MDA-MB-453	Brustkrebs	Brustkrebs-zelllinie	<i>TP53</i> (368del130 His frameshift)	S. Wang-Gohrke, Ulm
MDA-MB-468	Brustkrebs	Brustkrebs-zelllinie	<i>TP53</i> (273H/273H)	S. Wang-Gohrke, Ulm
76NTERT	keine Erkrankung	Brustkrebs-zelllinie	wt <i>TP53</i>	M. Troester, M.A., USA
T-47D	Brustkrebs	Brustkrebs-zelllinie	<i>TP53</i> (194F/194F)	S. Wang-Gohrke, Ulm
UACC-893	Brustkrebs	Brustkrebs-zelllinie	<i>TP53</i> (342stop/342 stop)	S. Wang-Gohrke, Ulm
HA56	<i>Ataxia telangiectasia</i>	lymphoblastoide Zelllinie	<i>ATM</i> (3085insA / 3880insA)	T. Dörk Hannover
HA101	<i>Ataxia telangiectasia</i>	lymphoblastoide Zelllinie	<i>ATM</i> (IVS7+5G>A/ D2625E-A2626P)	T. Dörk Hannover
HA126	<i>Ataxia telangiectasia</i>	lymphoblastoide Zelllinie	<i>ATM</i> (Y171X/Y171X)	T. Dörk Hannover
HA166	Brustkrebs	lymphoblastoide Zelllinie	<i>BRCA1</i> (C61G/wt)	T. Dörk Hannover
HA169	keine Erkrankung	lymphoblastoide Zelllinie	keine Mutation bekannt	T. Dörk Hannover
HA187	<i>Ataxia telangiectasia</i>	lymphoblastoide Zelllinie	<i>ATM</i> (E1978X/R250X)	T. Dörk Hannover
HA201	Brustkrebs	lymphoblastoide Zelllinie	<i>ATM</i> (IVS10-6T>G/wt) <i>CHEK2</i> (IVS2+1G>A/wt)	T. Dörk Hannover
HA202	Brustkrebs	lymphoblastoide Zelllinie	<i>ATM</i> (IVS10-6T>G/wt) <i>53BP1</i> (1531del6/wt)	T. Dörk Hannover
HA204	<i>Ataxia telangiectasia</i>	lymphoblastoide Zelllinie	<i>ATM</i> (7636del19/7636del19)	T. Dörk Hannover
HA226	<i>Nijmegen breakage syndrom</i>	lymphoblastoide Zelllinie	<i>NBN</i> (657del5/657del5)	T. Dörk Hannover
HA238	Brustkrebs	lymphoblastoide Zelllinie	<i>BRCA2</i> (5946delCT/wt)	T. Dörk Hannover
HA239	<i>Nijmegen breakage</i>	lymphoblastoide	<i>RAD50</i>	T. Dörk

	<i>syndrom</i>	Zelllinie	(R1099X/X1313Y)	Hannover
HA306	<i>Ataxia telangiectasia</i>	lymphoblastoide Zelllinie	<i>ATM</i> (1561delAG/R1875X)	T. Dörk Hannover
HA388	<i>Ataxia telangiectasia</i>	lymphoblastoide Zelllinie	<i>ATM</i> (9021insA/V2716A)	T. Dörk Hannover
HA433	<i>Ataxia telangiectasia</i>	lymphoblastoide Zelllinie	<i>ATM</i> (8068delT/8068delT)	T. Dörk Hannover
HA455	Brustkrebs	lymphoblastoide Zelllinie	<i>CHEK2</i> (dele(9,10)/wt) <i>NBN</i> (657del5/wt)	T. Dörk Hannover
HA456	keine Erkrankung	lymphoblastoide Zelllinie	<i>CHEK2</i> (I157T/I157T)	T. Dörk Hannover
HA464	Brustkrebs	lymphoblastoide Zelllinie	<i>CHEK2</i> (I157T/I157T)	T. Dörk Hannover
HCC1937BL	Brustkrebs	lymphoblastoide Zelllinie	<i>BRCA1</i> (5382insC/wt)	N. Herröder, C. Friesen Ulm
GM01526E	<i>Ataxia telangiectasia</i>	lymphoblastoide Zelllinie	<i>ATM</i> (M1T/M1T)	Coriell Institute for Medical Research, Camben, NY, USA
GM13023A	<i>Fanconi anemia</i>	lymphoblastoide Zelllinie	<i>FANCD1</i>	Coriell Institute for Medical Research, Camben, NY, USA
GM0253F	<i>Xeroderma pigmentosum</i>	lymphoblastoide Zelllinie	<i>XP-DL</i>	Coriell Institute for Medical Research, Camben, NY, USA
416MI	keine Erkrankung	lymphoblastoide Zelllinie	keine Mutation bekannt	G. Marra

Tab. 4 Humane Zelllinien

3 METHODEN

3.1 Molekularbiologische und mikrobiologische Methoden

3.1.1 Herstellung kompetenter Bakterien

Eine Einzelkolonie von *E.coli* DH5 α wurde in 5 mL LB-Medium ohne Antibiotikum überführt und auf dem Schüttler (180 x g, ü. N., 37°C) inkubiert. 50 mL Ψ -Broth-Medium wurden mit 1 mL dieser Bakterienkultur angeimpft und bis zu einer OD₅₅₀ von ca. 0,3 auf einem Schüttler (180 x g, 37°C) inkubiert. Anschließend wurde die Bakteriensuspension 15 min auf Eis gelagert und abzentrifugiert (10.000 x g, 15 min, 4°C). Das Bakterienpellet wurde in 12 mL eiskaltem TFB-I-Puffer resuspendiert und ca. 30 min auf Eis inkubiert. Die Suspension wurde abzentrifugiert (10.000 x g, 15 min, 4°C) und das Pellet in 4 mL TFB-II-Puffer gelöst. Nach 15 min Inkubation auf Eis wurden je 100 μ L Aliquote schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt.

3.1.2 Transformation kompetenter Bakterien

Die kompetenten Bakterien wurden auf Eis aufgetaut und je Transformation mit 100-1000 ng Plasmid-DNA versetzt und ca. 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock von 90 s bei 42°C wurden die Bakterien erneut 5 min auf Eis gelagert, anschließend mit 1 mL LB-Medium (ohne Antibiotikum) versetzt und 1 h bei 37°C inkubiert. Die Bakterien wurden auf LB-Agar mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert und ü. N. bei 37°C inkubiert.

3.1.3 Einfrieren von Bakterien

Die Bakterienkultur in LB-Medium wurde mit DMSO (Endkonzentration 10 %) versetzt und bei -80°C eingefroren und gelagert.

3.1.4 Isolierung der Plasmid-DNA aus Bakterien

Für die Maxi-Plasmid-Präparation wurde eine 300-500 mL Bakterienkultur auf dem Schüttler (180 x g, ü. N., 37°C) inkubiert und anschließend abzentrifugiert (10.000 x g, 10 min, RT). Die Isolierung der Plasmid-DNA aus diesen Bakterienpellets erfolgte mit dem *High Purity Plasmid Maxiprep System* von Marligen nach Angaben des Herstellers. Die Plasmid-DNA wurde durch Restriktionsverdau und anschließender Agarosegel-Elektrophorese überprüft.

3.1.5 Isolierung genomischer DNA aus eukaryotischen Zellen

Mindestens $1,5 \times 10^6$ primäre Zellen aus dem Brusttumorgewebe (siehe Abschnitt 3.2.4) wurden geerntet, zentrifugiert (300 x g, 5 min, 4°C) mit PBS gewaschen und erneut

sedimentiert. Die DNA wurde mittels *Blood and Cell Culture DNA Mini Kit* von QUIAGEN isoliert. Dabei erfolgte die Isolierung der genomischen DNA nach Angaben des Herstellers. Die Isolierung der genomischen DNA aus Blut erfolgte aus dem Sediment nach Dichtegradientenzentrifugation mittels Ficoll (siehe Abschnitt 3.2.3). Das Sediment wurde mit 35 mL eiskaltem Erythrozyten-Lyse-Puffer versetzt und ca. 30 min unter mehrfachem invertieren auf Eis inkubiert. Nach der Zentrifugation [250 x g (Bremse auf 1), 10 min, 4°C] wurde der Überstand vorsichtig entfernt und das Zellpellet erneut in 10 mL kaltem Erythrozyten-Lyse-Puffer resuspendiert. Durch wiederholte Zentrifugation konnte ein weißes Zellpellet aus kernhaltigen Zellen gewonnen werden. Zur Proteolyse wurde das Zellpellet in 5 mL SE-Puffer resuspendiert, 50 µL Proteinase K (10 mg/mL) und 250 µL SDS (20 %) zugegeben und ü. N. bei 55°C inkubiert. Nach dem Proteinabbau wurde 1,8 mL saturierte 6 M NaCl-Lösung zugesetzt und das Gemisch genau 15 s auf dem Vortexer geschüttelt. Die anschließende Zentrifugation erfolgte bei ca. 25°C, 4500 x g, für 15 min. Der Überstand enthielt die DNA.

3.1.6 Fällung genomischer DNA mit Ethanol

Die DNA-Fällung erfolgte durch Zugabe von zwei Volumina 70 %igem Ethanol zur wässrigen DNA-Lösung (siehe Abschnitt 3.1.5), wobei die genomische DNA als Knäuel ausfiel. Die DNA wurde in 70 %igem Ethanol gewaschen, bei RT getrocknet und in TE-Puffer aufgenommen.

3.1.7 Konzentrations- und Reinheitsbestimmung der DNA

Die Konzentration der Nukleinsäure-Lösungen wurde photometrisch bestimmt. Die Plasmid-DNA wurde mit TE-Puffer 1:500, die genomische DNA 1:300 verdünnt und die Extinktionen dieser Verdünnungen bei 260 nm und 280 nm (OD_{260} und OD_{280}) gegen TE-Puffer als Blindwert bestimmt.

Nach Sambrook *et al.* 1989 gilt folgender Richtwert für dsDNA (Sambrook and Gething, 1989):

$OD_{260} \times 0,05 \times \text{Verdünnung}$ entspricht der DNA Konzentration in µg/µL,

der *Quotient aus OD_{260} zu OD_{280}* von über 1,8 zeigt an, das die DNA-Lösung frei von Proteinen ist.

3.1.8 Spaltung der Plasmid-DNA mit Restriktionsendonukleasen

Zum Nachweis der DNA-Fragmente wurden die Plasmide mit unterschiedlichen Restriktionsendonukleasen (*Bam*HI oder *Eco*RI) behandelt. Die Reaktionen wurden auf ein Volumen von

20 µL angesetzt und für 1 h bei 37°C inkubiert. Je Ansatz wurde 1 µg Plasmid-DNA, 1 U Enzym, 10 mg/mL BSA und die vom Hersteller empfohlenen Puffer verwendet. Die Enzyme wurden anschließend durch Hitze (75°C für 10 min) inaktiviert.

3.1.9 DNA-Agarosegel-Elektrophorese

Die DNA-Agarosegel-Elektrophorese wurde mit 1-2 %igen Agarosegelen und TAE-Puffer durchgeführt. Die DNA-Proben wurden mit DNA-Probenpuffer (Endkonz. 1x) versetzt und gemeinsam mit einem DNA-Marker, mit Fragmenten bekannter Größe, auf ein Gel aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte bei 130 V und einer Zeitspanne von 20 bis 90 min. Anschließend wurden die Gele ca. 20 min im Ethidiumbromidbad geschwenkt und die DNA-Fragmente bei einer Wellenlänge von 254 nm detektiert.

3.2 Zellkulturtechniken

3.2.1 Kultivierung der Zelllinien

Die Kultivierung der adhärent wachsenden Zelllinien erfolgte in beschichteten Zellkulturschalen. Als Nährsubstrat dienten die unter Abschnitt 2.5 aufgeführten Medienzusammensetzungen. Die Abschätzung des Dichtegrades der Zellen erfolgte am Mikroskop. Hierbei wurden die Zellen unter subkonfluenten Bedingungen passagiert. Um die Ablösung der Zellen einzuleiten, wurden diese nach Entfernung des Mediums mit PBS sowie Trypsin-EDTA-Lösung gespült und anschließend für 2 - 5 min mit Trypsin-EDTA-Lösung bei 37°C bis zur vollständigen Ablösung inkubiert. Die Teilung der Zellen erfolgte je nach Bedarf im Verhältnis von 1:2 bis 1:10.

In Suspension wachsende Zellen wurden in unbeschichteten Zellkulturschalen mit RPMI als Nährsubstrat kultiviert (Abschnitt 2.5). Zur Vermehrung wurden diese Zellen zunächst durch resuspendieren vereinzelt, mit frischem Medium je nach Bedarf 1:2 bis 1:10 verdünnt und in neue Zellkulturschalen überführt.

Die Kultivierung aller Zelllinien erfolgte bei einer Temperatur von 37°C, einem CO₂-Gehalt von 5 % und sowie einer Luftfeuchte von 95 %.

3.2.2 Einfrieren und Auftauen von Zelllinien

Zur langfristigen Lagerung von Zelllinien wurden diese geerntet, durch Zentrifugation pelletiert (300 x g, 5 min, RT), in Einfriermedium aufgenommen und in spezielle Einfrier-
röhrchen überführt. Anschließend wurden die Zellen in Isopropanol gefüllte Behälter

überführt, ü. N. bei -80°C langsam eingefroren und danach in flüssigem Stickstoff gelagert. Zur kurzfristigen Aufbewahrung konnten Zellen bei -80°C deponiert werden.

Zum Auftauen der Zellen wurden diese zügig im Wasserbad erwärmt, in 10 mL erwärmtes vorgelegtes Medium überführt, pelletiert und in frischem Nährmedium resuspendiert und ausgesät.

3.2.3 Isolierung und Kultivierung der Lymphozyten aus Vollblut

Die erhaltene Blutprobe (20 mL in Lithium-Heparin-Röhrchen) wurde resuspendiert, in ein 50 mL-Falcon überführt und mit PBS 1:2 verdünnt. In einem weiteren 50 mL Falcon wurden 10 mL Ficoll vorgelegt und langsam mit dem Vollblut/PBS-Gemisch überschichtet. Dieses Zwei-Phasen-Gemisch wurde für 30 min, bei $600 \times g$ und RT (Bremsen bei allen Zentrifugationsschritten mit der Multifuge 1_{S-R} auf 1 gestellt) zentrifugiert. Nach der Zentrifugation ergab sich, das in Abb. 10 dargestellte Verteilungsmuster. Das Serum wurde weitestgehend entfernt und die Lymphozyten in ein neues 50 mL Falcon überführt und mit PBS auf 40 mL aufgefüllt. Mit den folgenden Zentrifugations- und Waschschrritten wurde der Großteil der Thrombozyten entfernt. Dafür wurde die Zellsuspension zentrifugiert ($350 \times g$, 10 min, RT), der trübe Überstand verworfen und das Zellsediment erneut mit PBS resuspendiert und zentrifugiert ($160 \times g$, 10 min, RT). Im letzten Waschschrritt wurde das Zellpellet erneut in PBS resuspendiert und 10 min, bei $300 \times g$ zentrifugiert. Die Zellen wurden in Medium aufgenommen und mit einer Konzentration von 2×10^6 Zellen in 6-Well-Platten ausgesät. Die Kultivierung der Zellen erfolgte für 72 h in dem Nährmedium *Quantum PBL* mit 2 % Phytohaemagglutinin (PHA).

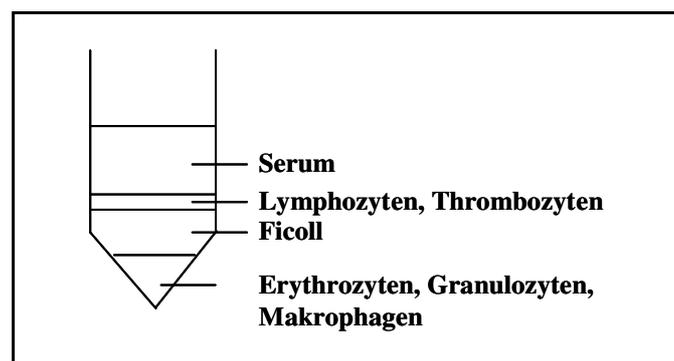


Abb. 10 Isolierung der Lymphozyten
Schematische Darstellung der Trennschichten nach Dichtezentrifugation mittels Ficoll

3.2.4 Kultivierung der primären Zellen aus Brusttumorgewebe

3.2.4.1 Isolierung der primären Zellen aus Brusttumorgewebe

Am Tag der Tumorentnahme wurde das Probenmaterial sofort bearbeitet. Das Fettgewebe wurde vom Tumor getrennt und beides unter sterilen Bedingungen mit dem Skalpell in 1-3 mm³ kleine Stückchen geschnitten und je nach Größe des Ausgangstumors in mehrere 25 cm² Zellkulturflaschen mit Primaria-Beschichtung von BD ausgesät. Die Hälfte der Flaschen wurde mit jeweils 8 mL Medium für primäre Zellen aus Brusttumorgewebe (siehe 2.5 Nährmedien) oder mit *Mammary Cell Growth Media* von Promocell versetzt. Die kleinen Tumorstückchen wurden intensiv in dem jeweiligen Medium resuspendiert, um die Auslösung der Zellen zu begünstigen. Nach 6-8 Tagen erfolgte der erste Mediumwechsel, bei dem die Hälfte des Mediums sowie der Tumorstückchen in neue Zellkulturflaschen ausgesät und mit frischem Medium aufgefüllt wurden. Bei allen folgenden Medienwechseln wurde nur die Hälfte des Mediums durch frisches ersetzt, um mögliche zelleigene wachstumsfördernde Substanzen im Medium zu belassen. Die Epithelzellen wuchsen bevorzugt im Medium für primäre Zellen aus Brustgewebe an, wurden jedoch schnell von Fibroblasten überwachsen oder zeigten nach einigen Wochen Anzeichen von Seneszenz, wie Vakuolisierung der Zellen, Schaumbildung oder Ablösung der Plaques von der Zellkulturflasche. Sobald Epithelzellplaques in diesem Medium angewachsen waren, wurde auf *Mammary Cell Growth Media* von Promocell umgestellt, um das Fibroblastenwachstum und das Einleiten der Seneszenz der Epithelzellen zu verzögern. Fibroblasten und EMT-Zellen wurden weiter in dem Medium für primäre Zellen aus Brustgewebe kultiviert.

3.2.4.2 Trypsinierung reiner Fibroblasten und EMT-Zellkulturen

Ab einer Konfluenz von 80-90 % wurden die Fibroblasten und EMT-Zellen 1:2, später bis 1:6 passagiert. Das Medium und die Tumorstückchen wurden vorsichtig entfernt und die Zellen mit PBS und Trypsin/EDTA-Lösung gespült. Die Inkubation mit Trypsin/EDTA-Lösung erfolgte bei 37°C für 2-5 min. Durch sanftes Klopfen an den Zellkulturflaschenrand konnte die Trypsinierungsreaktion zusätzlich beschleunigt werden. Nach dem vollständigen Ablösen der Zellen wurde die Trypsinreaktion mit FBS-haltigem Medium abgestoppt und die Zellen nach Bedarf neu ausgesät.

3.2.4.3 Trypsinierung reiner Epithelzellkulturen

Ab einer Konfluenz von mindestens 80 % wurden die primären Epithelzellen unter Verwendung des *DetachKits* von Promocell 1:2 passagiert. Medium sowie Tumorstückchen

wurden entfernt und die Zellen mit HEPES-BSS-Puffer (Bestandteil des *DetachKits* von Promocell) gespült. Die Zellen wurden anschließend für 7-10 min bei RT mit Trypsin-EDTA-Lösung (Bestandteil des *DetachKits* von Promocell) inkubiert. Um die Trypsinreaktion rechtzeitig abzustoppen, wurde das Ablösungsverhalten der Zellen unter dem Mikroskop beobachtet. Sobald sich über die Hälfte der Zellen von der Oberfläche abgekugelt hatten, wurde durch Zugabe des TNS-Substrats (Bestandteil des *DetachKits* von Promocell) die Trypsinreaktion beendet, die Zellsuspension in ein Falcon überführt und zentrifugiert (300 x g, 5 min, RT). Das Zellpellet wurde in frischem Medium resuspendiert und die Zellen in Zellkulturflaschen ausgesät.

3.2.4.4 Differentielle Trypsinierung

Unterschiedliche Hafteigenschaften der Zellen an die beschichteten Oberflächen ermöglichen eine Trennung von Zellgemischen, wie Epithelzellen und Fibroblasten, durch kontinuierliche Verlängerung der Inkubationszeit mit Trypsin. Medium und Tumorstückchen wurden aus der entsprechenden Zellkulturflasche entfernt und Medienrückstände durch einen Waschschrift mit PBS beseitigt. Das Zellgemisch wurde für 30 s (1 min, 1,5 min) mit Trypsin bei RT inkubiert und anschließend mit Medium versetzt. Durch vorsichtiges Spülen der Oberfläche wurden die sich lösenden Fibroblasten im Medium aufgenommen und auf neue Zellkulturflaschen überführt. Die in der Zellkulturflasche verbliebenen Epithelzellen wurden weiter kultiviert und falls nötig erneut durch differentielle Trypsinierung von Fibroblasten getrennt. Aufgrund der Ähnlichkeiten in Morphologie und Adhäsionseigenschaften zwischen EMT-Zellen und Fibroblasten war die differentielle Trypsinierung zur Trennung dieser Zellarten nicht geeignet.

3.2.4.5 Trennung von Zellgemischen durch Positivselektion

Die Separierung von Zelltypen mittels Positivselektion beruht auf dem Prinzip der Antigen-Antikörper-Reaktion. Jede Zelloberfläche ist gekennzeichnet durch spezifische Antigenstrukturen, die durch Antikörper (gekoppelt an superparamagnetische Kügelchen) erkannt werden. Die positiven Antikörper-gebundenen Zellen wurden immunomagnetisch isoliert, aufkonzentriert und weiter kultiviert.

Das zu trennende Zellgemisch wurde geerntet, pelletiert (300 x g, 5 min, RT) und in Waschpuffer resuspendiert. Nach der Bestimmung der Zellzahl wurde die Suspension erneut zentrifugiert und anschließend auf eine Konzentration von maximal 5×10^7 Zellen/300 μ L Waschpuffer eingestellt. Zur Maskierung unspezifischer Bindungsstellen wurde 100 μ L *FcR Blocking Reagent* zugesetzt. Die Inkubation mit den *Human Epithelial Antigen (HEA)*

MicroBeads erfolgte für 15-30 min bei RT. Diese mit superparamagnetischen Kügelchen gekoppelten Antikörper binden an Zellen, die das epitheliale-Antigen exprimieren, d.h. an humane Epithel- und EMT-Zellen. Um den im Überschuss zugesetzten Antikörper zu entfernen, wurde die Zell-Antikörper-Suspension in 10 mL Waschpuffer überführt und zentrifugiert (300 x g, 5 min, RT). Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 1 mL Waschpuffer resuspendiert. Die Auftrennung der Zellen erfolgte über Säulen in einem magnetischen Feld. Hierfür wurden die Säulen mit der Zellsuspension geladen. An *HEA-Micro-Beads* gebundene Zellen verblieben im Magnetfeld der Säule, während die Fibroblasten die Säule ungehindert durchflossen. Durch mehrere Waschschritte wurden alle nicht gebundenen Zellen ausgeschwemmt. Anschließend wurde die Säule aus dem magnetischen Feld entfernt und die an *HEA-Micro-Beads* gebundenen Zellen eluiert. Die so getrennten Zellpopulationen wurden zentrifugiert und entsprechend der Zellausbeute auf Zellkulturflaschen ausgesät.

3.2.5 Zellzahl- und Vitalitätsbestimmung der Zellen

Zur Bestimmung von Zellzahl und Vitalität wurde der Trypan-Ausschlusstest verwendet. Das Prinzip beruht darauf, dass der Farbstoff nur durch geschädigte Membranen abgestorbener Zellen hindurchdringt und das Zytoplasma blau verfärbt. Vitale, gesunde Zellen schimmern durchsichtig. Zur Bestimmung von Zellzahl und Vitalität wurden die Zellsuspension und die Trypanblau-Solution im gleichen Verhältnis gemischt und auf eine geeichte Neubauer-Zählkammer aufgetragen. Bei 10-facher Vergrößerung wurden lebende und tote Zellen unter dem Mikroskop getrennt erfasst, indem mindestens zwei der vier Großquadrate ausgezählt wurden. Zellzahl und Vitalität wurden nach folgenden Gleichungen berechnet.

Gleichung 1: Bestimmung der Zellzahl/mL Zellsuspension

$$\text{Zellzahl / mL} = \frac{\text{Zellzahl}}{\text{Großquadrat}} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4$$

Gleichung 2: Bestimmung der Zellvitalität

$$\text{Vitalität [\%]} = \frac{\text{ungefärbte Zellen / Großquadrat}}{\text{Gesamtzellzahl / Großquadrat}} \times 100$$

3.2.6 Transfektion von humanen Zellen

3.2.6.1 Transfektion der Suspensionszellen durch Elektroporation

Bei dieser Methode werden die Zellen kurzfristig einem elektrischen Feld ausgesetzt, das zum Verlust der Semipermeabilität der Zellmembran führt. Für einige Millisekunden entstehen

mikroskopisch kleine Löcher durch die ein Transport von Molekülen, wie DNA oder RNA (*Ribonucleic acid*) in die Zelle möglich ist.

Je Ansatz wurden zunächst 30 µg DNA-Plasmid-Mix (10 µg pCMV-I-SceI, 10 µg pBS, 10 µg DSBR-Plasmid) in einer Küvette vorgelegt. Anschließend 5×10^6 Zellen in 400 µL kaltem Medium resuspendiert und ebenfalls in die Küvette gegeben. Durch mehrfaches auf- und abpipettieren wurde der Ansatz gut durchmischt. Die Elektroporation erfolgte mit dem *Gene Pulser® mit Pulse Controller* bei 240 V und 1050 µF. Anschließend wurden die Zellen in 6-Well-Platten ausgesät, mit frischem Nährmedium versorgt und 24 h im Brutschrank inkubiert. Die Elektroporation ist ein schnelles und kostengünstiges Verfahren um Zellen mit DNA-Plasmiden zu transfizieren. Aufgrund der hohen Toxizitätsrate von 30-80 % und der Tatsache, dass eine große Menge an Zellen für eine hohe Transfektionseffizienz notwendig ist, war diese Methode für die Verwendung von adhärenenten Zelllinien bzw. empfindlichen primären Zellkulturen ungeeignet.

3.2.6.2 Transfektion der adhärenenten Brustkrebszellen durch Nukleofektion

Bei diesem Verfahren handelt es sich um eine Kombination aus Elektroporation und Lipofektion, bei der die DNA- bzw. RNA-Moleküle sehr schnell und schonend von den Zellen aufgenommen werden.

Je Ansatz wurden $0,5 - 1 \times 10^6$ Zellen für 5 min bei 300 x g zentrifugiert und in 100 µL Nukleofektorlösung (*Cell Line Nucleofector Kit V*) aufgenommen. Nach Zugabe von 5-10 µg DNA- bzw. DNA-RNA-Plasmid-Mix wurde durch mehrfaches resuspendieren die Zellsuspension gemischt, in eine Küvette überführt und mit dem Programm S-28 mit dem *Amaxa Nucleofector I* bzw. *II* transfiziert. Die Zellen wurden anschließend in 6-Well-Platten ausgesät, mit frischem Medium versorgt und im Brutschrank bis zur weiteren Behandlung inkubiert.

3.2.6.3 Transfektion der primären Epithelzellen, EMT-Zellen und Fibroblasten aus Brusttumorgewebe durch Nukleofektion

Je Ansatz wurden $0,5 \times 10^6$ Zellen für 5 min bei 300 x g zentrifugiert und in 100 µL Nukleofektorlösung (*Cell Line Nucleofector Kit V*) aufgenommen. Nach Zugabe von 5 µg DNA-Plasmid-Mix wurde durch mehrfaches resuspendieren die Zellsuspension gemischt, in eine Küvette überführt und mit dem Programm S-28 mit dem *Amaxa Nucleofector I* bzw. *II* transfiziert. Die Zellen wurden anschließend in 6-Well-Platten ausgesät, mit frischem Medium versorgt und im Brutschrank für 24 h inkubiert.

3.2.6.4 Transfektion der primären Lymphozyten aus dem Blut durch Nukleofektion

Je Ansatz wurden 1×10^6 Zellen für 5 min bei 300 x g zentrifugiert und in 100 μ L Nukleofektorlösung (*Human B Cell Nucleofector Kit*) aufgenommen. Nach Zugabe von 10 μ g DNA-Plasmid-Mix wurde durch mehrfaches resuspendieren die Zellsuspension gemischt, in eine Küvette überführt und mit dem Programm U-15 mit dem *Amaya Nucleofector I* bzw. *II* transfiziert. Die Zellen wurden anschließend in 800 μ L Transfektionsmedium für primäre Lymphozyten aufgenommen und in 24-Well-Platten ausgesät. Nach 4 h wurden 200 μ L einer 10 %ige PHA-Medium-Lösung zugesetzt, um das Wachstum der Lymphozyten zu stimulieren (Endkonzentration: 2 %PHA). Insgesamt wurden die primären Lymphozyten nach Transfektion 24 h im Brutschrank inkubiert.

3.2.7 Durchflusszytometrie

Das Prinzip der Durchflusszytometrie basiert auf der Streuung von Lichtsignalen, wenn die Zelle einen Laserstrahl (hier Argon-Laser mit 488 nm) passiert. Das gestreute Licht kann mittels Detektoren nachgewiesen werden und gibt Auskunft über Größe und Granularität der Zelle. Durch die Verwendung von Fluoreszenzfarbstoffen können weitere Zelleigenschaften untersucht werden. Die Lichtsignale werden in Graphen dargestellt und ermöglichen die Analyse der Zelleigenschaften.

3.2.7.1 DSBR-Messung (EGFP) am Durchflusszytometer

Für die Erfassung der DSBR-Daten wurden die Zellen 24 h nach Transfektion geerntet, pelletiert, in PBS resuspendiert und anschließend erneut sedimentiert. Die Zellpellets wurden auf Eis gelagert und erst kurz vor der Messung am Durchflusszytometer FACSCaliburTM der Fa. Becton Dickinson in PBS (mit 0,2 % EDTA versetzt) resuspendiert. Diese Suspension wurde in FACS-Rundbodenröhrchen überführt und die Fluoreszenzen der Zellen am Durchflusszytometer detektiert. Um eine Trennung zwischen lebenden und toten Zellen zu erreichen, wurden die Zellwolken in einem *Dot-Plot*-Diagramm linear gegen FSC-/SSC-Ausrichtung dargestellt und in die Mitte des Diagramms gezogen. Abhängig von Zellgröße- und -granularität wurden die lebenden Zellen von Zelltrümmern und toten Zellen unterschieden. Durch das Legen eines Markers (*Gate*) um die „lebende Zellwolke“ konnten die Zelltrümmer und toten Zellen von der weiteren Analyse ausgeschlossen werden (Abb. 11).

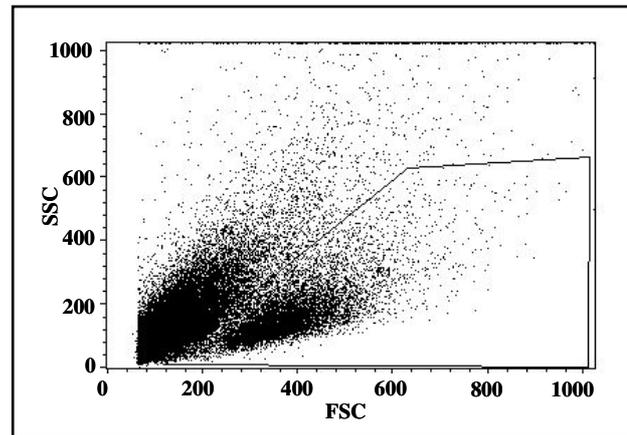


Abb. 11 *Dot-Plot-Diagramm am Durchflusszytometer mit linearer Ausrichtung von FSC/SSC*

Die FSC-Ausrichtung (Vorwärtsstreuung) gibt einen Anhaltspunkt über die Zellgröße, während SSC-Ausrichtung (Seitwärtsstreuung) die Granularität oder interne Komplexität der Zellen beschreibt. Dabei kann zwischen lebenden und toten Zellen unterschieden und zukünftige Auswertungen auf eine bestimmte Zellpopulation ausgerichtet werden. In diesem Fall wurden die toten Zellen ausgeschlossen, indem die lebende Zellpopulation durch ein *Gate* markiert und für weitere Analysen ausgewählt wurde.

Anschließend wurde die ausgewählte Zellpopulation in einem weiteren *Dot-Plot-Diagramm* mit FL-1/FL-2-Ausrichtung abhängig von ihren Fluoreszenzeigenschaften (FL-1 für Grünfluoreszenz, FL-2 für orange Eigenfluoreszenz) getrennt (Abb. 12). Je Ansatz wurden 50.000 bis 100.000 lebende Zellen analysiert. Die Berechnung der DSBR-Frequenzen ergab sich aus zwei Teilschritten. Zunächst wurde der Anteil grün fluoreszierender Zellen innerhalb der lebenden Zellpopulation ermittelt und im Weiteren erfolgte eine Korrektur der Werte hinsichtlich der Transfektionseffizienz der Zelllinien mit p5bPuro-CMV-wtEGFP als Positivkontrolle.

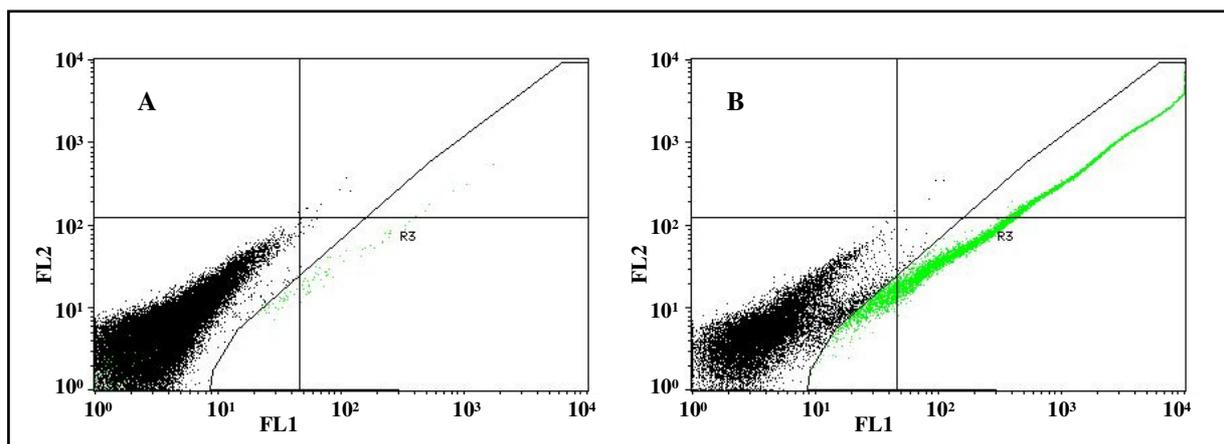


Abb. 12 *Dot-Plot-Diagramme mit logarithmischer FL1 / FL2-Ausrichtung zur Ermittlung von DSBR-Ereignissen*

Die Darstellung der EGFP-Fluoreszenz der transfizierten Zellen erfolgte in einem weiteren *Dot-Plot-Diagramm* mit logarithmischer Ausrichtung. Mit einem *Gate* wurden Zellen anhand ihrer Fluoreszenzeigenschaften voneinander getrennt. Die grün (EGFP) und orange (Eigenfluoreszenz) leuchtenden Zellen wurden parallel erfasst und die Anzahl grün fluoreszierender Zellen prozentual zur Gesamtzellzahl errechnet. **A**) zeigt beispielhaft die Anzahl an grün fluoreszierenden Zellen nach Transfektion mit dem DSBR-Plasmid HR-EGFP/3'-EGFP, während die **B**) die Positivkontrolle nach Transfektion mit p5bPuro-CMV-wtEGFP dargestellt.

3.2.7.2 *Einparametrische Zellzyklusanalyse (DNA-Gehalt-Bestimmung nach Propidiumiodid-Färbung)*

Das Prinzip der Zellzyklusanalyse basiert auf der Einlagerung von Propidiumiodid zwischen den Basen der DNA. Anhand der unterschiedlichen Fluoreszenzintensitäten der Zellen kann der DNA-Gehalt und damit der Anteil der Zellpopulationen in der G0/G1-, S- und G2/M-Phase ermittelt werden.

Für die Zellzyklusanalyse wurden je Ansatz 10^6 Zellen geerntet, pelletiert und mit PBS gewaschen. Das Zellsediment wurde anschließend in 1 mL PBS resuspendiert und auf einem Vortexer bei 400 rpm / min tropfenweise mit 9 mL eiskalter Fixierlösung versetzt. Die fixierten Zellen wurden 15 min auf Eis inkubiert und mindestens 1 h bei -20°C gelagert. Im weiteren Verlauf wurden die Zellen mit 1:1 Fixierlösung / PBS und anschließend mit PBS gewaschen. Die rehydrierten Zellen wurden pelletiert, mit 0,3 – 0,5 mL PI-Färbelösung zur Zellzyklusanalyse resuspendiert und dann für 30 min im Dunkeln bei 37°C inkubiert. Die Messung und Auswertung erfolgte am Durchflusszytometer FACSCaliburTM der Fa. Becton Dickinson.

Zur Auswertung wurden die Zellen zunächst in einem zur PI-Detektion geeigneten Fluoreszenzkanal FL-2 als *Dot-Plot*-Diagramm dargestellt, in dem FL2-A (Fläche) gegen FL2-W (Weite) linear gegeneinander aufgetragen wurde. Über diese Art der Darstellung konnten die Dubletten diskriminiert werden, indem die Region unter einer imaginären Diagonalen, die durch den Nullpunkt führt und das Diagramm halbiert, auf der Seite des Weitensignals (FL-2W) für die Analyse ausgegrenzt wurde. Dubletten sind nicht vollständig separierte Zellen, welche vom Durchflusszytometer als eine Zelle erkannt werden, wodurch „falsche“ DNA-Mengen detektiert werden. Die selektierte, singuläre Zellpopulation konnte markiert und eingegrenzt werden. Für alle weiteren Zellzyklusanalysen wurden nur singuläre Zellen betrachtet und deren Fluoreszenzintensitäten (FL3-H) linear in einem Histogramm-Fenster der entsprechenden Zellzahl gegenübergestellt. Die quantitative Analyse der Zellen, erfolgte durch die *Software CellQuest Pro* in der Weise, dass die singuläre Zellpopulation anhand der unterschiedlichen Fluoreszenzintensitäten in G0/G1-, S- und G2M-Phase unterteilt werden konnten (Abb. 13).

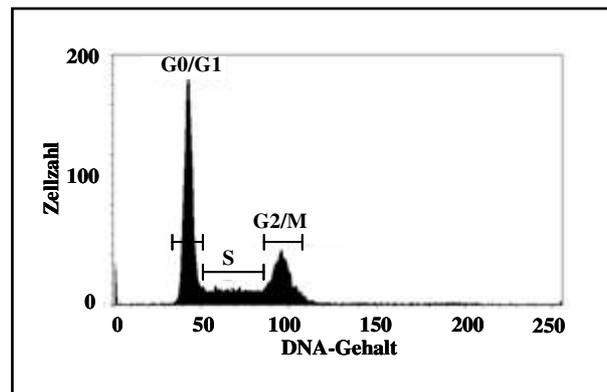


Abb. 13 Zellzyklusphasen im DNA-Histogramm

Der Zellzyklus der Zellen wurde durch Propidiumiodid-Färbung der DNA am Durchflusszytometer ermittelt. Die Zellzyklusstadien wurden über die Markierung von Subpopulationen im Histogramm definiert und quantifiziert. Die **G0-Phase** steht für ein Stadium der Zellen in dem sie sich nicht mehr teilen. Sie ist anhand ihres DNA-Gehaltes, ähnlich wie die G2-Phase von der M-Phase, nicht von G1 unterscheidbar. Die Phasen werden deshalb auch kollektiv als G2/M und G0/G1 bezeichnet. **G1-Phase:** Wachstumsphase der Zelle, Synthese von RNA und Proteinen, der DNA-Gehalt bleibt konstant bei $2n$ (50). **S-Phase:** DNA-Synthesephase, der DNA-Gehalt ändert sich in dieser Phase von $2n$ auf $4n$ (100). **G2-Phase:** Während die Zelle die Zellteilung vorbereitet, bleibt der DNA-Gehalt bei $4n$ (100). **M-Phase:** Hier findet die Mitose statt. Der DNA-Gehalt bleibt bei $4n$ (100), bis die Tochterzellen mit einem DNA Gehalt von je $2n$ (50) entstanden sind.

3.2.8 Immunfluoreszenzanalyse (γ -H2AX-Färbung)

Für die γ -H2AX-Färbung wurden die Zellen auf Deckgläschen ausgesät und 24 h mit 6 μ M Bleomycin/ddH₂O im jeweiligen Medium inkubiert. Anschließend wurde ein Teil der Zellen in Normalmedium überführt und weitere 24 h kultiviert. Die Fixierung der Zellen erfolgte direkt nach der Bleomycininkubation/ddH₂O sowie nach einer Reinkubationszeit von 24 h in Bleomycin-freiem Medium. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und mit 3,7 %igem Formaldehyd für 10 min bei RT fixiert. Die Permeabilisierung der fixierten Zellen erfolgte durch Inkubation mit 0,5 %igem kaltem Triton X-100 für 7 min auf Eis. Die Absättigung unspezifischer Bindungsstellen wurde durch eine Inkubation mit 5 %igem BSA-Puffer für 90 min bei RT erreicht. Die Präparate wurden jeweils nach der Fixierung, der Permeabilisierung und der Absättigung der Bindungsstellen dreimal für jeweils 5 min mit PBS gewaschen. Die Deckgläschen wurden mit 25 μ L eines Primär-Antikörpers spezifisch für phosphoryliertes H2AX (1/1000 verdünnt in 5 % Ziegen-Serum) für 1 h bei 37°C im Brutschrank bei einer Luftfeuchte von 95 % inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS für jeweils 5 min erfolgte die Inkubation mit dem Sekundär-Antikörper Alexa-555 (1/1000 in PBS verdünnt) für 30 - 45 min bei 37°C und einer Luftfeuchte von 95 %. Nach einmaligem Waschen mit PBS erfolgte eine weitere Inkubation der Zellen mit DAPI (1:5000 in PBS verdünnt) für 5 min bei RT. Anschließend wurden die Deckgläschen zweimal mit PBS und abschließend mit ddH₂O für jeweils 5 min gewaschen und auf Objektträger mit Mowiol-DABCO-Gemisch befestigt. Über Nacht ausgehärtet konnten die Präparate mit dem

Fluoreszenzmikroskop Olympus BX51 und der *Software Cell^F 2.5* ausgewertet werden (Abb. 14). Dafür wurden die Zellen fotografiert, die Zellkerne mit der *Software Cell^F 2.5* durch Marker umrandet und die Foci in der Region entsprechend zuvor festgelegter Schwellwerte ausgezählt.

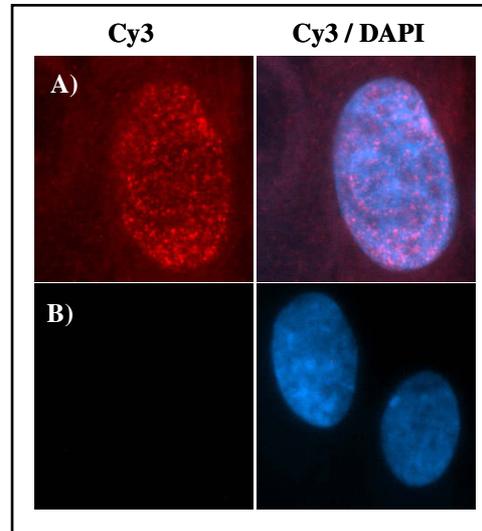


Abb. 14 Immunfluoreszenzanalyse mit Primärantikörper spezifisch für γ H2AX

Primäre Zellen aus Brusttumorgewebe wurden auf Deckgläsern ausgesät und 24 h **A)** mit Bleomycin (6 mU) oder **B)** mit ddH₂O (als Negativkontrolle) kultiviert und mit Formaldehyd fixiert. γ H2AX wurde mit dem Antikörper (AB3369) von Chemicon (1:1000) und dem Sekundär-Antikörper Alexa-Fluor-555 (A21434) (1:1000) rot markiert, die DNA mit DAPI blau gefärbt. Die Bilder wurden unter Verwendung der Filter: U-MNG2 (Cy3-Filter) und U-MNU2 (DAPI-Filter) aufgenommen und mit der *Software Cell^F 2.5* überlagert und ausgewertet.

3.2.9 Immunhistochemie (IHC)-Analyse

Die IHC dient der Identifikation und Klassifizierung von Gewebearten. Morphologisch nicht unterscheidbare Gewebe- oder Zellarten können entsprechend ihres Antigenmusters klassifiziert werden, daher spielt die IHC in der Tumordiagnostik eine wichtige Rolle. In der vorliegenden Arbeit wurde die IHC zur Einteilung der primären Zellen in Epithelzellen, EMT-Zellen und Fibroblasten verwendet. Das Epithel besteht aus ein- oder mehrschichtigen Zellschichten, die alle inneren oder äußeren Körperoberflächen umschließen und je nach Organ unterschiedliche Funktionen ausweisen. Fibroblasten sind im Bindegewebe vorkommende Zellen mit mesenchymaler Herkunft. EMT (*Epithelial-mesenchymal transition*) bezeichnet den Übergang von Epithelzellen zu Zellen mit mesenchymalen Eigenschaften im Tumor. Durch Verlust der epithelialen Eigenschaften, d.h. der Verlust von Zellkontakten durch Herunterregulation des Adhäsionsproteins E-Cadherin, können die Zellen migrieren und die Basalmembran durchdringen (Kang and Massague, 2004).

Für die Unterscheidung der Zellarten wurden Anti-EMA (*Epithelial membrane antigen*), Anti-Cytokeratin 8/18 sowie Anti-Vimentin verwendet. EMA wurde für den Nachweis von

Epithelzellen verwendet. Cytokeratine gehören zur Gruppe der Intermediärfilamente und bilden das Zytoskelett der eukaryotischen Zellen. Derzeit sind 20 unterschiedliche Cytokeratin-Proteine bekannt, deren Verteilungsmuster sich in epithelialen Zellen stark unterscheidet. Cytokeratin 8/18 diente dem Nachweis von einschichtigem Epithel sowie luminaler Drüsenzellen und Anti-Vimentin für die Detektion mesenchymaler Zellen (Fibroblasten). Mit dieser Palette an Antikörpern war eine Zuordnung der einzelnen Zellkulturen mittels IHC-Färbung möglich. Je Färbetag wurden die Epithelzelllinien MCF7 und MCF12a als Kontrolle mitgeführt. Das Profil für die Charakterisierung der einzelnen Zellarten wurde in Tab. 5 zusammengestellt. Epithelzellen zeichneten sich durch den Nachweis von EMA und/oder Cytokeratin 8/18 aus, während Vimentin als mesenchymaler Marker kaum detektierbar war (Brozova *et al.*, 2007). Fibroblasten, als Zellen mesenchymalen Ursprungs, zeigten eine deutliche Farbreaktion nach Inkubation mit Anti-Vimentin, während EMA und Cytokeratin 8/18 nicht nachgewiesen werden konnten. EMT-Zellen, die morphologisch den Fibroblasten ähnelten wurden meist durch eine positive Farbreaktion von Cytokeratin 8/18 und Vimentin zugeordnet (Lee *et al.*, 2006; Rodriguez-Pinilla *et al.*, 2007; Vincent-Salomon and Thiery, 2003; Willipinski-Stapelfeldt *et al.*, 2005). In Abb. 15 wurden die unterschiedlichen Färbemuster der Kontrollzelllinien und primären Zellarten zusammengestellt.

Zellen	Anti-EMA	Anti-Cytokeratin 8/18	Anti-Vimentin
MCF7	positiv	positiv	negativ
MCF12a	positiv	positiv	negativ bis schwach positiv
Epithel	positiv	positiv	negativ bis schwach positiv
Fibroblasten	negativ	negativ	positiv
EMT-Zellen	negativ / positiv	positiv	positiv

Tab. 5 Charakteristika der IHC-Färbung

Der eindeutige Nachweis durch die Antikörper wurde mit „positiv“ deklariert. Konnte keine Farbreaktion detektiert werden, wurde die Farbreaktion als „negativ“ bezeichnet.

Für die IHC-Analyse wurden die Zellen dünn auf Objektträger mit vier Kammern ausgesät und 24 h kultiviert. Anschließend wurden die Objektträger zweimal mit PBS gewaschen, 10 min mit eiskaltem Methanol fixiert und getrocknet. Die so fixierten Zellen konnten mehrere Wochen bei -20°C gelagert werden. Für die Blockierung der endogenen alkalischen Phosphatase wurden die Zellen zunächst für 10 min in 20 %iger Essigsäure und anschließend 10 min in 2,28 %iger Natriumperjodat-Lösung inkubiert. Die Zellen wurden nach der Fixierung, der Essigsäure- und Natriumperjodat-Behandlung dreimal für jeweils 5 min mit TBS gewaschen. Für alle weiteren Inkubationsschritte wurden die Objektträger in einem dunklen feuchten Behälter deponiert. Die Blockierung des endogenen Biotins erfolgte mit

Hilfe des *Biotin/Avidin Blocking Kits*. Die vier Kammern eines jeden Objektträgers wurden mit einem Fettfilm umrandet und zunächst 15 min mit Avidin inkubiert. Nach einem Waschschrift mit TBS folgte die Inkubation mit Biotin für 15 min. Um weitere unspezifische Bindungsstellen zu blockieren, wurden die Kammern mit einer Proteinblockierungslösung für 30 min behandelt. Anschließend wurden die Präparate mit den spezifischen Antikörpern (Anti-EMA, Anti-Vimentin und Anti-Cytokeratin 8 / 18) über Nacht bei 4°C inkubiert. Als Negativkontrolle wurde eine Kammer mit Proteinblockierungslösung versetzt. Nach dreimaligem Waschen mit TBS wurden die Objektträger mit dem Sekundär-Antikörper für 20 min bei RT inkubiert und erneut dreimal mit TBS gewaschen. Die eigentliche Farbreaktion wurde durch Inkubation mit *Fast Red* ausgelöst. Dabei wurden einer Flasche *Fast Red* zwei Tropfen Levamisol zugesetzt und anschließend auf die Objektträger verteilt. Bei intensiver Rotfärbung der Zellen wurde die Farbreaktion nach wenigen Minuten mit TBS (mit 0,1 % Triton-X-100 versetzt) abgestoppt. Für die Anfärbung der Zellkerne wurden alle Präparate in 10 %iger Hämalaun-Lösung für 1-2 min inkubiert, 10 s in Ammoniakwasser (0,1 % Ammoniak) getaucht und dreimal mit frischem Wasser gewaschen. Abschließend wurden die Präparate auf einem weiteren Objektträger mit Aquatex eingebettet. Nach dem Aushärten des Einbettungsmediums konnten die Zellen am Fluoreszenzmikroskop Olympus BX51, ausgerüstet mit einer Digitalkammara, aufgenommen und visuell analysiert werden.

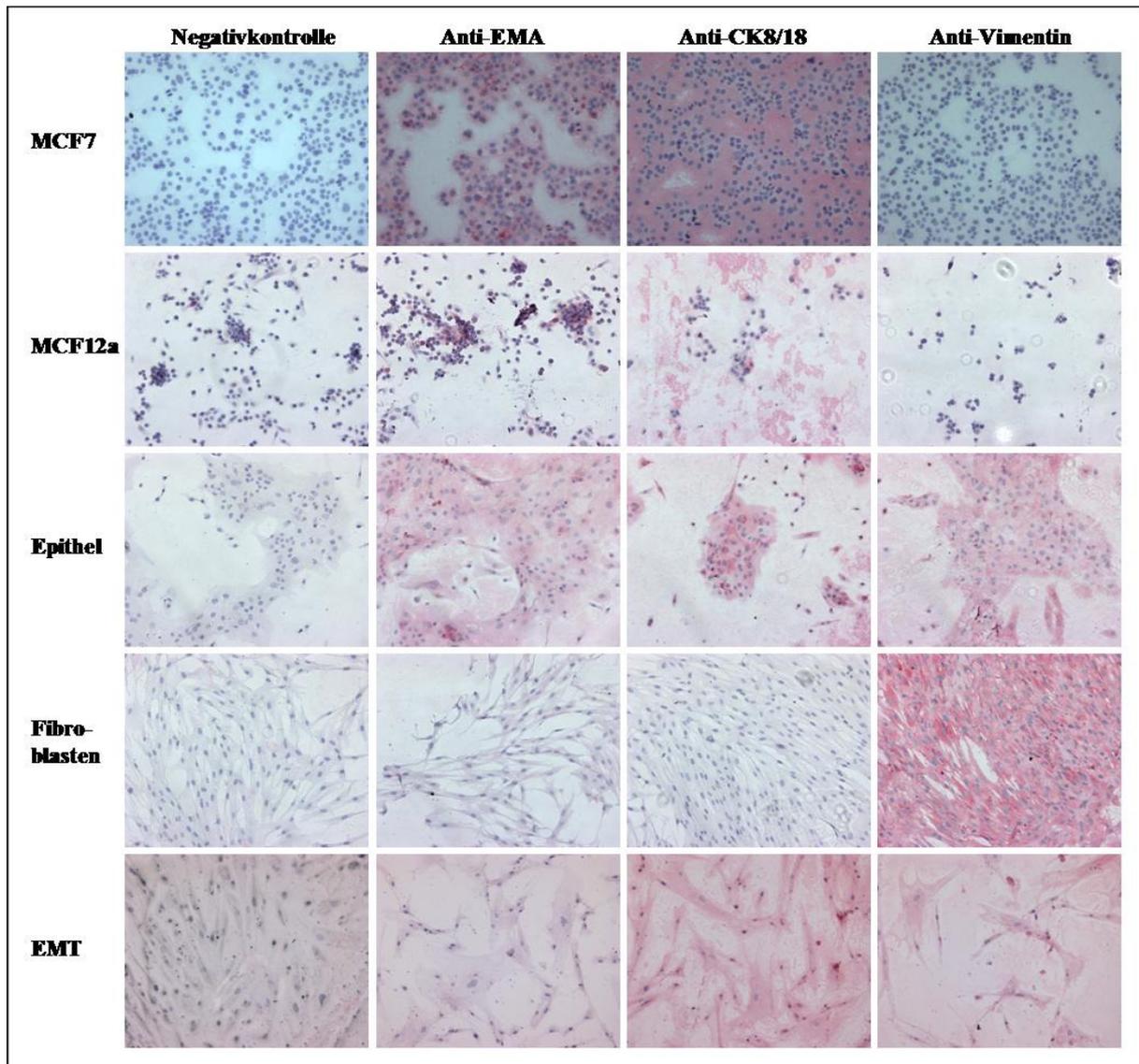


Abb. 15 IHC-Färbung der primären, aus Brusttumoren isolierten Zellen und Kontrollzelllinien MCF12a und MCF7 zur Eingruppierung der Zellkulturen in die Zellarten Epithelzellen, Fibroblasten und EMT-Zellen

Die primären Zellen/Kontrollzelllinien wurden am Tag der Transfektion auf Objektträger ausgesät, 24 h nach Aussaat mit Methanol fixiert und mit speziellen Antikörpern über Nacht inkubiert. Die Detektion der gebundenen primären Antikörper erfolgte mit *Fast Red* (Rotfärbung). Zellen wurden mit Proteinblock (Negativkontrolle), mit dem Antikörper Anti-EMA, mit Anti-Cytokeratin 8/18 und mit dem Antikörper gegen Vimentin inkubiert. Die Epithelzelllinien MCF7 und MCF12a wurden zur Kontrolle bei jeder IHC-Färbung mitgeführt. Anhand der IHC-Färbung war eine eindeutige Charakterisierung der Zellkulturen in Epithelzellen, Fibroblasten und EMT-Zellen möglich. Die Charakterisierung der Zellen erfolgte visuell am Mikroskop, in Abhängigkeit von der Farbreaktion (Rotfärbung) der Zellen, Vergrößerung: 10-fach

3.3 Proteinanalytische Methoden

3.3.1 Herstellung von Zelllysaten

Um bei der Herstellung von Zelllysaten die proteolytischen Abbauprozesse der Proteine zu verzögern wurden die Zellen sofort nach der Ernte auf Eis gelagert und alle weiteren Schritte unter kühlen Bedingungen vollzogen. Die Zellsuspensionen wurden in 15 mL Falcons überführt, zentrifugiert (300 x g, 5 min, 4°C), mit kaltem PBS gewaschen und erneut

sedimentiert. Nachdem der Überstand vollständig abgesaugt wurde, konnten die Zellen in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C für mehrere Wochen gelagert werden. Zum Zellpellet wurde das zweifache Volumen Zell-Lysepuffer für Proteinextraktion zugegeben, die Zellen resuspendiert und die Suspension in 1,5 mL Eppendorf-Tubes überführt. Nach einer Inkubationszeit von 30 min auf Eis wurden die Proben bei $16.000 \times g$ für 15 min und 4°C zentrifugiert und der proteinhaltige Überstand in ein neues vorgekühltes Eppendorf-Tube pipettiert. Die Zelllysate konnten bei -80°C gelagert werden. Optimal war jedoch eine sofortige Weiterverarbeitung der Proben, um Proteindegradation zu vermeiden.

3.3.2 Bestimmung der Proteinkonzentration (nach Bradford)

Aliquote der Zelllysate wurden 1:10 mit Zell-Lysepuffer für Proteinextraktion verdünnt. Parallel dazu wurde eine BSA-Standardreihe hergestellt für die ebenfalls der Zell-Lysepuffer für Proteinextraktion zur Verdünnung verwendet wurde. In Doppelbestimmungen wurden je $10 \mu\text{L}$ der BSA-Standardreihe (Bestandteil des *BCA Protein Assay Kits*) sowie der verdünnten Zelllysate in eine 96-Well-Platte pipettiert und mit $200 \mu\text{L}$ der Bradfordreagenz-Lösung (Bestandteil des *BCA Protein Assay Kits*) versetzt. Nach einer Inkubationszeit im Dunkeln von 30 min bei 37°C wurde der Proteingehalt colorimetrisch bestimmt. Die Messung des Farbstoff-Proteingemisches erfolgte bei einer Wellenlänge von 595 nm am Mikrotiterplatten-Photometer MRX. Die Proteinkonzentration der Proben wurde durch die BSA-Eichkurve mit dem Programm Magellan 3 berechnet.

3.3.3 Probenvorbereitung für die SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE)

Die Zelllysate wurden auf einen Proteingehalt von $60-90 \mu\text{g}/30 \mu\text{L}$ Probenvolumen eingestellt. Dafür wurden die Zelllysate mit 10 % DTT und einem 4 x LDS-Probenpuffer von Invitrogen versetzt und mit Zell-Lysepuffer für Proteinextraktion auf eine Endkonzentration von 1 x LDS-Probenpuffer verdünnt. Anschließend erfolgte die Denaturierung der Proben für 10 min bei 95°C . Diese Proben konnten bei -80°C aufbewahrt werden. Vor dem Auftragen auf ein SDS-Polyacrylamidgel wurden die Proben erneut erhitzt, gemischt und anzentrifugiert.

3.3.4 SDS-PAGE

Ein häufig genutztes System zur Trennung von Proteinen stellt die diskontinuierliche SDS-PAGE nach dem System von Laemmli dar, in dem ein großporiges Sammelgel einem engporigen Trenngel aufgelagert wird.

Zur Auftrennung der Proteine wurde ein 12 %iges Trenngel (pH 8,8; 1,5 M Tris, 0,4 % (w/v) SDS) sowie ein 4 %iges Sammelgel (pH 6,8; 0,5 M Tris, 0,4 % (w/v) SDS) verwendet, wobei das 12 %ige Trenngel die Separation von Proteinen mit einem Molekulargewicht zwischen 10 bis 60 kDa in den Minigelen ermöglichte. Zur Polymerisation wurden Mischungen aus einem Acrylamid/Bisacrylamid-Verhältnis von 37,5:1 mit je 150 µL 10 %iger APS-Lösung und 30 µL TEMED pro 45 mL Endvolumen versetzt.

Die Auftrennung der denaturierten Proteine erfolgte in Rotiphorese-Puffer von Roth im elektrischen Feld bei einer Stromstärke von 25 mA pro Minigel.

Eine Variation der SDS-PAGE stellt die Gradientengelelektrophorese dar, wobei das Gel einen unterschiedlichen, graduellen Acrylamidanteil aufweist und eine bessere Auflösung von sehr heterogenen Proteingemischen erzielt wurde. Zur Auftrennung der Proteingemische wurden Fertiggele der Firma Invitrogen mit einem 4-12 %igem Acrylamidanteil verwendet. Die Separation der Proteine erfolgte in MOPS-Puffer mit Antioxidanzien bei 100 V auf Eis. Als Größenstandards wurden vorgefärbte Proteine definierter Molekülmassen verwendet.

3.3.5 Transfer von Proteinen auf Membranen (Western-Blot)

Nach der SDS-PAGE erfolgte der Transfer der Proteine auf eine Nitrozellulose-Membran in einer Naßblotapparatur. Eine Transfereinheit bestand aus zwei übereinander gelagerten Filterpapieren gefolgt von der Nitrozellulosemembran, dem Gel und zwei weiteren Filterpapieren. Hierbei war es wichtig alle Luftblasen zu entfernen, da diese den Proteintransfer negativ beeinträchtigen. Proteine in 12 %igen Gelen wurden bei einer Spannung von 100 V, 1 h auf Eis transferiert, während die Proteine in Gradientengelen über Nacht bei 40 V im Kühlraum auf die Membranen transferiert wurden.

3.3.6 Immundetektion der Proteine auf dem Western-Blot mit Chemilumineszenzreaktion (ECL)

Mit der Immundetektion können Proteine auf Membranen durch spezifische Antigen-Antikörper-Reaktionen sichtbar gemacht werden. Um unspezifische Hintergrundreaktionen zu vermeiden, wurden vor der spezifischen Immunreaktion unspezifische Bindungsstellen auf der Blot-Membran durch Inkubation mit TBS-T-5 % MP-Puffer abgesättigt. Im Anschluss erfolgte die Inkubation mit dem jeweiligen Primärantikörper in TBS-T-5 % MP-Puffer für 1 h bei RT oder ü. N. bei 4°C. Dieser Antikörper bindet das spezifische Antigen auf der Blot-Membran. Nach Entfernung des im Überschuss zugesetzten, ungebundenen primären Antikörpers durch dreimaliges Waschen mit TBS-T-Puffer für jeweils 15 min erfolgte die Inkubation mit einem sekundären Antikörper gelöst in TBS-T-5 % MP-Puffer für 1 h bei RT.

Dieser an Peroxidase gekoppelte Antikörper bindet an den Primärantikörper. Nicht gebundener Antikörper wurde erneut durch dreimaliges Waschen mit TBS-T-Puffer entfernt. Das Prinzip der Chemilumineszenzreaktion beruht auf der Oxidation von Luminol durch Wasserstoffperoxid. Diese Reaktion wird von dem Enzym Peroxidase (an Sekundärantikörper gekoppelt) in alkalischer Lösung katalysiert. Das angeregte Luminolmolekül sendet Licht der Wellenlänge 428 nm aus und ruft somit eine Schwärzung auf dem Röntgenfilm hervor. Für die Chemilumineszenzreaktionen wurden *Super Signal® West Pico* oder *Super Signal West Dura Extended Duration* von Thermo scientific verwendet. Die Membran wurde zusammen mit dem Substrat in Frischhaltefolie eingeschweißt und 5 min inkubiert. Nach dem Entfernen des Substrates wurde die Membran erneut eingeschweißt und mit ECL-Hyperfilmen von Amersham in einer Filmkassette für 5 s bis 30 min inkubiert. Anschließend wurde der Film entwickelt.

4 ERGEBNISSE

4.1 Charakterisierung von DNA-Doppelstrangbruch-Reparatur (DSBR)-Defekten zur Identifizierung von erhöhtem Brustkrebsrisiko bei Frauen

Anhand einer Vielzahl von Studien konnte gezeigt werden, dass DSBR-Defekte wesentlich an der Entstehung von hereditärem und sporadischem Brustkrebs beteiligt sind. Keimbahnmutationen in Genen, die eine wichtige Rolle in der Reparatur von DSBen spielen, werden vor allem mit der Entstehung von hereditärem Brustkrebs in Zusammenhang gebracht. Mutationen in den Genen *BRCA1*, *BRCA2*, *PTEN* und *TP53* führen zu einem zehnfach erhöhten Brustkrebsrisiko, während Mutationen in den Genen *CHEK2*, *ATM*, *NBN*, *RAD50*, *FANCI* und *FANCD1* zu einem moderaten, zwei- bis vierfach erhöhten Risiko führen. Trotz dieser Erkenntnisse können nur ca. 30 % der hereditären Brustkrebserkrankungen durch die Identifikation dieser Gene erklärt werden. Weitere Zusammenhänge, die für die Entstehung von hereditärem Brustkrebs verantwortlich sind fehlen (Ralhan *et al.*, 2007; Szpirer and Szpirer, 2007; Walsh and King, 2007). Anhand dieser Erkenntnisse wurden im ersten Teil dieser Arbeit Muster an DSBR-Defekten ermittelt.

Zur Untersuchung der DSBR-Aktivitäten wurde das *EGFP*-basierte DSBR-Testsystem, beschrieben in Akyüz *et al.* 2002, verwendet. Dieses System erlaubt die Untersuchung unterschiedlicher DSBR-Mechanismen, unter Verwendung speziell angefertigter DSBR-Plasmide. Diese sind durch unterschiedlich mutierte *EGFP*-Gene und einer *I-SceI*-Erkennungssequenz gekennzeichnet. Die Spaltung dieser Erkennungssequenz mittels *I-SceI*-Meganuklease erlaubt je nach verwendetem DSBR-Plasmid die Untersuchung von Mikrohomologie-gerichtetem NHEJ, Homologie-gerichteter Reparatur (vorrangig SSA) und der konservativen HR. Erfolgreiche DNA-Reparatur-Ereignisse und damit verbunden die Rekonstitution von *wtEGFP* und Expression von EGFP-Protein in den Zellen führen zu grün fluoreszierenden Zellpopulationen, die am Durchflusszytometer detektiert werden können (Akyüz *et al.*, 2002). Um den Einfluss definierter Mutationen auf die DSBR zu untersuchen, wurden lymphoblastoide Zelllinien aus Patienten bzw. Probanden verwendet. Als Kontrollzelllinien ohne DSBR-Defekt dienten 416MI, GM02253F und HA169. Nach Ko-Transfektion der Zelllinien mit DSBR-Plasmiden und dem pCMV-*I-SceI* Expressionsplasmid wurden die Zellen 24 h kultiviert und der Anteil grün fluoreszierender Zellen am Durchflusszytometer ermittelt. Die erhaltenen Anteile wurden mit der Transfektionseffizienz für ein *wtEGFP* haltiges Plasmid korrigiert und so DSBR-Frequenzen für transfizierte Zellen

errechnet. Hierdurch wurden Unterschiede in Transfektionseffizienzen, transkriptionellen und translationalen Aktivitäten, in Wachstum und Zelltod rechnerisch ausgeglichen. Aus den resultierenden Werten wurden relative DSBR-Frequenzen ermittelt, indem die Werte auf die jeweilige Kontrollzelllinie bezogen und die Kontrollzelllinie anschließend als 100 % definiert wurde. Unterschiede im Proteinexpressionsmuster der Zelllinien wurden durch Western-Blot-Analysen detektiert (siehe Abschnitt 4.1.6). Hierbei erfolgte der Nachweis der in dieser Arbeit untersuchten DSBR-Faktoren, mit Ausnahme von Rad50. Für die in dieser Arbeit verwendete Zelllinie HA239 mit *RAD50*-Mutation hatten bereits Dörk und Mitarbeiter gezeigt, dass die Rad50-Expression sehr gering ist (Walters *et al.*, 2009).

Um auszuschließen, dass Zellzykluseffekte die ermittelten DSBR-Unterschiede zwischen Defekt- und Kontrollzelllinien verursachen, wurden parallel zu den DSBR-Messungen Proben für die Zellzyklusanalyse fixiert und später analysiert. Dafür wurde die DNA der Zellen mit Propidiumiodid angefärbt und die Anteile der Zellen in bestimmten Zellzyklusstadien am Durchflusszytometer bestimmt.

4.1.1 Detektion eines DSBR-Defektmusters in lymphoblastoiden Zelllinien mit verschiedenen *BRCA1*-Mutationen

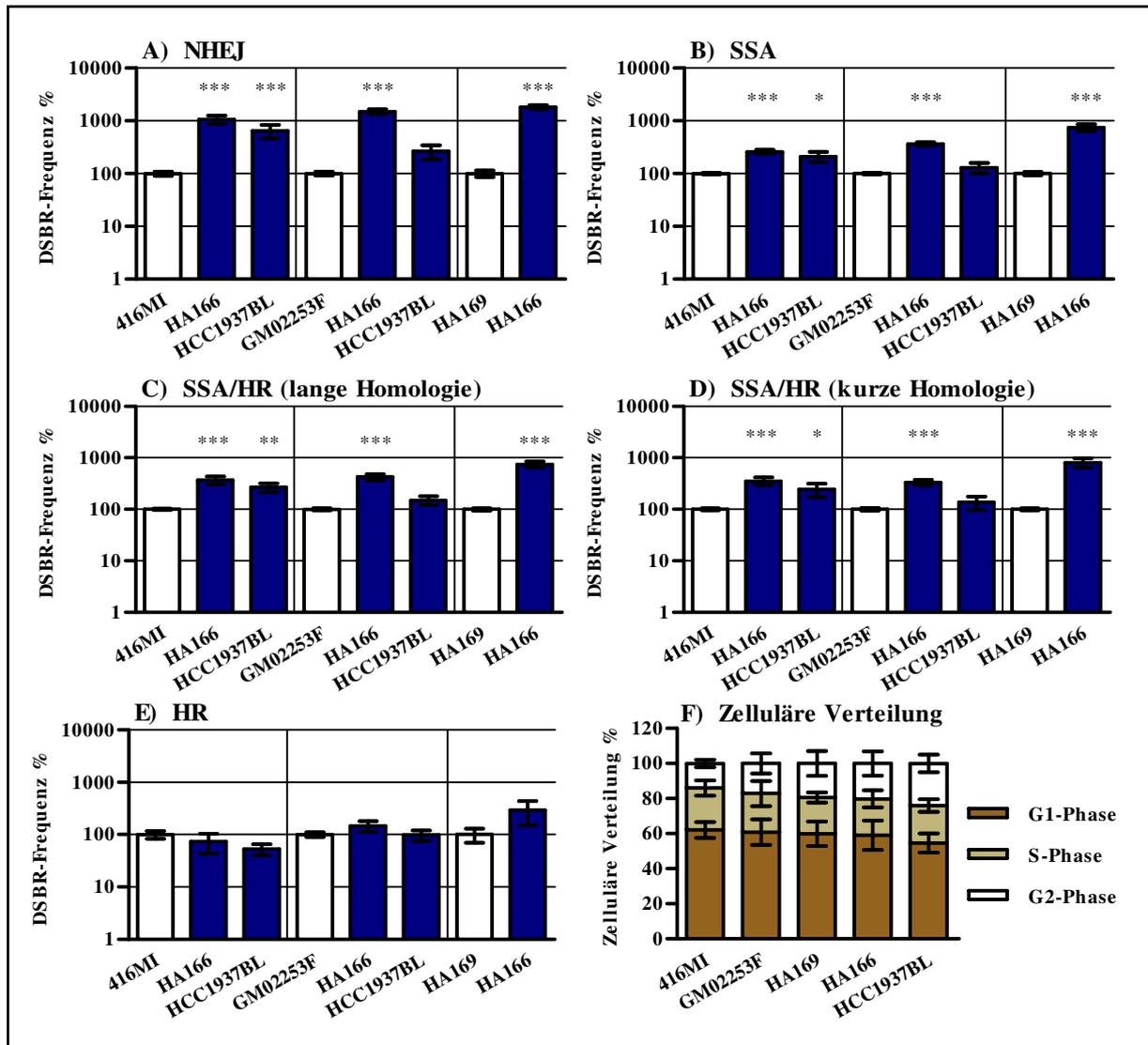
Brcal kann N- und C-terminal mit einer Vielzahl von Faktoren, die in DSBR und Zellzykluskontrolle involviert sind, interagieren und rekrutiert Reparaturproteine an die DSBe. Dabei unterstützt Brcal vor allem die Homologie-gerichtete Reparatur (Ralhan *et al.*, 2007). Um den Einfluss von *BRCA1*-Mutationen auf die DSBR zu untersuchen, wurden die lymphoblastoiden Zelllinien HA166 (*BRCA1* C61G/wt) und HCC1937BL (*BRCA1* 5382insC/wt) verwendet. Diese tragen heterozygot mutierte *BRCA1*-Allele.

Die auf die Kontrollzelllinien 416MI, GM02253F und HA169 relativierten DSBR-Frequenzen aus mehreren Messungen und die jeweiligen Standardfehler sind in Abb. 16 A-E graphisch dargestellt. Die DSBR-Frequenzen für das NHEJ (Abb. 16 A) wiesen für HA166 eine 10-18-fache Erhöhung der Mikrohomologie-gerichteten fehlerhaften Reparatur im Vergleich zu den Kontrollzelllinien 416MI (10-fach, $p < 0,0001$), GM02253F (15-fach, $p < 0,0001$) und HA169 (18-fach, $p < 0,0001$) auf. Für HCC1937BL konnte eine 6,5-fache Erhöhung ($p = 0,0004$) bezogen auf 416MI ermittelt werden. Unabhängig von der Homologielänge wurden für die Messungen von SSA und den Kombinationen aus SSA/HR (Abb. 16 B-D) signifikante Erhöhungen der DSBR-Frequenzen zwischen HA166 und allen Kontrollzelllinien ($p < 0,0001$) sowie für HCC1937BL bezogen auf 416MI (SSA $p = 0,0428$; SSA/HR lange Homologie $p = 0,0032$; SSA/HR kurze Homologie $p = 0,0188$) detektiert. Im Vergleich zu NHEJ fielen die Erhöhungen der SSA- und SSA/HR-Frequenzen (Abb. 16 B-D)

mit 2,5- bis 8-fach für HA166 und ca. 2-fach für HCC1937BL jedoch geringer aus. Da die Messung der HR (Abb. 16 E) keine signifikanten Veränderungen zwischen *BRCA1*-Defekt- und Kontrollzelllinien aufwies, sind die Erhöhungen der DSBR-Frequenzen, bei denen sowohl SSA und HR (Abb. 16 C-D) detektiert wurden, allein auf die Erhöhung von SSA zurückzuführen. Beim Vergleich der *BRCA1*-Defektlinien untereinander wurden geringere NHEJ-, SSA- und HR-Frequenzen von HCC1937BL in Bezug zu HA166 ermittelt (Abb. 16 A-E).

Wie in Abb. 16 F ersichtlich, konnten keine signifikanten Veränderungen in den Zellzyklusanteilen G1-, S- und G2-Phase zwischen den *BRCA1*-Defekt- und Kontrollzelllinien ermittelt werden. Im Mittel wiesen alle Zelllinien einen G1-Anteil von 60 %, sowie einen S- und G2-Anteil von jeweils 20 % auf.

Ausgehend von den DSBR- und Zellzyklusdaten ist das DSBR-Defektmuster für heterozygote *BRCA1*-Mutationen durch eine drastische Erhöhung des Mikrohomologie-gerichteten NHEJ sowie einen geringeren Anstieg des fehlerhaften nichtkonservativen SSA gekennzeichnet (Abb. 16, Tabelle).



BRCA1-DSBR-Defektmuster:					
Gen	DSBR-Mechanismus				
	NHEJ	Homologie-gerichtete DSB			
		SSA	SSA/HR (lange H.)	SSA/HR (kurze H.)	HR
BRCA1	↑↑	↑	↑	↑	

Abb. 16 Bestimmung der DSBR-Unterschiede und Zellzyklusanalyse zwischen BRCA1-Defekt- und Kontrollzelllinien zur Etablierung des DSBR-Defektmusters für Brustkrebs-prädisponierte BRCA1-Genmutationen

Für die Bestimmung der DSBR-Ereignisse wurden die Zellen mit einem Mix aus DSBR-, pCMV-I-SceI-Expressions- und pBS-Kontrollplasmid transfiziert, 24 h kultiviert und anschließend der Anteil grün fluoreszierender Zellen am Durchflusszytometer bestimmt. Die Mittelwerte aus mehreren Messungen (n=9-32) und die berechneten Standardfehler sind in Balkendiagrammen angegeben. Für die Vergleichbarkeit der Messungen wurden die Mittelwerte der Kontrollzelllinien jeweils auf 100 % relativiert. Die weißen Balken repräsentieren die Kontrollzelllinien 416MI, GM02253F und HA169, die blauen Balken die BRCA1-Defektlinien HA166 und HCC1937BL. Die Signifikanzen wurden mit dem ungepaarten Mann-Whitney-Test ermittelt. Signifikante Unterschiede zwischen Kontrollzelllinien und BRCA1-Defektlinien wurden durch Sterne angezeigt (*p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001). Die Darstellung der relativen Werte erfolgte logarithmisch. Die Zelllinien wurden mit 30 µg Plasmid-Mix bestehend aus 1/3 pCMV-I-SceI, 1/3 pBS und 1/3 DSBR-Plasmid transfiziert. Je nach untersuchtem DSBR-Mechanismus wurden die folgenden DSBR-Plasmide verwendet **A)** pEJ-EGFP (Absolutwerte in %: 416MI=0,035, GM02253F=0,033, HA169=0,029), **B)** p5'-EGFP/HR-EGFP (Absolutwerte in %: 416MI=0,590, GM02253F=0,478, HA169=0,268), **C)** pHR-EGFP/3'-EGFP (Absolutwerte in %: 416MI=0,469, GM02253F=0,467, HA169=0,270), **D)** pΔ-EGFP/3'-EGFP (Absolutwerte in %: 416MI=0,424, GM02253F=0,520, HA169=0,253), **E)** pHR-EGFP/5'-EGFP (Absolutwerte in %: 416MI=0,026,

GM02253F=0,010, HA169=0,010) F) Nach Fixierung der Zellen mit Aceton/Ethanol und Färbung der DNA mit Propidiumiodid wurden die Zellpopulationen am Durchflusszytometer analysiert. Durch die Markierung der G1-, S- und G2-Phase-Subpopulationen wurde der prozentuale Anteil der Zellen in der jeweiligen Phase bestimmt. Der prozentuale Anteil der Populationen wurde so berechnet, dass die Summe aller drei Markerregionen (G1-, S- und G2-Phase) 100 % ergab. Die Mittelwerte aus mehreren Messungen (n=16-34) und die berechneten Standardabweichungen sind im Balkendiagramm angegeben. Die braunen Balken repräsentieren den Anteil der Zellen in der G1-Phase, die hellbraunen Balken in der S-Phase und die weißen Balken in der G2-Phase jeweils in Prozent. In der **Tabelle** wurde das *BRCA1*-DSBR-Defektmuster für die untersuchten Reparaturwege vereinfacht dargestellt, wobei nur signifikante Unterschiede visualisiert wurden. Abkürzung: H.=Homologie

4.1.2 Detektion eines DSBR-Defektmusters in lymphoblastoiden Zelllinien mit verschiedenen *BRCA2/FANCD1*-Mutationen

Die wesentliche Aufgabe von Brca2, auch als FancD1 bezeichnet, besteht in der Bindung und Rekrutierung von Rad51 an DSBe. Als Kontrollfaktor initiiert Brca2 den Rad51-abhängigen Aufbau der Nukleoprotein-Filamente, die DNA-Strangpaarung und den DNA-Strangaustausch (Pellegrini *et al.*, 2002).

Zur näheren Charakterisierung der DSBR-Defekte von *BRCA2*- bzw. *FANCD1*-Mutationen wurden die DSBR-Frequenzen der Zelllinien HA238 mit heterozygoter *BRCA2*-Mutation (*BRCA2* 5946delCT/wt) und GM13023A mit *FANCD1*-Mutation (genaue Mutation unbekannt) untersucht und mit den Kontrollzelllinien 416MI, GM02253F und HA169 verglichen.

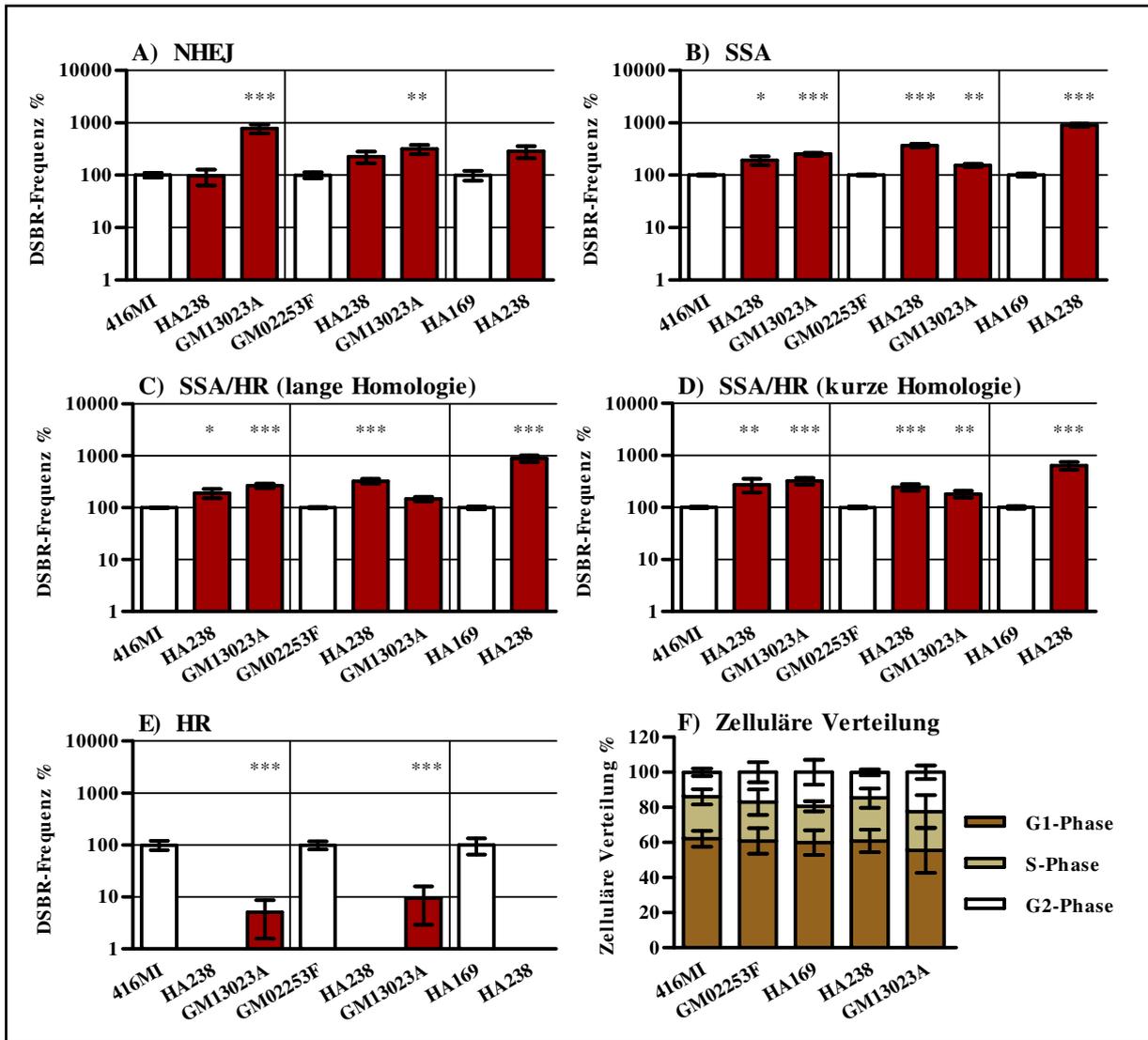
Für das Mikrohomologie-gerichtete NHEJ (Abb. 17 A) konnte lediglich für die *FANCD1*-Defektlinie GM13023A eine signifikante 7,5- bzw. 3-fache Erhöhung in Bezug auf 416MI ($p=0,0003$) bzw. GM02253F ($p=0,0051$) nachgewiesen werden.

Für SSA und den Kombinationen aus SSA/HR wurden unabhängig von der Homologielänge (Abb. 17 B-D) signifikante Erhöhungen der DSBR-Frequenzen in den Zelllinien mit *BRCA2*- bzw. *FANCD1*-Mutation im Vergleich zu den Kontrollzelllinien 416MI, GM02253F und HA169 detektiert. HA238 wies 2-9-fach erhöhte DSBR-Frequenzen auf (in Bezug auf 416MI: 2-fach für SSA $p=0,0194$; 2-fach für SSA/HR lange Homologie $p=0,0120$; 2,5-fach für SSA/HR kurze Homologie $p=0,0020$; in Bezug auf GM02253F: 3,5-fach für SSA $p<0,0001$; 3-fach für SSA/HR lange Homologie $p<0,0001$; 2,5-fach für SSA/HR kurze Homologie $p=0,0002$; in Bezug auf HA169: 9-fach für SSA $p<0,0001$; 9-fach für SSA/HR lange Homologie $p<0,0001$; 6,5-fach für SSA/HR kurze Homologie $p<0,0001$), während die *FANCD1*-Mutation zu einem 1,5-3-fachen Anstieg führte (in Bezug auf 416MI: 2,5-fach für SSA $p<0,0001$; 2,5-fach für SSA/HR lange Homologie $p=0,0002$; 3-fach für SS/HR kurze Homologie $p=0,0003$; in Bezug auf GM02253F 1,5-fach für SSA $p=0,0019$; 2-fach für SSA/HR kurze Homologie $p=0,0073$;). Bei der Messung der HR (Abb. 17 E) wurden für die *BRCA2*-Defektlinie HA238 keine DSBR-Ereignisse detektiert. Die heterozygote Mutation von *BRCA2* führte somit zu einer Senkung der HR bis unter die Nachweisgrenze unseres

Testsystems (Akyüz *et al.*, 2002). Für die *FANCD1*-Defektlinie wurde eine Senkung der HR auf 5 % in Bezug auf 416MI ($p=0,0003$) sowie eine Reduktion der HR auf 10 % bezogen auf GM02253F ($p=0,0004$) nachgewiesen.

Die in Abb. 17 F zusammengefassten Zellzyklusdaten zeigten keine signifikanten Unterschiede in der G1-, S- und G2-Phaseverteilung zwischen den Kontroll- und *BRCA2/FANCD1*-Defektlinien. Im Mittel wiesen alle Zelllinien einen G1-Anteil von 60 %, sowie einen S- und G2-Anteil von jeweils 20 % auf.

Das spezifische DSBR-Muster für *BRCA2/FANCD1*-Mutationen ergab sich vor allem durch die deutliche Erhöhung von SSA und einem möglichen Anstieg von Mikrohomologiegerichtetem NHEJ. Ebenso konnte eine drastische Reduktion der HR im Vergleich zu den Kontrollzelllinien detektiert werden (Abb. 17, Tabelle).



BRCA2-DSBR-Defektmuster:					
Gen	DSBR-Mechanismus				
	NHEJ	Homologie-gerichtete DSBR			
		SSA	SSA/HR (lange H.)	SSA/HR (kurze H.)	HR
BRCA2/ FANCD1	(↑)	↑	↑	↑	(↓↓)

Abb. 17 Bestimmung der DSBR-Unterschiede und Zellzyklusanalyse zwischen BRCA2/FANCD1-Defekt- und Kontrollzelllinien zur Etablierung des DSBR-Defektmusters für Brustkrebs-prädisponierte BRCA2/FANCD1-Genmutationen

Für die Bestimmung der DSBR-Ereignisse wurden die Zellen mit einem Mix aus DSBR-, pCMV-I-SceI-Expressions- und pBS-Kontrollplasmid transfiziert, 24 h kultiviert und anschließend der Anteil grün fluoreszierender Zellen am Durchflusszytometer bestimmt. Die Mittelwerte aus mehreren Messungen (n=3-26) und die berechneten Standardfehler sind in Balkendiagrammen angegeben. Für die Vergleichbarkeit der Messungen wurden die Mittelwerte der Kontrollzelllinien jeweils auf 100 % relativiert. Die weißen Balken repräsentieren die Kontrollzelllinien 416MI, GM02253F und HA169, die roten Balken die BRCA2/FANCD1-Defektlinien HA238 und GM13023A. Die Signifikanzen wurden mit dem ungepaarten Mann-Whitney-Test ermittelt. Signifikante Unterschiede zwischen Kontrollzelllinien und BRCA2/FANCD1-Defektlinien wurden durch Sterne angezeigt. (*p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001). Die Darstellung der relativen Werte erfolgte logarithmisch. Die Zelllinien wurden mit 30 µg Plasmid-Mix bestehend aus 1/3 pCMV-I-SceI, 1/3 pBS und 1/3 DSBR-Plasmid transfiziert. Je nach untersuchtem DSBR-Mechanismus wurden die folgenden DSBR-Plasmide verwendet **A)** pEJ-EGFP (Absolutwerte in %: 416MI=0,043, GM02253F=0,030, HA169=0,014), **B)** p5'-EGFP/HR-EGFP (Absolutwerte in %: 416MI=0,719, GM02253F=0,451, HA169=0,187), **C)** pHR-EGFP/3'EGFP (Absolutwerte in %: 416MI=0,791, GM02253F=0,439, HA169=0,203), **D)** pΔ-EGFP/3'-EGFP (Absolutwerte in %: 416MI=0,686, GM02253F=0,573, HA169=0,307), **E)** pHR-EGFP/5'-EGFP (Absolutwerte

in %: 416MI=0,010, GM02253F=0,008, HA169=0,012) **F**) Nach Fixierung der Zellen mit Aceton/Ethanol und Färbung der DNA mit Propidiumiodid wurden die Zellpopulationen am Durchflusszytometer analysiert. Durch die Markierung der G1-, S- und G2-Phase-Subpopulationen wurde der prozentuale Anteil der Zellen in der jeweiligen Phase bestimmt. Der prozentuale Anteil der Populationen wurde so berechnet, dass die Summe aller drei Markerregionen (G1-, S- und G2-Phase) 100 % ergab. Die Mittelwerte aus mehreren Messungen (n=4-34) und die berechneten Standardabweichungen sind im Balkendiagramm angegeben. Die braunen Balken repräsentieren den Anteil der Zellen in der G1-Phase, die hellbraunen Balken in der S-Phase und die weißen Balken in der G2-Phase jeweils in Prozent. In der **Tabelle** wurde das *BRCA2*-DSBR-Defektmuster für die untersuchten Reparaturwege vereinfacht dargestellt, wobei nur signifikante Unterschiede visualisiert wurden. Abkürzung: H.=Homologie

4.1.3 Detektion eines DSBR-Defektmusters in lymphoblastoiden Zelllinien mit *NBN*- bzw. *RAD50*-Mutation

Nibrin ist als Bestandteil des MRN-Komplexes für die DSBR-Detektion sowie die Rekrutierung und Aktivierung von ATM verantwortlich. Nibrin spielt dabei eine wichtige Rolle in der Aktivierungskaskade der DSBR. C-terminal begünstigt Nibrin die Lokalisation von Mre11 an DSBe und fördert die konservative Homologie-gerichtete DSBR (HR). Mutationen im *NBN*-Gen sind mit drastischer Reduktion der HR verbunden. Weiterhin wurden auch Einflüsse von Nibrin in den fehlerhaften DSBR-Wegen SSA und Mikrohomologie-gerichtetem NHEJ beschrieben (Howlett et al., 2006; Sakamoto et al., 2007; Tauchi et al., 2002). Für die Erstellung eines spezifischen DSBR-Defektmusters wurde die lymphoblastoide Zelllinie HA226 mit homozygoter *NBN*-Mutation (657del5/657del5) verwendet. Dabei handelt es sich um die in über 90 % aller *Nijmegen breakage syndrom* (NBS)-Patienten detektierte homozygote *NBN*-Mutation, die zur geringen Expression eines N-terminal trunkierten Proteins führt (Lins et al., 2009).

Rad50, ebenfalls Bestandteil des MRN-Komplexes, kann mit Mre11 und/oder Nibrin an DNA-Enden oligomerisieren und diese in ihrer Position halten. Dieser Komplex kann sowohl die DNA-Enden innerhalb eines Schwesterchromatides oder zwischen einem gebrochenen und intakten Schwesterchromatid zusammenhalten und nicht-homologe sowie Homologie-gerichtete DSBR begünstigen (de Jager and Kanaar, 2002). Für die Untersuchung der *RAD50*-Mutation auf die DSBR wurde die lymphoblastoide Zelllinie HA239 mit der *RAD50*-Mutation R1099X/X1313Y verwendet.

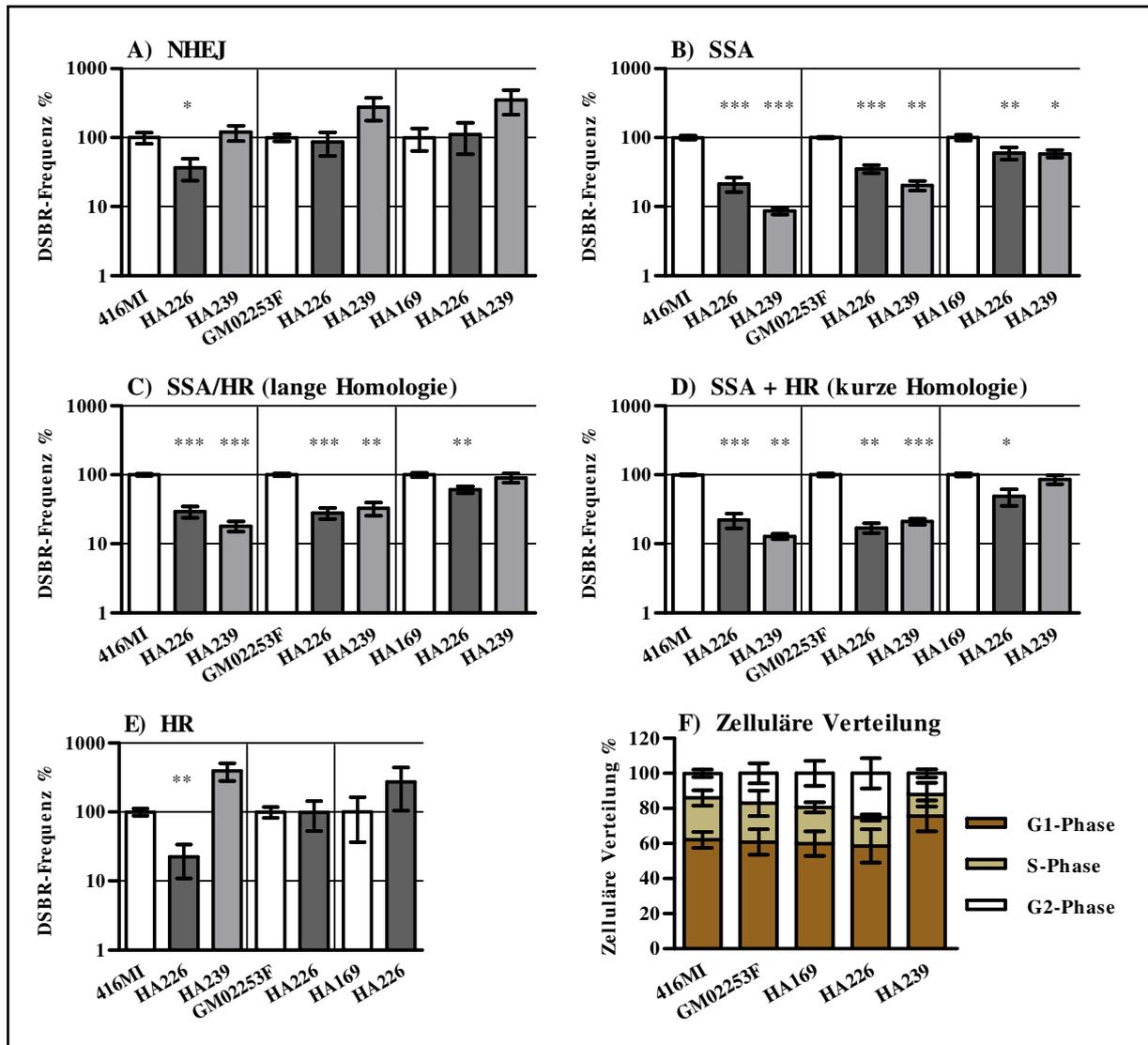
Beim Vergleich der DSBR-Frequenzen zwischen der *NBN*-Defekt- und den Kontrollzelllinien 416MI, GM02253F und HA169 wurde, unabhängig von der Homologielänge für SSA und den Kombinationen aus SSA/HR (Abb. 18 B-D), eine Senkung der fehlerhaften DSBR detektiert. Am deutlichsten fiel die Reduktion in Bezug auf die Kontrollzelllinie 416MI aus. Eine Reduktion von SSA bzw. SSA/HR auf 25 % bzw. 20 % (SSA p=0,0004; SSA/HR lange Homologie p=0,0004; SSA/HR kurze Homologie p=0,0004) konnte im Vergleich zwischen HA226 und 416MI ermittelt werden. Für das Mikrohomologie-gerichtete NHEJ (p=0,0147)

und die HR ($p=0,0025$) wurde bezogen auf 416MI eine Reduktion der DSBR-Frequenzen auf 33 % bzw. 25 % des Ausgangswertes festgestellt (Abb. 18 A, E).

Die DSBR-Frequenzen von HA239, relativiert auf die Kontrollzelllinien 416MI, GM02253F und HA169 wiesen für das Mikrohomologie-gerichtete NHEJ keine signifikanten Unterschiede auf (Abb. 18 A). Für SSA (Abb. 18 B) wurden signifikante Reduktionen der DSBR-Frequenzen auf 10-50 % des Ausgangswertes detektiert (für 416MI $p=0,0010$; für GM02253F $p=0,0016$; für HA169 $p=0,0186$). Für die Kombinationen aus SSA/HR (Abb. 18 C-D) konnten unabhängig von der Homologielänge signifikante Senkungen der DSBR-Frequenzen auf 15-33 % im Vergleich zu den Kontrollzelllinien 416MI (SSA/HR lange Homologie $p=0,0004$; SSA/HR kurze Homologie $p=0,0022$) und GM02253F (SSA/HR lange Homologie $p=0,0015$; SSA/HR kurze Homologie $p<0,0001$) nachgewiesen werden. Für HR (Abb. 18 E) wurden keine statistisch relevanten Unterschiede zwischen HA239 und 416MI ermittelt.

Beim Vergleich der DSBR-Frequenzen von HA239 und HA226 konnte eine große Übereinstimmung der DSBR-Defektmuster nachgewiesen werden. Möglicherweise aufgrund der Interaktion von Rad50 und Nibrin im MRN-Komplex (Tauchi *et al.*, 2002). Da für HA226 signifikante Veränderungen von HR und NHEJ nur spezifisch auf die Kontrollzelllinie 416MI ermittelt wurden, ist für die Erstellung des *NBN/RAD50*-DSBR-Defektmusters die Reduktion von SSA maßgeblich. Anhand der DSBR-Messungen ergab sich für die *NBN/RAD50*-Mutation das in Abb. 18 gezeigte DSBR-Muster.

Die zelluläre Verteilung (Abb. 18 F) der Kontrolllinien- und *NBN*-Defektlinie deutete auf keine maßgeblichen Unterschiede hin. Im Mittel wurden 60 % der Zellen in der G1- und 40 % in der S-/G2-Phase detektiert. Der Vergleich der Zellpopulationen zwischen der *RAD50*-Defektlinie HA239 und den Kontrollzelllinien ergab signifikante Unterschiede. HA239 wies mit 76 % den höchsten G1-Phase- und mit 24 % den geringsten S-/G2-Phasen-Anteil auf (G1: HA239 versus 416MI $p=0,0103$; HA239 versus GM02253F $p=0,0029$; HA239 versus HA169 $p=0,0030$).



NBN/RAD50-DSBR-Defektmuster:					
Gen	DSBR-Mechanismus				
	NHEJ	Homologie-gerichtete DSBR			
		SSA	SSA/HR (lange H.)	SSA/HR (kurze H.)	HR
<i>NBN/RAD50</i>		↓	↓	↓	

Abb. 18 Bestimmung der DSBR-Unterschiede und Zellzyklusanalyse zwischen *NBN/RAD50*-Defekt- und Kontrollzelllinien zur Etablierung des DSBR-Defektmusters für die Brustkrebs-prädisponierten *NBN/RAD50*-Genmutationen

Für die Bestimmung der DSBR-Ereignisse wurden die Zellen mit einem Mix aus DSBR-, pCMV-I-SceI-Expressions- und pBS-Kontrollplasmid transfiziert, 24 h kultiviert und anschließend der Anteil grün fluoreszierender Zellen am Durchflusszytometer bestimmt. Die Mittelwerte aus mehreren Messungen (n=3-9) und die berechneten Standardfehler sind in Balkendiagrammen angegeben. Für die Vergleichbarkeit der Messungen wurden die Mittelwerte der Kontrollzelllinien jeweils auf 100 % relativiert. Die weißen Balken repräsentieren die Kontrollzelllinien 416MI, GM02253F und HA169, die grauen Balken die *NBN*- bzw. *RAD50*-Defektlinien HA226 bzw. HA239. Die Signifikanz wurden mit dem ungepaarten Mann-Whitney-Test ermittelt. Signifikante Unterschiede zwischen Kontrollzelllinien und der *NBN/RAD50*-Defektlinien wurden durch Sterne angezeigt. (*p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001). Die Darstellung der relativen Werte erfolgte logarithmisch. Die Zelllinien wurden mit 30 µg Plasmid-Mix bestehend aus 1/3 pCMV-I-SceI, 1/3 pBS und 1/3 DSBR-Plasmid transfiziert. Je nach untersuchtem DSBR-Mechanismus wurden die folgenden DSBR-Plasmide verwendet **A)** pEJ-EGFP (Absolutwerte in %: 416MI=0,053, GM02253F=0,028, HA169=0,020), **B)** p5'-EGFP/HR-EGFP (Absolutwerte in %: 416MI=0,828, GM02253F=0,483, HA169=0,299), **C)** pHR-EGFP/3'-EGFP (Absolutwerte in %: 416MI=0,570, GM02253F=0,604, HA169=0,325), **D)** pΔ-EGFP/3'-EGFP (Absolutwerte in %: 416MI=0,777, GM02253F=0,896, HA169=0,412), **E)** pHR-EGFP/5'-EGFP (Absolutwerte

in %: 416MI=0,055, GM02253F=0,011, HA169=0,003). F) Nach Fixierung der Zellen mit Aceton/Ethanol und Färbung der DNA mit Propidiumiodid wurden die Zellpopulationen am Durchflusszytometer analysiert. Durch die Markierung der G1-, S- und G2-Phase-Subpopulationen wurde der prozentuale Anteil der Zellen in der jeweiligen Phase bestimmt. Der prozentuale Anteil der Populationen wurde so berechnet, dass die Summe aller drei Markerregionen (G1-, S- und G2-Phase) 100 % ergab. Die Mittelwerte aus mehreren Messungen (n=6-9) und die berechneten Standardabweichungen sind im Balkendiagramm angegeben. Die braunen Balken repräsentieren den Anteil der Zellen in der G1-Phase, die hellbraunen Balken in der S-Phase und die weißen Balken in der G2-Phase jeweils in Prozent. In der **Tabelle** wurde das *NBN/RAD50*-DSBR-Defektmuster für die untersuchten Reparaturwege vereinfacht dargestellt, wobei nur signifikante Unterschiede visualisiert wurden. Abkürzung: H.=Homologie

4.1.4 Detektion eines DSBR-Defektmusters in lymphoblastoiden Zelllinien mit verschiedenen *ATM*-Mutationen

Den bisher untersuchten Mutationen in *BRCA1*-, *BRCA2*-, *NBN*- und *RAD50*-Defektlinien konnten eindeutige DSBR-Defektmuster zugeordnet werden. Diese Ergebnisse entsprechen auch weitestgehend den publizierten Daten. Aus der Literatur ist bekannt, dass *ATM*, als multifunktionales Protein, mit einer Vielzahl von Faktoren, die in DSBR, *Checkpoint*-Kontrolle, Apoptose und Seneszenz involviert sind, interagiert (Valerie and Povirk, 2003). Bisher wurden für *ATM*-Defektlinien widersprüchliche Ergebnisse publiziert und *ATM*-Mutationen konnte also kein eindeutiges DSBR-Defektmuster zugewiesen werden. Einerseits wurde gezeigt, dass *ATM*-Inhibierung zu einer signifikanten Senkung der HR führt, NHEJ jedoch nicht beeinflusst wird (Golding *et al.*, 2004; Morrison *et al.*, 2000). Andererseits konnten statistisch relevante Erhöhungen von intra- und extrachromosomaler Rekombination in *ATM*-defizienten Zellen detektiert werden (Bishop *et al.*, 2000; Drexler *et al.*, 2004). In dieser Arbeit wurden die DSBR-Mechanismen von elf lymphoblastoiden *ATM*-Defektlinien mit den in Tab. 6 beschriebenen *ATM*-Mutationen untersucht und mit den Kontrollzelllinien verglichen. Die Zelllinien HA201 und HA202 wiesen neben der *ATM*-Mutation, eine zusätzliche Mutation in *CHEK2* bzw. *53BP1* auf.

Zelllinien	Klinischer Phänotyp	Aminosäure- bzw. Nukleotidveränderung	Effekt	Protein-expression
GM01526 E	<i>Ataxia telangiectasia</i>	<i>ATM</i> (M1T/M1T)	Trunkierungen	kein <i>ATM</i> -Protein
HA56	<i>Ataxia telangiectasia</i>	<i>ATM</i> (3085insA/3880insA)	Trunkierungen	kein <i>ATM</i> -Protein
HA101	<i>Ataxia telangiectasia</i>	<i>ATM</i> (IVS7+5G>A/D2625E-A2626P)	<i>Splicing</i> -Mutation/ <i>Missense</i> -Mutationen	residualer <i>ATM</i> -Gehalt
HA126	<i>Ataxia telangiectasia</i>	<i>ATM</i> (Y171X/ Y171X)	Trunkierungen	kein <i>ATM</i> -Protein
HA187	<i>Ataxia telangiectasia</i>	<i>ATM</i> (E1978X/R250X)	Trunkierungen	nicht überprüft
HA201	Brustkrebs	<i>ATM</i> (IVS10-6T>G/wt) <i>CHEK2</i> (IVS2+1G>A/wt)	heterozygote <i>Splicing</i> -Mutation (Exon 11 fehlt) heterozygote <i>Splicing</i> -Mutation (Exon 2 fehlt)	residualer <i>ATM</i> -Gehalt
HA202	Brustkrebs	<i>ATM</i> (IVS10-6T>G/wt) <i>53BP1</i> (1531del6/wt)	heterozygote <i>Splicing</i> -Mutation (Exon 11 fehlt) heterozygote	nicht überprüft

			Deletionsmutation	
HA204	<i>Ataxia telangiectasia</i>	<i>ATM</i> (7636del9/7636del9)	homozygote Deletion der Aminosäuren 2546-2548	residualer ATM-Gehalt
HA306	<i>Ataxia telangiectasia</i>	<i>ATM</i> (1561delAG/R1875X)	Deletion/Trunkierung	kein ATM-Protein
HA388	<i>Ataxia telangiectasia</i>	<i>ATM</i> (9021insA/V2716A)	Trunkierung/ <i>Missense</i> -Mutation	wenig ATM-Protein
HA433	<i>Ataxia telangiectasia</i>	<i>ATM</i> (8068delT/8068delT)	Trunkierungen	kein ATM-Protein

Tab. 6 *ATM*-Defektzelllinien mit klinischem Phänotyp, zugehörigen Mutationen und Änderungen im *ATM*-Proteinniveau

(Chenevix-Trench *et al.*, 2002; Dörk *et al.*, 2004; Lavin *et al.*, 2004; Sandoval *et al.*, 1999)

Die in Abb. 19 dargestellten DSB-R-Frequenzen für die *ATM*-Defektlinien, bezogen auf die Kontrollzelllinien 416MI, GM02253F und HA169, zeigten zunächst, dass kein spezifisches Muster für *ATM*-Mutationen erstellt werden konnte. Für jeden untersuchten DSB-R-Mechanismus konnten für die *ATM*-Defektlinien sowohl signifikante Erhöhungen sowie Senkungen der DSB-R-Frequenzen detektiert werden. Beim Vergleich mit den bereits ermittelten DSB-R-Defektmustern fiel jedoch auf, dass einzelne *ATM*-Defektlinien die gleichen Muster wie die *BRCA1*-, *BRCA2* oder *NBN/RAD50*-Defektlinien aufwiesen.

Die *ATM*-Defektlinien HA204 und GM01526E zeichneten sich zum Beispiel durch signifikante Erhöhungen von NHEJ, SSA und den Kombinationen aus SSA/HR aus (Abb. 19 A-D). HA204 wies eine markante 31-41-fache Erhöhung des Mikrohomologie-gerichteten NHEJ (Abb. 19 A) im Vergleich zu 416MI (41-fach $p=0,0002$), GM02253F (34-fach $p=0,0002$) und HA169 (31-fach $p>0,0001$) auf. Für SSA und den Kombinationen aus SSA/HR (Abb. 19 B-D) konnte eine 2-26-fache Steigerung der DSB-R-Frequenzen von HA204 im Vergleich zu den Kontrollzelllinien detektiert werden, wobei die Unterschiede zu HA169 am deutlichsten ausfielen (9-fach für SSA $p<0,0001$; 21-fach für SSA/HR lange Homologie $p<0,0001$; 26-fach für SSA/HR kurze Homologie $p<0,0001$). Die Messung der HR (Abb. 19 E) lieferte für die HA204 keine DSB-R-Ereignisse.

Für GM01526E konnten signifikante 2-5-fache Erhöhungen für NHEJ (5-fach $p=0,0028$) sowie SSA/HR (2-fach für SSA/HR lange Homologie $p=0,0318$; 2-fach für SSA/HR kurze Homologie $p=0,0023$) bezogen auf die Linie 416MI detektiert werden (Abb. 19 A, C-D). Insgesamt konnten für HA204 deutlich höhere NHEJ-, SSA- und SSA/HR-Frequenzen detektiert werden, als für GM01526E (Abb. 19 A-D).

Beim Vergleich der DSB-R-Frequenzen von HA204 und GM01526E mit den bereits detektierten DSB-R-Defektmustern für *BRCA1*-, *BRCA2*- und *NBN/RAD50*-Mutationen, deutete sich für beide Linien eine starke Ähnlichkeit zum *BRCA1*-Defektmuster an (siehe Abschnitt 4.1.1).

Die *ATM*-Defektlinien HA101, HA56 und HA201 zeigten nur für HA56 eine signifikante Senkung von NHEJ (Abb. 19 A) bezogen auf 416MI ($p=0,0057$).

Für HA101 konnten für SSA sowie SSA/HR (Abb. 19 B-D) signifikante 2-7,5-fache Erhöhungen der DSB-R-Frequenzen im Vergleich zu allen Kontrollzelllinien ermittelt werden, wobei die Unterschiede zu HA169 mit 6-7,5-facher Steigerung am markantesten waren (bezogen auf 416MI: 2-fach für SSA $p=0,0051$; 3-fach für SSA/HR lange Homologie $p<0,0001$; 3-fach für SSA/HR kurze Homologie $p<0,0001$; bezogen auf GM02253F: 3-fach für SSA $p=0,0011$; 3-fach für SSA/HR lange Homologie $p<0,0001$; 2-fach für SSA/HR kurze Homologie $p=0,0002$; bezogen auf HA169: 7,5-fach für SSA $p<0,0001$; 6-fach für SSA/HR lange Homologie $p<0,0001$; 6,5-fach für SSA/HR kurze Homologie $p<0,0001$).

Die *ATM*-Defektlinie HA56 wies signifikante 2,5-3,5-fache Steigerungen von SSA und SSA/HR (Abb. 19 B-D) vor allem im Vergleich zu HA169 (3,5-fach für SSA $p<0,0001$; 3-fach für SSA/HR lange Homologie $p<0,0001$; 2,5-fach für SSA/HR kurze Homologie $p<0,0001$) auf. Im Vergleich zu GM02253F konnten signifikante 1,5-fache Erhöhungen für SSA ($p=0,0143$) und SSA/HR mit langer Homologie ($p=0,0240$) errechnet werden (Abb. 19 B-C).

Die aussagekräftigsten Ergebnisse für HA201 lieferten die Bezüge von SSA und SSA/HR auf die Kontrollzelllinie HA169 (Abb. 19 B-D), wobei 2,5-3,5-fache Steigerungsraten ermittelt wurden (2,5-fach für SSA $p=0,0003$; 3,5-fach für SSA/HR lange Homologie $p=0,0004$; 3,5-fach für SSA/HR kurze Homologie $p<0,0001$).

Eine signifikante Senkung der HR (Abb. 19 E) auf 15 % konnte für HA101 ($p=0,0003$) und HA56 ($p=0,0010$) bezogen auf 416MI detektiert werden, eine Senkung auf 20 % wurde beim Vergleich von HA56 zu GM02253F ($p=0,0102$) errechnet. Die drastische Senkung der HR von HA101 und HA56 im Vergleich zu den Kontrollzelllinien spiegelte sich nicht in einer Reduktion der DSB-R-Frequenzen von pHR-EGFP/3'-EGFP und p Δ -EGFP/3'-EGFP (Abb. 19 C-D) wieder, bei denen eine Kombination aus SSA und HR ermittelt wurde. Insgesamt spiegelten die SSA/HR-Frequenzen die SSA-Frequenzen unabhängig von der Länge der Homologie wieder. Mit der signifikanten Erhöhung von SSA und SSA/HR sowie der zumindest für die Linien HA101 und HA56 detektierten Senkung der HR, wiesen die DSB-R-Frequenzen der Zelllinien HA101, HA56 sowie HA201 eine hohe Ähnlichkeit mit dem *BRCA2*-DSB-R-Defektmuster auf (siehe Abschnitt 4.1.2).

Die *ATM*-Defektlinien HA388, HA187 und HA202 wiesen für das Mikrohomologiegerichtete NHEJ (Abb. 19 A) mit Ausnahme von HA187 keine signifikanten Unterschiede im

Vergleich zu den Kontrollzelllinien auf (für HA187: Reduktion auf 20 % im Vergleich zu GM02253F $p=0,0006$). Für SSA und SSA/HR (Abb. 19 B-D) wurden für HA388 signifikante Senkungen der DSBR-Frequenzen auf 60 % bzw. 30 % im Vergleich zu 416MI (auf 30 % für SSA $p=0,0010$, auf 30 % für SSA/HR lange Homologie $p=0,0015$) und GM02253F (auf 60 % für SSA $p=0,0127$; auf 50 % für SSA/HR lange Homologie $p=0,0030$; auf 50 % für SSA/HR kurze Homologie $p=0,0031$) detektiert.

HA187 wies ebenfalls signifikante Reduktionen von SSA und SSA/HR im Vergleich zu 416MI (auf 20 % für SSA $p<0,0001$; auf 20 % für SSA/HR lange Homologie $p<0,0001$; auf 30 % für SSA/HR kurze Homologie $p=0,0008$) und GM02253F (auf 50 % für SSA $p=0,0004$; auf 35 % für SSA/HR lange Homologie $p=0,0001$; auf 40 % für SSA/HR kurze Homologie $p=0,0031$) auf (Abb. 19 B-D). Für die Zelllinie HA202 konnte eine Senkung von SSA/HR auf 25-30 % bezogen auf GM02253F (auf 25 % für SSA/HR lange Homologie $p=0,0238$; auf 30 % für SSA/HR kurze Homologie $p=0,0275$) ermittelt werden (Abb. 19 C-D). Der Vergleich der *ATM*-Defektlinien mit der Kontrollzelllinie HA169 lieferte lediglich für HA202 nach Messung von SSA/HR mit langer Homologie ($p=0,0358$) eine statistisch relevante Senkung von fehlerhaften SSA/HR auf 30 % des Kontrollwertes (Abb. 19 D).

Verglichen mit den bereits ermittelten DSBR-Defektmustern entsprachen die DSBR-Ergebnisse der *ATM*-Defektlinien HA388, HA187 und HA202 dem Phänotyp einer *NBN/RAD50*-Mutation (siehe Abschnitt 4.1.3).

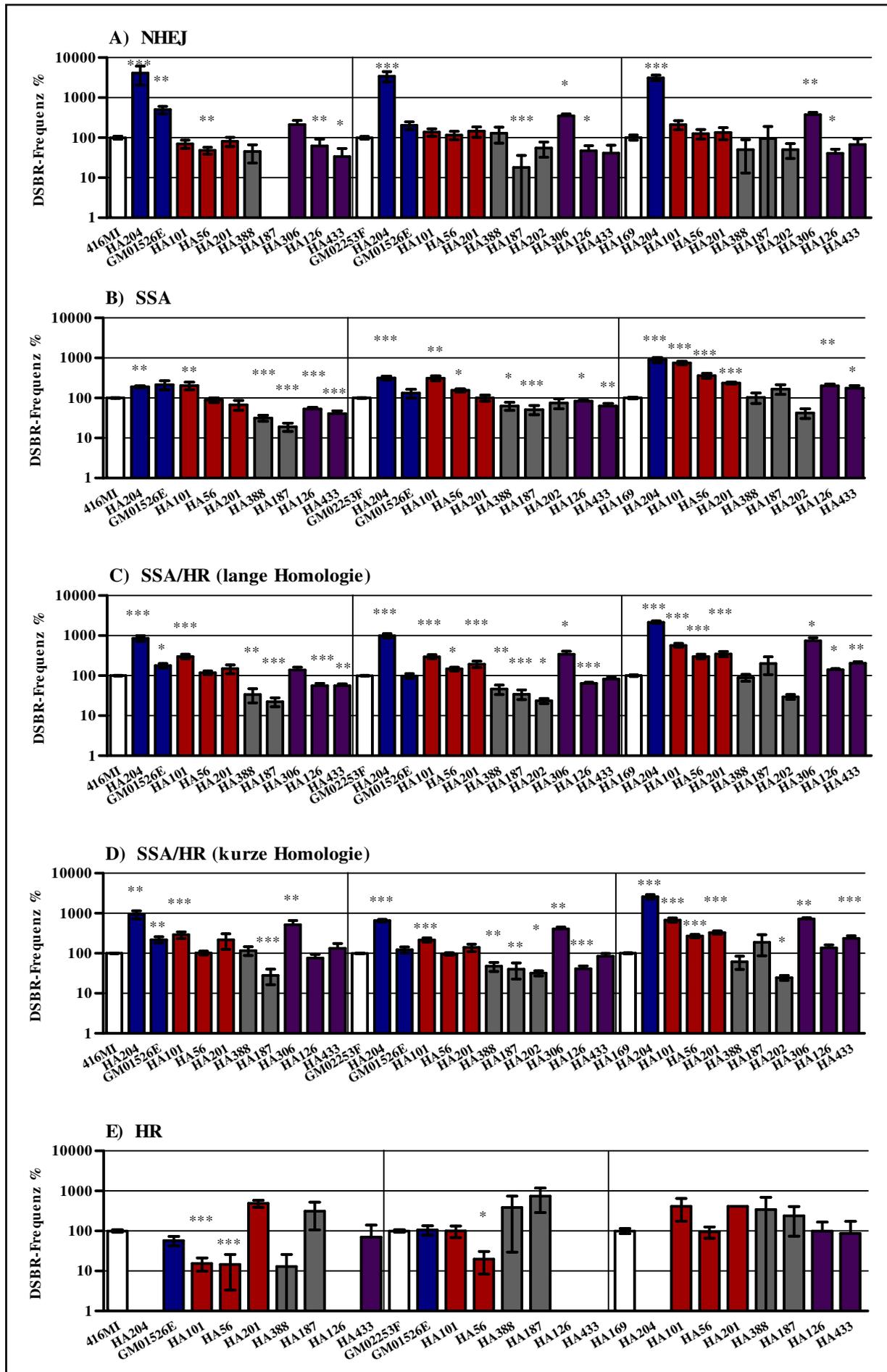
Die *ATM*-Defektlinie HA306 konnte aufgrund der geringeren Zellausbeute nur mit den DSBR-Plasmiden pEJ-EGFP (NHEJ), pHR-EGFP/3'-EGFP und pΔ-EGFP/3'-EGFP (SSA/HR mit langer und kurzer Homologie) transfiziert werden. Wie in Abb. 19 A ersichtlich, wurde für das Mikrokomologie-gerichtete NHEJ eine 3,5-fache Erhöhung der DSBR-Frequenzen bezogen auf GM02253F ($p=0,0133$) und HA169 ($p=0,0080$) ermittelt. Für die Kombinationen aus SSA/HR (Abb. 19 C-D) wurden für HA306 3,5-7,5-fache signifikante Steigerungen der mutagenen DSBR-Frequenzen in Bezug auf 416MI (5-fach für SSA/HR kurze Homologie $p=0,0050$), GM02253F (3,5-fach für SSA/HR lange Homologie $p=0,0357$; 4-fach für SSA/HR kurze Homologie $p=0,0080$) und HA169 (7,5-fach für SSA/HR lange Homologie $p=0,0238$; 7-fach für SSA/HR kurze Homologie $p=0,0050$) verzeichnet. Da die Messung der HR fehlt, kann keine eindeutige Zuordnung dieser *ATM*-Defektlinie zu einem spezifischen Defektmuster erfolgen, da signifikante Erhöhungen von NHEJ und SSA sowohl im *BRCA1*- als auch im *BRCA2*-DSBR-Defektmuster nachgewiesen wurden. Da der Anstieg

für NHEJ jedoch geringer ausfällt als für SSA/HR würde die Charakterisierung eher in Richtung *BRCA2*-Defekttyp tendieren.

Die Charakterisierung der *ATM*-Defektlinien HA126 und HA433 war aufgrund der widersprüchlichen Ergebnisse im Vergleich zu den Kontrollzelllinien nicht möglich.

Einerseits konnten für diese *ATM*-Defektlinien in Bezug auf 416MI und GM02253F signifikante Reduktionen für SSA und SSA/HR auf 50 % des Kontrollwertes detektiert werden, andererseits wurde im Vergleich zu HA169 eine 2-fache Erhöhung errechnet (Abb. 19 B-D). Während Senkungen von SSA sowie SSA/HR dem *NBN/RAD50*-DSBR-Defektmuster entsprechen, würde eine Erhöhung dieser DSBR-Frequenzen eine Zuordnung zum *BRCA1*- bzw. *BRCA2*-DSBR-Defektmuster bedingen.

Die Zellzyklusanalyse (Abb. 19 F) zeigte für die *ATM*-Defektlinien HA204, HA101 und HA56 signifikante Unterschiede in der G1-Verteilung der Zellen im Vergleich zu den Kontrollzelllinien 416MI (versus HA204 $p=0,0009$; versus HA101 $p=0,00051$; versus HA56 $p=0,0009$) und GM02253F (versus HA204 $p=0,0027$; versus HA101 $p=0,0156$; versus HA56 $p=0,0046$) auf. Mit 48-52 % wiesen HA204, HA56 und HA101 einen deutlich geringeren G1-Anteil auf, als die Kontrollzelllinien mit 60-62 %.



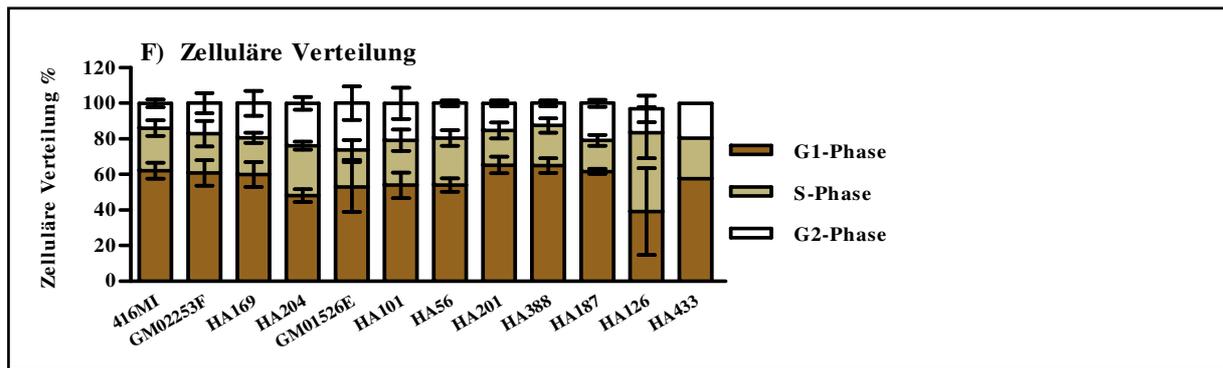


Abb. 19 Bestimmung der DSBR-Unterschiede und Zellzyklusanalyse zwischen *ATM*-Defekt- und Kontrollzelllinien zur Etablierung der DSBR-Defektmuster für die *ATM*-Genmutationen

Für die Bestimmung der DSBR-Ereignisse wurden die Zellen mit einem Mix aus DSBR-, pCMV-I-SceI-Expressions- und pBS-Kontrollplasmid transfiziert, 24 h kultiviert und anschließend der Anteil grün fluoreszierender Zellen am Durchflusszytometer bestimmt. Die Mittelwerte aus mehreren Messungen (n=3-111) und die berechneten Standardfehler sind in Balkendiagrammen angegeben. Für die Vergleichbarkeit der Messungen wurden die Mittelwerte der Kontrollzelllinien auf jeweils 100 % relativiert. Die weißen Balken repräsentieren die Kontrollzelllinien 416MI, GM02253F und HA169, die blauen, roten, grauen und violetten Balken die *ATM*-Defektlinien. Die Signifikanzen wurden mit dem ungepaarten Mann-Whitney-Test ermittelt. Signifikante Unterschiede zwischen Kontrollzelllinien und den *ATM*-Defektlinien wurden durch Sterne angezeigt. (*p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001). Die Darstellung der relativen Werte erfolgte logarithmisch. Die Zelllinien wurden mit 30 µg Plasmid-Mix bestehend aus 1/3 pCMV-I-SceI, 1/3 pBS und 1/3 DSBR-Plasmid transfiziert. Je nach untersuchtem DSBR-Mechanismus wurden die folgenden DSBR-Plasmide verwendet **A**) pEJ-EGFP (Absolutwerte in %: 416MI=0,041, GM02253F=0,030, HA169=0,025), **B**) p5'-EGFP/HR-EGFP (Absolutwerte in %: 416MI=0,796, GM02253F=0,430, HA169=0,262), **C**) pHR-EGFP/3'-EGFP (Absolutwerte in %: 416MI=0,637, GM02253F=0,466, HA169=0,228), **D**) pΔ-EGFP/3'-EGFP (Absolutwerte in %: 416MI=0,669, GM02253F=0,569, HA169=0,313), **E**) pHR-EGFP/5'-EGFP (Absolutwerte in %: 416MI=0,041, GM02253F=0,010, HA169=0,007). **F**) Nach Fixierung der Zellen mit Aceton/Ethanol und Färbung der DNA mit Propidiumiodid wurden die Zellpopulationen am Durchflusszytometer analysiert. Durch die Markierung der G1-, S- und G2-Phase-Subpopulationen wurde der prozentuale Anteil der Zellen in der jeweiligen Phase bestimmt. Der prozentuale Anteil der Populationen wurde so berechnet, dass die Summe aller drei Markerregionen (G1-, S- und G2-Phase) 100 % ergab. Die Mittelwerte aus mehreren Messungen (n=4-34) und die berechneten Standardabweichungen sind im Balkendiagramm angegeben. Die braunen Balken repräsentieren den Anteil der Zellen in der G1-Phase, die hellbraunen Balken in der S-Phase und die weißen Balken in der G2-Phase jeweils in Prozent.

4.1.5 Detektion eines DSBR-Defektmusters in lymphoblastoiden Zelllinien mit verschiedenen *CHEK2*-Mutationen

Nach der Detektion eines DSBes wird Chk2 durch ATM aktiviert und kann durch die anschließende Phosphorylierung von Brca1, Brca2 und p53 die Reparaturprozesse in Richtung fehlerfreier Reparatur lenken (Bahassi *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2004). Für die Bestimmung der DSBR-Aktivitäten nach *CHEK2*-Mutation wurden die in Tab. 7 dargestellten Zelllinien verwendet. Die Zelllinie HA455 weist neben der *CHEK2*- eine weitere Mutation im *NBN*-Gen auf. Die Zelllinie HA201 mit einer *ATM*- und *CHEK2*-Mutation wurde bereits im letzten Kapitel beschrieben (siehe Abschnitt 4.1.4).

Zelllinien	Klinischer Phänotyp	Aminosäure- bzw. Nukleotidveränderung	Effekt	Protein-expression
HA464	Brustkrebs	<i>CHEK2</i> (I157T/ I157T)	<i>Missense</i> -Mutation	normaler Chk2-Proteingehalt
HA456	gesunde Kontrolle	<i>CHEK2</i> (I157T/ I157T)	<i>Missense</i> -Mutation	normaler Chk2-Proteingehalt
HA455	Brustkrebs	<i>CHEK2</i> (del(9,10)/wt) <i>NBN</i> (657del5/wt)	Trunkierung/wt Trunkierung/wt	residualer Chk2-/Nbin-Gehalt

Tab. 7 *CHEK2*-Defektlinien mit klinischem Phänotyp, zugehörigen Mutationen und Änderungen im Chk2-Proteinniveau

Die in Abb. 20 dargestellten DSBR-Frequenzen der *CHEK2*-Defektlinien bezogen auf die Kontrollzelllinien 416MI, GM02253F und HA169 wiesen innerhalb dieser Gruppe widersprüchliche DSBR-Defektmuster auf. Für HA464 (*CHEK2* I157T/I157T) wurden signifikante Reduktionen für SSA und SSA/HR auf 30-60 % (Abb. 20 B-D) im Vergleich zu 416MI (auf 30 % für SSA $p=0,0001$; auf 50 % für SSA/HR lange Homologie $p=0,0051$; auf 50 % für SSA/HR kurze Homologie $p=0,0126$) und GM02253F (auf 60 % für SSA/HR lange Homologie $p=0,0050$; auf 60 % für SSA/HR kurze Homologie $p=0,0051$) detektiert. Am deutlichsten war die Reduktion der HR (Abb. 20 E) auf 15 % bzw. 30 % verglichen mit 416MI ($p<0,0001$) bzw. GM02253F ($p=0,0179$). Entsprechend dieser Ergebnisse wies diese *CHEK2*-Defektlinie eine große Übereinstimmung mit dem bereits etablierten *NBN/RAD50*-DSBR-Defektmuster auf.

Die Zelllinie HA456, welche die gleiche homozygote *CHEK2*-Mutation (I157T/I157T) aufwies wie die HA464, jedoch aus einer gesunden Kontrollprobandin etabliert wurde, demonstrierte in Bezug auf die Kontrollzelllinien widersprüchliche DSBR-Defektmuster. Verglichen mit 416MI konnten für SSA, SSA/HR sowie HR (Abb. 20 B-E) signifikante Senkungen der DSBR-Frequenzen auf 30-60 % (auf 30 % für SSA $p=0,0002$; auf 60 % für SSA/HR lange Homologie $p=0,0012$; auf 55 % für SSA/HR kurze Homologie $p=0,0001$; auf 60 % für HR $p=0,0073$) ermittelt werden, bezogen auf HA169 wurden jedoch 2-8,5-fache Erhöhungen (2-fach für SSA $p=0,0102$; 2,5-fach für SSA/HR lange Homologie $p=0,0001$; 2,5-fach für SSA/HR kurze Homologie $p=0,0035$; 8,5-fach für HR $p=0,0047$) detektiert. Damit würde die HA456 zumindest bezogen auf die 416MI dem *NBN/RAD50*-DSBR-Defektmuster zugeordnet werden.

Im Gegensatz dazu wurde für die *CHEK2/NBN*-Defektlinie HA455 für alle untersuchten DSBR-Wege signifikante Erhöhungen in Bezug zu den Kontrollzelllinien ermittelt (Abb. 20 A-E). Für NHEJ konnten 2,5-10-fache Steigerungen im Vergleich 416MI (2,5-fach $p=0,0499$), GM02253F (4,5-fach $p=0,0198$) und HA169 (10-fach $p=0,0214$) detektiert

werden. Die SSA- und SSA/HR-Frequenzen (Abb. 20 B-D) wiesen signifikante 2-9-fache Erhöhungen im Vergleich zu den Kontrollzelllinien auf, wobei die markantesten Effekte im Vergleich zu HA169 (9-fach für SSA $p=0,0002$; 8-fach für SSA/HR lange Homologie $p=0,0002$; 9-fach für SSA/HR kurze Homologie $p=0,0002$) bestanden. Interessanterweise konnten für die HR (Abb. 20 E) deutliche Steigerungen um das 4- (bezogen auf 416MI $p=0,0004$) bis 34-fache (verglichen mit HA169 $p=0,0022$) festgestellt werden. Diese DSBR-Aktivitäten wiesen eine starke Ähnlichkeit mit dem unter Abschnitt 4.1.7 gezeigten *TP53*-Defektmuster auf.

Entsprechend dieser Ergebnisse konnten für die in dieser Arbeit analysierten *CHEK2*-Mutationen kein einheitliches, spezifisches DSBR-Defektmuster herauskristallisiert werden. Der Vergleich der Zellzyklusverteilung (Abb. 20 F) zwischen den Kontroll- und *CHEK2*-Defektlinien ergab signifikante Unterschiede für HA455 in Bezug auf alle Kontrollzelllinien (G1 $p<0,0001$). HA455 wies einen G1-Anteil von ca. 74 %, sowie einen S-/G2-Anteil von jeweils 13 % auf, während für HA464, HA456 und die Kontrollzelllinien ca. 60 % der Zellen in der G1-Phase, 20 % in der S-Phase und 20 % in der G2-Phase detektiert wurden (Abb. 20 F).

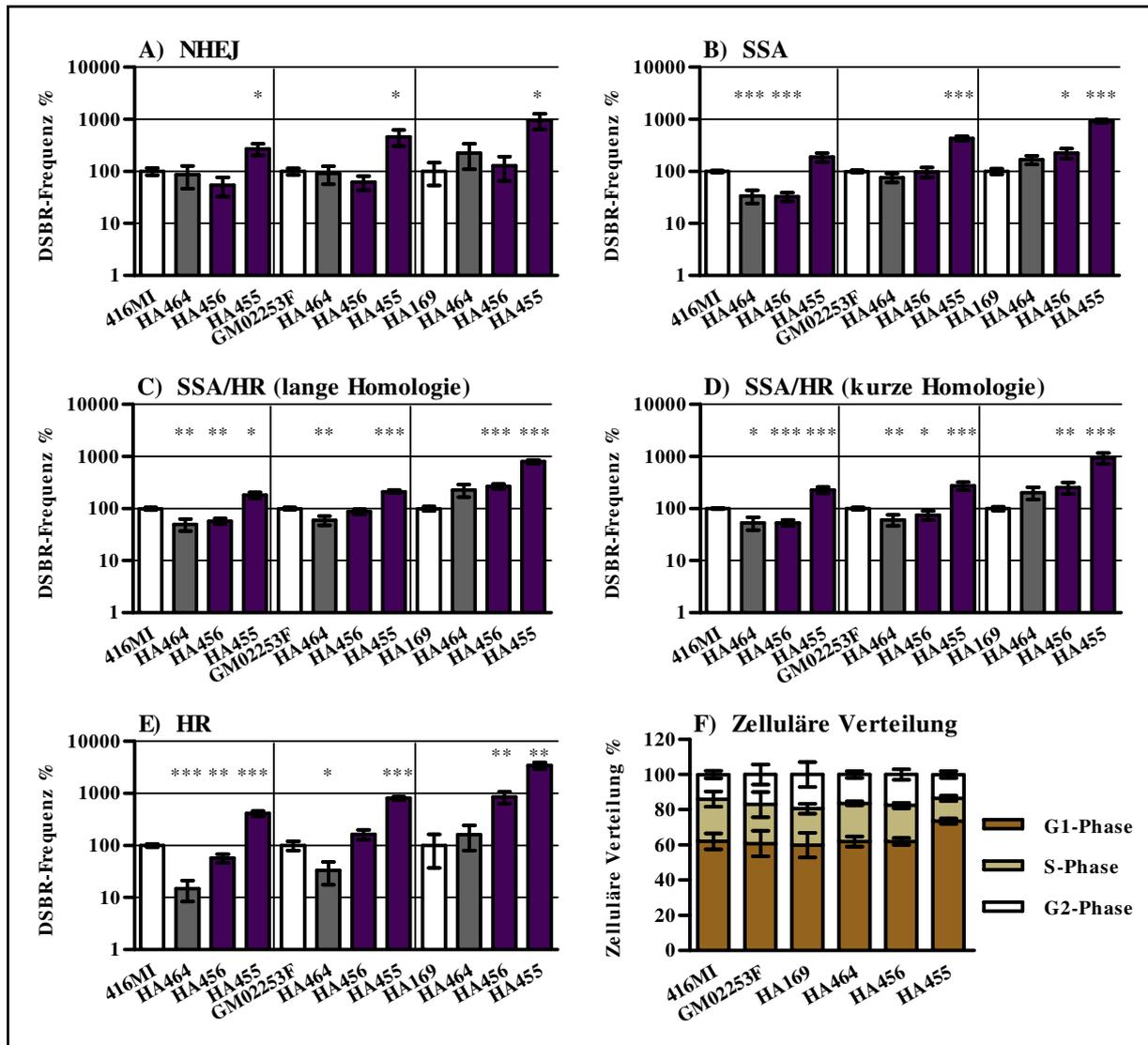


Abb. 20 Bestimmung der DSBR-Unterschiede und Zellzyklusanalyse zwischen *CHEK2*-Defekt- und Kontrollzelllinien zur Etablierung der DSBR-Defektmuster für die *CHEK2*-Genmutationen

Für die Bestimmung der DSBR-Ereignisse wurden die Zellen mit einem Mix aus DSBR-, pCMV-I-SceI-Expressions- und pBS-Kontrollplasmid transfiziert, 24 h kultiviert und anschließend der Anteil grün fluoreszierender Zellen am Durchflusszytometer bestimmt. Die Mittelwerte aus mehreren Messungen (n=6-12) und die berechneten Standardfehler sind in Balkendiagrammen angegeben. Für die Vergleichbarkeit der Messungen wurden die Mittelwerte der Kontrollzelllinien jeweils auf 100 % relativiert. Die weißen Balken repräsentieren die Kontrollzelllinien 416MI, GM02253F und HA169, die grauen und violetten Balken die *CHEK2*-Defektlinien HA464, HA456, HA455. Die Signifikanz wurde mit dem ungepaarten Mann-Whitney-Test ermittelt. Signifikante Unterschiede zwischen Kontrollzelllinien und den *CHEK2*-Defektlinien wurden durch Sterne angezeigt. (*p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001). Die Darstellung der relativen Werte erfolgte logarithmisch. Die Zelllinien wurden mit 30 µg Plasmid-Mix bestehend aus 1/3 pCMV-I-SceI, 1/3 pBS und 1/3 DSBR-Plasmid transfiziert. Je nach untersuchtem DSBR-Mechanismus wurden die folgenden DSBR-Plasmide verwendet **A)** pEJ-EGFP (Absolutwerte in %: 416MI=0,021, GM02253F=0,013, HA169=0,006), **B)** p5'-EGFP/HR-EGFP (Absolutwerte in %: 416MI=0,716, GM02253F=0,233, HA169=0,099), **C)** pHR-EGFP/3'-EGFP (Absolutwerte in %: 416MI=0,411, GM02253F=0,262, HA169=0,083), **D)** pΔ-EGFP/3'-EGFP (Absolutwerte in %: 416MI=0,529, GM02253F=0,365, HA169=0,131), **E)** pHR-EGFP/5'-EGFP (Absolutwerte in %: 416MI=0,059, GM02253F=0,020, HA169=0,005). **F)** Nach Fixierung der Zellen mit Aceton/Ethanol und Färbung der DNA mit Propidiumiodid wurden die Zellpopulationen am Durchflusszytometer analysiert. Durch die Markierung der G1-, S- und G2-Phase-Subpopulationen wurde der prozentuale Anteil der Zellen in der jeweiligen Phase bestimmt. Der prozentuale Anteil der Populationen wurde so berechnet, dass die Summe aller drei Markerregionen (G1-, S- und G2-Phase) 100 % ergab. Die Mittelwerte aus mehreren Messungen (n=4-34) und die berechneten Standardabweichungen sind im Balkendiagramm angegeben. Die braunen Balken repräsentieren den Anteil der Zellen in der G1-Phase, die hellbraunen Balken in der S-Phase und die weißen

Balken in der G2-Phase jeweils in Prozent.

4.1.6 Western-Blot-Analyse zu den lymphoblastoiden Zelllinien

Um Unterschiede im Proteinexpressionsmuster der lymphoblastoiden Zelllinien zu detektieren, wurden Western-Blot-Analysen durchgeführt. Hierbei erfolgte der Nachweis der DSBR-Faktoren ATM, Brca2, DNA-PKcs, Brca1, Nibrin, Rad51, Chk2 und p53. Für die Zelllinie HA239 mit *RAD50*-Mutation hatte Dörk und Mitarbeiter bereits gezeigt, dass die Rad50-Expression sehr gering ist (Waltes *et al.*, 2009). Als Ladekontrolle wurde Tubulin detektiert (Abb. 21).

Die Western-Blot-Analysen der *BRCA1*-Defektlinien HA166 (*BRCA1* C61G/wt; Abb. 21, Spur 18) und HCC1937BL (*BRCA1* 5382insC/wt; Abb. 21, Spur 22) zeigten trotz heterozygoter Mutationen nur eine residuale Expression des *BRCA1*-Genproduktes im Vergleich zur Kontrollzelllinie HA169 (Abb. 21, Spur 21) auf. Für HCC1937BL und HA166 konnte erst nach langer Exposition der Autoradiographien ein um ca. 30-50-fach vermindertes Brca1-Expressionsniveau detektiert werden (Anhang 9.4, Tab. 15). Da Brca1 zwar Zellzyklus-abhängig exprimiert wird, aber die Zelllinien ähnliche Zellzyklusverteilungen wie die Kontrollen aufwiesen (Abschnitt 4.1.1, Abb. 16 F), kann dies nicht erklären, weshalb die Mutation in einem Allel des *BRCA1*-Genes zu einer fast vollständigen Inhibierung der Brca1-Proteinexpression führte (Abb. 21). Interessanterweise hatten jedoch bereits Baldeyron *et al.* 2002 beobachtet, dass unterschiedliche heterozygote *BRCA1*-Mutationen zu einer mehr als 50 %igen Abnahme der Brca1-Proteinniveaus führten (Baldeyron *et al.*, 2002). Demgegenüber konnte im Vergleich zur Kontrollzelllinie HA169 für HA166 ein vergleichbares Expressionsniveau an Brca2, ATM, DNA-PKcs, Nibrin, Chk2 und p53 nachgewiesen werden. Des Weiteren könnten die im Vergleich zur HA166 verminderten DSBR-Aktivitäten an NHEJ, SSA und HR der Zelllinie HCC1937BL (Abschnitt 4.1.1, Abb. 16) möglicherweise auf die reduzierte Nibrin-Expression in HCC1937BL zurückzuführen sein (Abb. 21), da Nibrin als Bestandteil des MRN-Komplexes sowohl für das Mikrohomologie-gerichtete NHEJ als auch für SSA und HR essentiell ist (Howlett *et al.*, 2006). Zusätzlich konnte bereits für den *NBN*-DSBR-Defekttyp eine Senkung für NHEJ und SSA detektiert werden (siehe Abschnitt 4.1.3).

Die Western-Blot-Analyse der *BRCA2*-Defektzelllinie HA238 (*BRCA2* 5946delCT/wt, Abb. 21, Spur 2) wies im Vergleich zu den Kontrollzelllinien 416MI (Abb. 21, Spur 1) und HA169 (Abb. 21, Spur 7) eine deutliche Reduktion der Brca2-Proteinexpression auf. Im Vergleich zu der Kontrollzelllinie 416MI konnte, wie für Heterozygotie erwartet, eine um 50 % gesenkte Brca2-Expression detektiert werden (Anhang 9.4, Tab. 15). Die Expressionsniveaus von

Brca1, ATM, DNA-PKcs, Nibrin, Rad51, Chk2, mit Ausnahme von p53, ließen dagegen eine große Übereinstimmung zwischen Kontroll- und *BRCA2*-Defektlinie erkennen.

Für die *NBN*-Defektzelllinie HA226 (*NBN* 657del5/657del5) konnte deutlich der Verlust des 95 kDa großen Nibrin-Proteins (Abb. 21, Spur 8) im Vergleich zu den *ATM*-Defektlinien HA388 und HA126 (Abb. 21, Spur 10, 11) sowie zu den Kontrollzelllinien (Daten nicht gezeigt) detektiert werden. In der Gesamt-Autoradiographie wurde jedoch ein kürzeres Fragment des Nibrin-Proteins mit einer Größe von 70 kDa nachgewiesen (Daten nicht gezeigt).

Für die *RAD50*-Defektlinie HA239 (*RAD50* R1099X/X1313Y) wurde ebenfalls ein sehr geringes Expressionsniveau an Nibrin (Abb. 21, Spur 9) detektiert. Im Vergleich zu 416MI (Daten nicht gezeigt) konnte eine ca. 20-fach verminderte Nibrin-Expression ermittelt werden (Anhang 9.4, Tab. 15). Dies könnte unter anderem ein Grund für die große Übereinstimmung der DSBR-Defektmuster der *NBN*- und *RAD50*-Defektlinien HA226 und HA239 sein (siehe Abschnitt 4.1.3).

In der Western-Blot-Analyse der *ATM*-Defektlinien konnte für HA56 (Abb. 21, Spur 4), HA126 (Spur 11), HA433 (Spur 5) und GM01526E (Spur 20) infolge der trunkierenden *ATM*-Mutationen kein Protein detektiert werden (Chenevix-Trench *et al.*, 2002; Dörk *et al.*, 2004; Lavin *et al.*, 2004; Sandoval *et al.*, 1999), für die *ATM*-Defektlinien HA204 (Spur 19), HA101 (Spur 3), HA388 (Spur 10) und HA201 (Spur 6) mit heterozygoten Mutationen bzw. Punktmutationen war zumindest nach langer Exposition der Autoradiographie der *ATM*-Proteinnachweis möglich (Daten nicht gezeigt). Die Reduktion des *ATM*-Expressionsniveaus für HA201 um 50 % im Vergleich zu der Kontrollzelllinie 416MI entsprach der für Heterozygotie erwarteten Senkung (Anhang 9.4, Tab. 15). Für die *ATM*-Defektlinien HA306, HA202 und HA187 konnte der Nachweis des *ATM*-Proteins nicht erfolgen, da die Zellausbeute zu gering ausfiel, um Western-Blot-Analysen durchzuführen (Anhang 9.4, Tab. 15).

Interessanterweise konnte in der *ATM*-Defektlinie HA204 (Abb. 21, Spur 19) ein sehr geringes p53-Expressionsniveau (Anhang 9.4, Tab. 15) im Vergleich zu den Kontrollzelllinien HA169 (Abb. 21, Spur 19) und 416MI (Banden für 416MI nicht gezeigt) detektiert werden, was möglicherweise für den verminderten G1-Anteil der HA204-Zellen in der Zellzyklusverteilung verantwortlich ist (Abschnitt 4.1.4, Abb. 19 F). Demgegenüber konnte auch für HA388 ein sehr geringer p53-Proteingehalt (Anhang 9.4, Tab. 15) detektiert werden (Abb. 21, Spur 10), wobei für diese Zelllinie keine Unterschiede im

Zellzyklusverteilungsmuster im Vergleich zu den Kontrollzelllinien ermittelt wurde (Abschnitt 4.1.4, Abb. 19 F).

Insgesamt konnten für die *ATM*-Defektlinie HA204 auch deutlich höhere NHEJ- und SSA-Frequenzen detektiert werden, als für die ebenfalls in der *BRCA1*-DSBR-Defekttyp eingruppierte *ATM*-Defektlinie GM01526E (Abschnitt 4.1.4, Abb. 19 A-D). In diesem Zusammenhang könnte die verminderte p53-Expression von HA204 (Abb. 21, Spur 19) auch für die Erhöhung der DSBR-Frequenzen im Vergleich zur GM01526E mit verantwortlich sein (Akyüz *et al.*, 2002).

Wie die Western-Blot-Analyse zeigte, konnte für alle *CHEK2*-Defektlinien HA201, HA455, HA456 und HA464 (Abb. 21, Spur 6, 13-15) das Genprodukt Chk2 nachgewiesen werden.

Mit Ausnahme der verminderten Chk2- und Nibrin-Expression der Zelllinie HA455 (Abb. 21, Spur 13 und Anhang 9.4, Tab. 15) wiesen die *CHEK2*-Defektlinien HA456 (Spur 14) und HA464 (Spur 15) mit 416MI, HA169 und GM02253F (Spur 12, 16, 17) vergleichbare Proteingehalte an Brca1, Brca2, ATM, DNA-PKcs, Nibrin, Chk2, Rad51 und p53 auf. Möglicherweise wies HA455 durch die 5-fach verminderte Chk2-Expression einen G1-Anteil von ca. 74 %, sowie einen S-/G2-Anteil von jeweils 13 % in der Zellzyklusverteilung auf, während für HA464, HA456 und die Kontrollzelllinien ca. 60 % der Zellen in der G1-Phase und jeweils 20 % in der G2-Phase detektiert wurden (Abschnitt 4.1.5, Abb. 20 F).

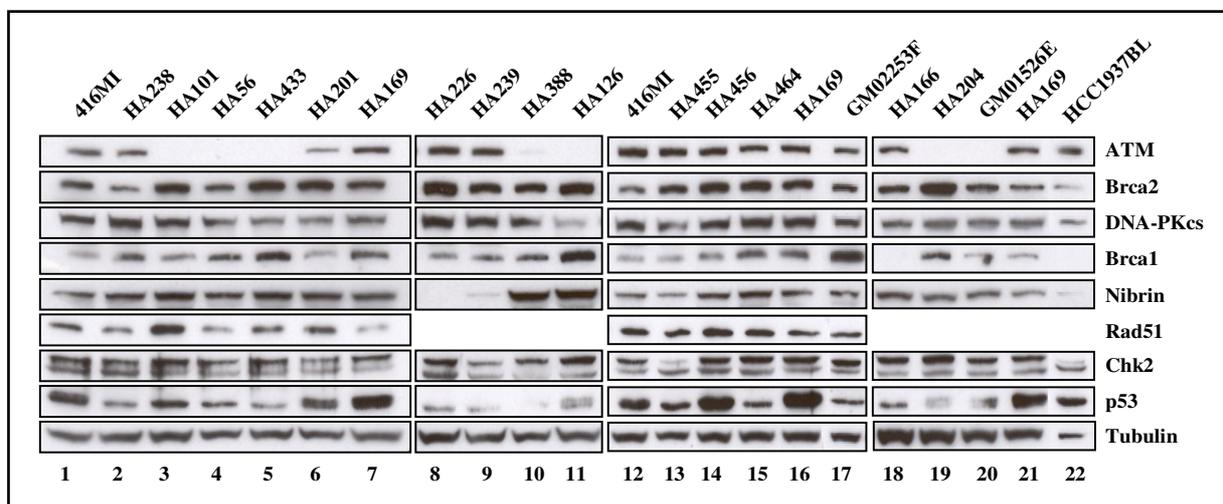


Abb. 21 Western-Blot-Analyse zu den lymphoplastoiden Zelllinien

Western-Blot zum Nachweis von ATM, Brca2, DNA-PKcs, Brca1, Nibrin, Rad51, Chk2, p53 und Tubulin. Die Zellhomogenate unbehandelter Zellen wurden auf einem 4-12 %igem Gradientengel aufgetrennt, auf Nitrocellulose-Membran transferiert und die Proteine durch Antigen-Antikörper-Reaktionen detektiert. Als spezifische Primär-Antikörper wurden Anti-Brca1 (Ab-1, 1/100), Anti-Brca2 (OP-95, 1/100), Anti-ATM (5C2, 1/1000) Anti-DNA-PKcs (Cocktail, 1/1000), Anti-Nbs1 (Y112, 1/1000), Anti-Chk2 (H-300, 1/500), Anti-p53 (DO-1, 1/10000) und Anti-GAPDH (ab9484, 1/2500) eingesetzt. Als Sekundär-Antikörper wurden Anti-Maus- und Anti-Kaninchen-konjugiert mit Peroxidase (1/1000 bis 1/10000) verwendet.

4.1.7 Nachweis eines DSB-Defektmusters in adhärenen Zelllinien mit verschiedenen TP53-Mutationen

4.1.7.1 DSB-Aktivitäten in verschiedenen Brustepithelzelllinien mit differentiellen TP53-Status

Ausgehend von der Beobachtung, dass in zwei lymphoblastoiden Zelllinien mit differentiellem p53-Status und in Erythroleukämiezellen ohne bzw. mit exogenem p53 eine inhibierende Wirkung von wtp53 auf HR und NHEJ, nicht jedoch auf SSA festgestellt wurde (Akyüz *et al.*, 2002), sollte in dieser Arbeit untersucht werden, ob diese Tatsache auch auf endogenes p53 zutrifft. Des Weiteren sollte überprüft werden, wie TP53-Mutationen, welche in Brustkrebszelllinien beschrieben worden, sich auf die DSB-regulatorischen Aktivitäten von p53 auswirken. Für die Analyse der DSB-Aktivitäten in Abhängigkeit vom TP53-Status konnte auf neun adhärenente Brustkrebszelllinien und zwei nicht-transformierte Epithelzelllinien der Brust (MCF10a und MCF12a) zurückgegriffen werden. In Tab. 8 wurden die verwendeten Zelllinien, deren klinischer Phänotyp, TP53-Status und die Proteinexpression bezogen auf MCF12a dargestellt. In Abb. 22 ist die Morphologie der Zellen sowie eine fluoreszenzmikroskopische Aufnahme nach Transfektion mit pwtEGFP zu sehen.

Zelllinien	Klinischer Phänotyp	TP53-Status	relative p53-Proteinexpression bezogen auf MCF12a
MCF10a	fibrozystische Veränderung der Brustdrüse	wt	0,5
MCF12a	keine Erkrankung	wt	1
MCF7	Brustkrebs	wt	0,4
MDA-MB-436	Brustkrebs	E204ins7	0,0
MDA-MB-134 IV	Brustkrebs	E285K/wt	0,4
MDA-MB-453	Brustkrebs	368del30bp	0,2
UACC-893	Brustkrebs	R342X	0,3
MDA-MB-468	Brustkrebs	R273H	0,4
BT-20	Brustkrebs	K132Q	2,2
T47-D	Brustkrebs	L194F	4,7
MDA-MB-231	Brustkrebs	R280K	4,2

Tab. 8 Adhärenente Zelllinien der Brust, klinischer Phänotyp, deren TP53-Status und p53-Proteingehalt im Vergleich zur Kontrollzelllinie MCF12a

Die p53-Menge von MCF12a wurde als 1 definiert. Die p53-Proteinexpressionsniveaus aller anderen Zelllinien wurden auf MCF12a bezogen.

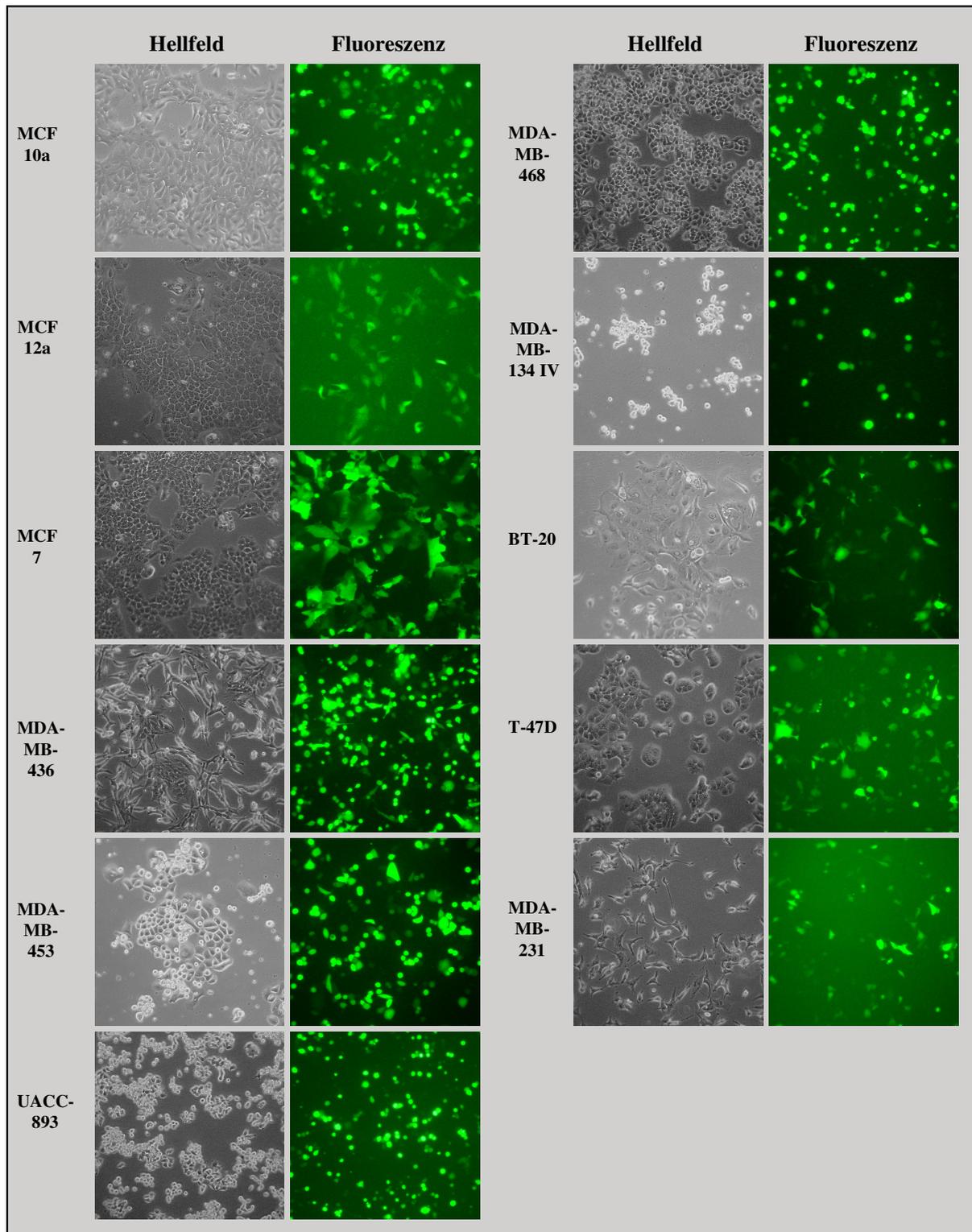


Abb. 22 Hellfeld- und fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der verwendeten nicht-transformierten Brustepithel- sowie der Brustkrebszelllinien

Die Hellfeldaufnahmen der Zellen erfolgten am Tag der Transfektion, die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen wurden 24 h nach Transfektion der Zellen mit pwtEGFP mit 10-facher Vergrößerung aufgenommen. Für die Bearbeitung der Bilder wurde das Bildbearbeitungsprogramm Gimp 2.6.4 verwendet.

Wie in Abb. 23 ersichtlich, konnte in allen Zelllinien mit Ausnahme von MDA-MB-436 (Abb. 23, Spur 5) das p53-Protein nachgewiesen werden. Auffallend war der zwischen den einzelnen Linien stark schwankende Proteingehalt von p53. Zum besseren Vergleich wurden

die Bandenintensitäten quantifiziert, unter Bezug auf die Ladekontrolle (GAPDH/Aktin) normalisiert und auf MCF12a relativiert in Tab. 8 dargestellt. Dabei ist erkennbar, dass die *TP53*-Defektlinien MDA-MB134 IV, MDA-MB-453, UACC893 und MDA-MB-468 sowie die *wtTP53*-Linien MCF10a und MCF7 einen 2-5-fach geringeren, die Linien BT-20, T47-D und MDA-MB-231 einen 2-5-fach höheren p53-Proteingehalt aufwiesen.

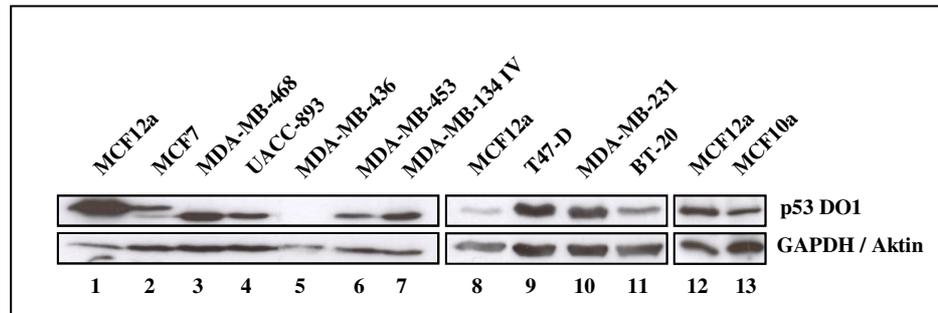


Abb. 23 Western-Blot-Analyse zu den Brustepithelzelllinien mit *wtp53* und Mutanten-p53

Western-Blot zum Nachweis von p53, GAPDH und Aktin. Die Zellhomogenate nicht behandelter Zellen wurden auf einem 12%igem SDS-Gel aufgetrennt, auf Nitrocellulose-Membran transferiert und die Proteine durch Antigen-Antikörper-Reaktionen detektiert. Als spezifische Primär-Antikörper wurden Anti-p53 (DO-1, 1/10000), Anti-GAPDH (ab9484, 1/2500) und Anti-Aktin (Ab-1, 1:10000) eingesetzt. Als Sekundär-Antikörper wurden Anti-Maus- und Anti-Kaninchen-konjugiert mit Peroxidase (1/1000 bis 1/10000) verwendet.

Für die Untersuchung der DSB-R-Aktivitäten wurde zusätzlich zu den bereits beschriebenen DSB-R-Plasmiden pEJ-EGFP (NHEJ), p5'-EGFP/HR-EGFP (SSA), pHR-EGFP/3'-EGFP (SSA/HR lange Homologie), pΔ-EGFP/3'-EGFP (SSA/HR kurze Homologie) und pHR-EGFP/3'-EGFP (HR) als weiteres Konstrukt pΔ-EGFP/5'-EGFP zur Überprüfung der HR, mit einer um 46bp verkürzten Homologielänge, verwendet. Dieses zusätzliche HR-Substrat wurde eingesetzt, da frühere Analysen gezeigt hatten, dass gerade mit dieser die HR-kontrollierende Wirkung von *wtp53* am besten nachgewiesen werden kann (Akyüz *et al.*, 2002). Die adherenten Zelllinien wurden per Nukleofektion mit DNA-Mixen bestehend aus DSB-R-, pCMV-I-SceI-Expressions- und pBS-Kontrollplasmid transfiziert, 24 h kultiviert und der Anteil grün fluoreszierender Zellen am Durchflusszytometer ermittelt. Mit der Nukleofektion konnte eine Transfektionseffizienz mit *pwtEGFP* von bis zu 85 % erreicht werden (Abb. 22). Die erhaltenen Anteile grün fluoreszierender Zellen wurden mit der Transfektionseffizienz korrigiert und so die individuellen DSB-R-Frequenzen für die transfizierten Zellen errechnet.

Beim Vergleich der DSB-R-Frequenzen (Abb. 24 A-F) in den Zelllinien mit *wtTP53*-Gen konnten Unterschiede von ein bis zwei Zehnerpotenzen zwischen den nicht-transformierten Epithelzelllinien MCF10a und MCF12a sowie der Brustkrebszelllinie MCF7 ermittelt werden.

MDA-MB-436, die einzige Brustkrebszelllinie ohne p53-Protein, zeigte im Vergleich zu MCF7 mit einem 9-fachen (für HR lange Homologie $p=0,0005$) und 19-fachen Anstieg (für HR kurze Homologie $p=0,0007$) die höchsten DSB-Frequenzen in der HR (Abb. 24 E-F). Weiterhin war MDA-MB-436 die einzige Zelllinie, bei der beim Vergleich der HR von verkürzter ($p\Delta$ -EGFP/5'-EGFP) zu langer Homologielänge (p HR-EGFP/5'-EGFP) eine Verschiebung zugunsten der verkürzten Homologielänge detektiert wurde (siehe Tab. 9). Dies könnte auf einen Defekt in der Diskriminierung zwischen perfekt und nur teilweise homologen Sequenzen hindeuten. Eine 2-fache signifikante Erhöhung der DSB-Frequenzen (Abb. 24 A-D) in MDA-MB-436 bezogen auf MCF7 konnte für NHEJ ($p=0,0131$), SSA und SSA/HR (SSA $p=0,0022$; SSA/HR lange Homologie $p=0,0471$; SSA/HR kurze Homologie $p=0,0014$) ermittelt werden.

Die DSB-Daten von NHEJ und SSA der Zelllinie MDA-MB-134 IV mit heterozygotem *TP53*-Allel (Abb. 24 A-B) befanden sich im Bereich der nicht transformierten Epithelzelllinien MCF10a und MCF12a, die DSB-Ereignisse für SSA/HR und HR lagen unabhängig von der Homologielänge zwischen MCF12a und MCF7 (Abb. 24 C-F).

Mit 4- bzw. 3-fach erhöhten NHEJ- ($p=0,0009$), SSA- und SSA/HR-Frequenzen (SSA $p=0,0022$, SSA/HR kurze Homologie $p=0,0006$) im Vergleich zu MCF7, wies die *TP53*-Defektlinie MDA-MB-453 (Abb. 24 A, B, D) mit der C-terminal trunkierenden Mutation 367del30bp den höchsten Anteil an fehlerhaften DSB-Frequenzen auf. Demgegenüber waren die Werte für die HR unabhängig von der zur Verfügung stehenden Homologielänge im Vergleich zu MCF7 2-fach erhöht (Abb. 24 E-F: HR lange Homologie $p=0,0142$; HR kurze Homologie $p=0,0104$).

Für die Zelllinie UACC-893, die ein C-terminal weiter verkürztes p53 (R342X) exprimierte, konnte eine 2,5-4-fache Erhöhung der HR nachgewiesen werden (Abb. 24 E-F, 2,5-fach für HR lange Homologie $p=0,0027$, 4-fach für HR kurze Homologie $p=0,0016$), wobei SSA im Vergleich zu MCF7 unverändert war (Abb. 24 B) und NHEJ um 50 % verminderte Frequenzen (Abb. 24 A, $p=0,0023$) aufwies.

Während die MDA-MB-453 im Vergleich zu MCF7 die größten Unterschiede in NHEJ aufzeigte, konnten für UACC-893 wie auch für MDA-MB-436 die größten Unterschiede bezüglich der HR nachgewiesen werden.

MDA-MB-468 (*p53*-273H) wies im Vergleich zu MCF7 ähnliche Werte für die HR (Abb. 24 E-F), eine 2-fache Erhöhung für SSA und SSA/HR (Abb. 24 B-D: SSA $p=0,0022$; SSA/HR lange Homologie $p=0,0323$; SSA/HR kurze Homologie $p=0,0006$) und eine

Senkung der DSBR-Frequenzen für NHEJ auf 50 % des Kontrollwertes (Abb. 24 A, $p=0,0441$) auf.

Mit Ausnahme von SSA und SSA/HR der Zelllinie T47-D (Abb. 24 B-D) zeigten alle Linien mit einem hohen Proteingehalt an mutiertem *TP53* (BT-20, T47-D, MDA-MB-231) DSBR-Frequenzen im Bereich der Epithelzelllinie MCF12a, womit geschlossen werden könnte, dass hohe Expressionsniveaus an mutiertem p53 die gleichen Effekte in der Kontrolle der DSBR leisten, wie geringe Proteinexpressionsniveaus an wtp53. Weiterhin wurde die Diskriminierung zwischen ausreichender und verkürzter Homologielänge in der HR durch Vergleich von Δ -EGFP/5'-EGFP- versus HR-EGFP/5'-EGFP-Konstrukten untersucht, wobei Werte nahe des Detektionslimits ($<0,010$) nicht beachtet wurden (Tab. 9). Dabei konnte für MCF7 eine signifikante Senkung von HR mit kurzer Homologie ($p=0,011$), jedoch keine statistisch relevante Reduktion für die Brustkrebszelllinien MDA-MB-436, MDA-MB-134VI, UACC-893 und MDA-MB-468 analysiert werden (Tab. 9). Dies könnte auf eine verminderte Diskriminierungsfähigkeit zwischen perfekt homologen und divergierenden Sequenzen in den homozygot-mutierten *TP53*-Defektlinien mit mäßiger p53-Expression hindeuten.

Beim Vergleich der verkürzten ($p\Delta$ -EGFP/3'-EGFP) und ausreichenden Homologielänge (p HR-EGFP/3'-EGFP) in den Substraten zur Messung von SSA/HR konnte für die Brustkrebszelllinien maximal eine 1,4-fache Reduktion von verkürzter zu ausreichender Homologielänge errechnet werden. Im Vergleich dazu wurde für MCF7 ein 3,8-facher Unterschied analysiert (siehe Tab. 9).

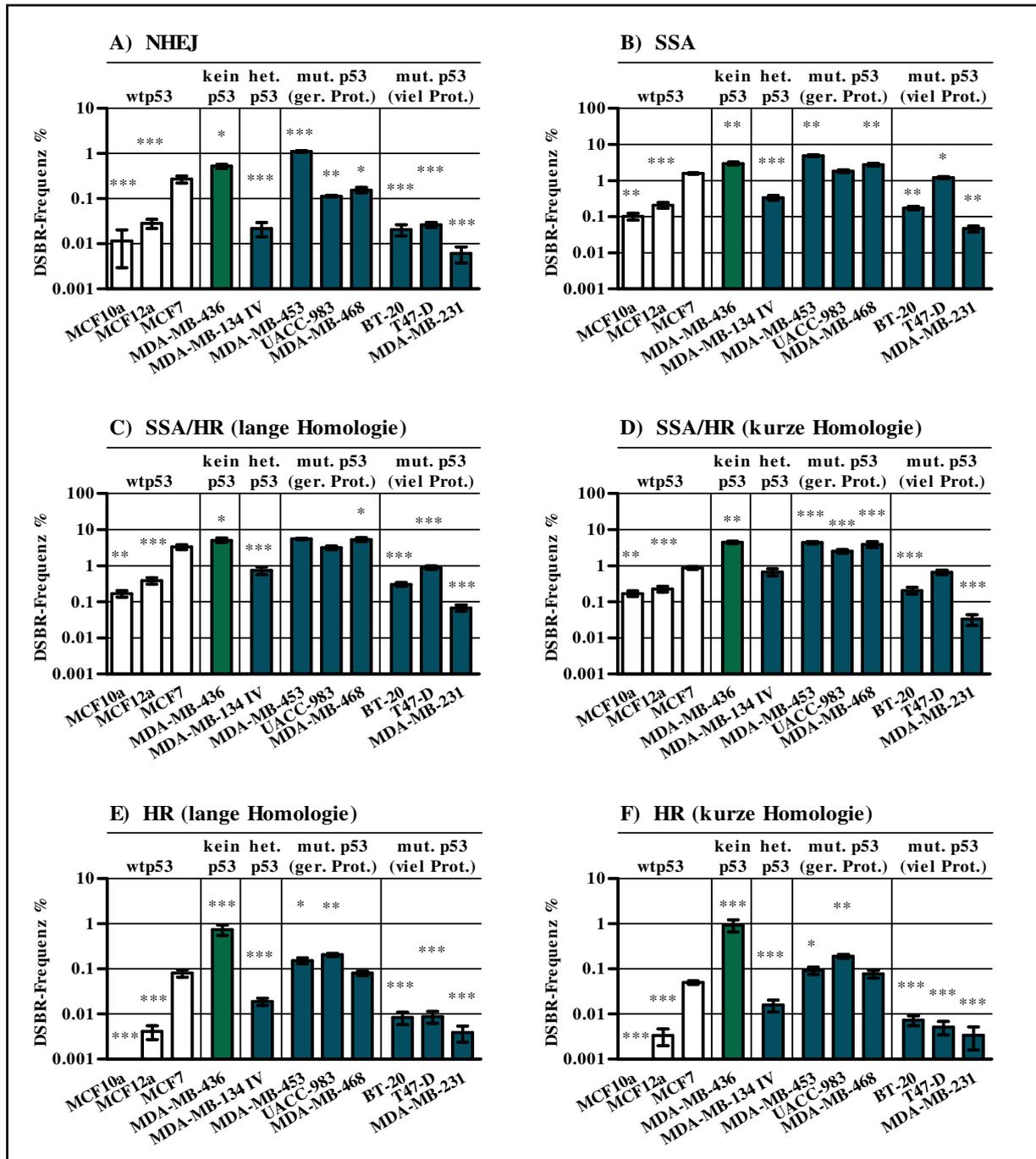


Abb. 24 Bestimmung der DSBR-Unterschiede zwischen Brustepithelzelllinien mit wtp53 und Mutanten-p53

Für die Bestimmung der DSBR-Ereignisse wurden die Zellen mit einem Mix aus DSBR-, pCMV-I-SceI-Expressions- und pBS-Kontrollplasmid transfiziert, 24 h kultiviert und anschließend der Anteil grün fluoreszierender Zellen am Durchflusszytometer bestimmt. Die Mittelwerte aus mehreren Messungen (n=3-24) und die berechneten Standardfehler sind in Balkendiagrammen als Absolutwerte angegeben. Die weißen Balken repräsentieren die wtp53-Zelllinien MCF10a, MCF12a und MCF7, die grünen und türkisen Balken die p53-Defektlinien. Abkürzungen: wt=Wildtyp, het.=heterozygote Mutation, mut.=mutiertes, ger.=geringe, Prot.=Proteinmenge. Die Signifikanzen wurden mit dem ungepaarten Mann-Whitney-Test ermittelt. Signifikante Unterschiede zwischen MCF7, den weiteren wtTP53-Zelllinien MCF10a und MCF12a sowie den TP53-Defektzelllinien wurden durch Sterne angezeigt. (*p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001). Die Darstellung der absoluten Werte erfolgte logarithmisch. Die Zelllinien wurden mit 5 µg Plasmid-Mix bestehend aus 1/3 pCMV-I-SceI, 1/3 pBS und 1/3 DSBR-Plasmid transfiziert. Je nach untersuchten DSBR-Mechanismus wurden die folgenden DSBR-Plasmide verwendet **A)** pEJ-EGFP, **B)** p5'-EGFP/HR-EGFP, **C)** pHR-EGFP/3'-EGFP, **D)** pΔ-EGFP/3'-EGFP, **E)** pHR-EGFP/5'-EGFP, **F)** pΔ-EGFP/5'-EGFP.

Zelllinie	NHEJ	SSA	SSA/HR		HR	
			lange H.	kurze H.	lange H.	kurze H.
MCF10a	0,012	0,102	0,170	0,170	0,000	0,000
MCF12a	0,028	0,208	0,386	0,228	0,004	0,003
MCF7	0,270	1,589	3,335	0,872	0,081	0,050
MDA-MB-436	0,522	2,974	5,101	4,463	0,744	0,936
MDA-MB-134 IV	0,022	0,337	0,748	0,675	0,019	0,016
MDA-MB-453	1,108	4,914	5,539	4,341	0,153	0,093
UACC-893	0,114	1,818	3,158	2,529	0,205	0,190
MDA-MB-468	0,155	2,771	5,304	3,892	0,081	0,078
BT-20	0,021	0,178	0,305	0,206	0,008	0,007
T47-D	0,026	1,211	0,895	0,661	0,009	0,005
MDA-MB-231	0,006	0,047	0,068	0,033	0,004	0,003

Tab. 9 DSBR-Frequenzen der Brustepithelzelllinien

Für die Bestimmung der DSBR-Frequenzen wurden die Brustepithelzellen mit einem Mix aus DSBR-, pBS- und pCMV-I-SceI Expressionsplasmid transfiziert, 24 h kultiviert und anschließend der Anteil grün fluoreszierender Zellen am Durchflusszytometer bestimmt und mit der Transfektionseffizienz (wtEGFP) korrigiert. NHEJ (pEJ-EGFP), SSA (p5'-EGFP/HR-EGFP)SSA/HR lange Homologie (pHR-EGFP/ 3'-EGFP), SSA/HR kurze Homologie (pΔ-EGFP/3'-EGFP), HR lange Homologie (pHR-EGFP/5'-EGFP) und HR kurze Homologie (pΔ-EGFP/5'-EGFP). Abkürzung H.=Homologie

4.1.7.2 Veränderung der DSBR-Aktivitäten nach p53-knockdown in Brustepithelzelllinien mit differentiellem TP53-Status

Für die Bestimmung der spezifischen Aufgaben von p53 bei der Kontrolle der DSBR wurden die elf Brustepithelzelllinien mit DSBR-Plasmiden und pSuper-p53 zur Senkung der p53-Expression mittels RNA-Interferenz transfiziert. Die Überprüfung des *knockdowns* in allen p53-positiven Zelllinien ergab eine Senkung der p53-Proteinexpression um 60-94 % (Abb. 25 A). Da die Phosphorylierung von p53 an Ser15 (p53pSer15) in die Unterdrückung der HR involviert ist, wurde zusätzlich der Anteil an p53pSer15 bestimmt. Dieser liegt, wie in Abb. 25 A ersichtlich, im Rahmen der p53-Expression. In MDA-MB-453 konnte, wahrscheinlich aufgrund der geringen p53-Proteinmenge, kein p53pSer15 detektiert werden.

Für p53 wurde beschrieben, dass es spezifisch innerhalb der Promotorregion von Rad51 bindet und dadurch die Transkription von Rad51 unterdrückt (Arias-Lopez *et al.*, 2006). Folglich wurde auch der Rad51-Proteingehalt in den Zellen bestimmt (Abb. 25 A). Der innerhalb der Zelllinien variierende Rad51-Gehalt wurde jedoch durch den p53-knockdown nicht beeinträchtigt.

Das hauptsächlich von p53 transkriptionell regulierte Genprodukt p21 konnte parallel zu wtp53 in den Zelllinien MCF10a, MCF12a und MCF7 nach Transfektion mit pSuper-p53 herunterreguliert werden, während es in den TP53-Defektlinien, mit Ausnahme von MDA-

MB-453 nicht exprimiert wurde (Abb. 25 A). In der Zelllinie MDA-MB-453 konnte die Expression von p21 nach *p53-knockdown* jedoch nicht gesenkt werden. Zusammenfassend konnte jedoch die p21-Proteinexpression in allen Zelllinien mit *wtp53* reduziert werden (Abb. 25 A).

Zur Untersuchung des Zellzyklus nach *p53-knockdown* wurde die Verteilung der Zellpopulationen in G1-, S- und G2-Phase am Durchflusszytometer analysiert. Die Linien MCF10a und MDA-MB-453 wiesen analog zu den hohen p21-Proteingehalten markant hohe G1-Anteile von 82 bis 87 % auf (Abb. 25 B). Für die MCF7- und MCF12a-Zellen, mit vergleichbaren p21-Proteingehalten konnte lediglich ein G1-Anteil von 53-62 % detektiert werden. Wie in Abb. 25 B ersichtlich führte der *p53-knockdown* in keiner Zelllinie zu signifikanten Veränderungen des Zellzyklusprofils.

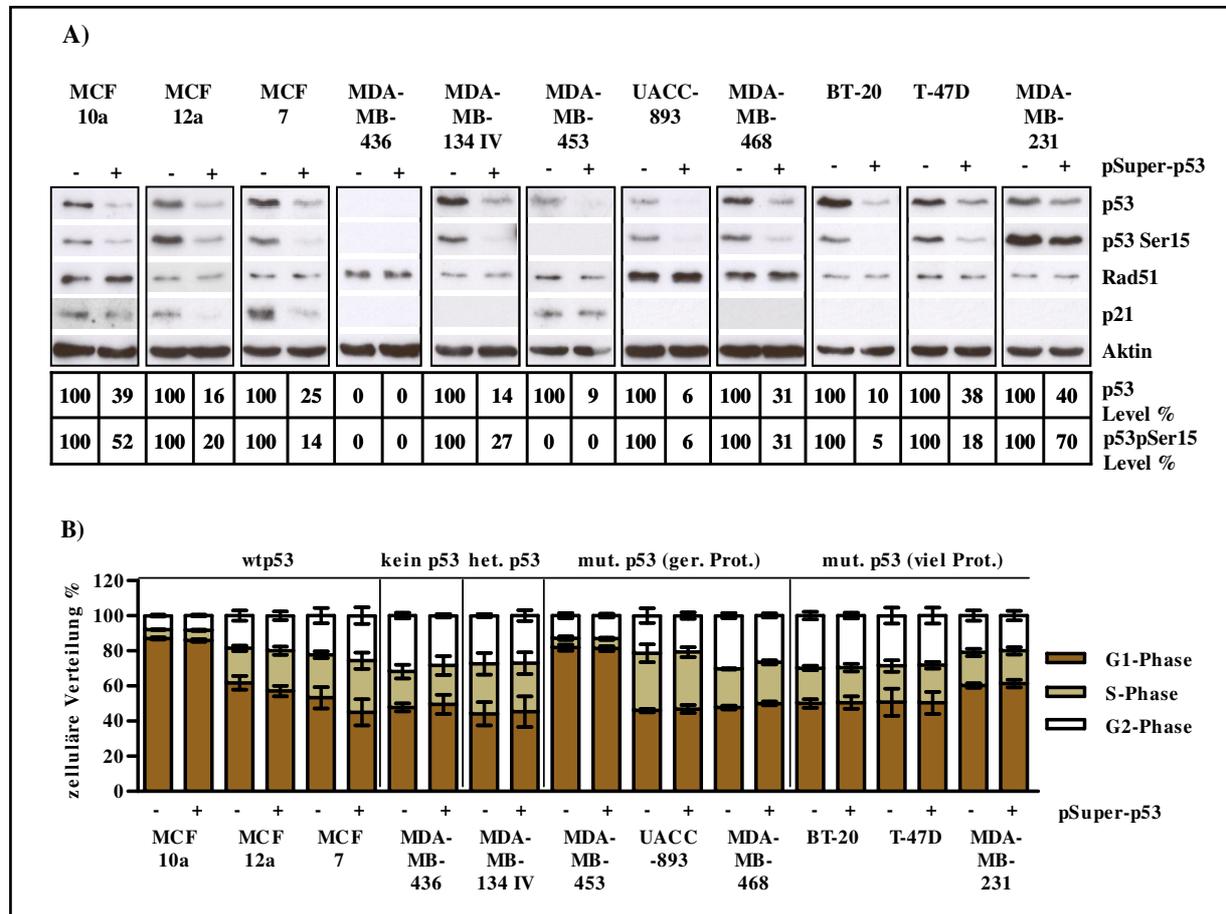


Abb. 25 Western-Blot- und Zellzyklus-Analyse nach *knockdown* von p53 in Brustepithelzelllinien

A) Western-Blot zum Nachweis von p53, p53Ser15, Rad51, p21 und Aktin. Die Zellhomogenate transfizierter Zellen (pSuper oder pSuper-p53) wurden auf einem 12 %igem SDS-Gel aufgetrennt, auf Nitrocellulose-Membran transferiert und die Proteine durch Antigen-Antikörper-Reaktionen detektiert. Als spezifische Primär-Antikörper wurden Anti-p53 (DO-1, 1/10000), Anti-p53Ser15 (9284, 1/2000), Anti-Rad51 (H-92, 1/1500), Anti-p21 (SX118, 1/500) und Anti-Aktin (Ab-1, 1/10000) eingesetzt. Als Sekundär-Antikörper wurden Anti-Maus- und Anti-Kaninchen-konjugiert mit Peroxidase (1/1000 bis 1/10000) verwendet. **B)** Für die Bestimmung der Zellzyklusstadien wurden die Zellen mit Plasmiden (pSuper oder pSuper-p53) transfiziert und 24 h kultiviert. Nach Fixierung der Zellen mit Aceton/Ethanol und Färbung der DNA mit Propidiumiodid wurden die Zellpopulationen am Durchflusszytometer analysiert. Durch die Markierung der G1-, S- und G2-Phase-Subpopulationen wurde der prozentuale Anteil der Zellen in der jeweiligen Phase bestimmt. Der prozentuale

Anteil der Populationen wurde so berechnet, dass die Summe aller drei Markerregionen (G1-, S- und G2-Phase) 100 % ergab. Die Mittelwerte aus mehreren Messungen (n=3-8) und die berechneten Standardabweichungen sind im Balkendiagramm angegeben. Die braunen Balken repräsentieren den Anteil der Zellen in der G1-Phase, die hellbraunen Balken in der S-Phase und die weißen Balken in der G2-Phase jeweils in Prozent.
Abkürzungen: wt=Wildtyp, het.=heterozygote Mutation, mut.=mutiertes, ger.=geringe, Prot.=Proteinmenge

Wie in Abb. 26 dargestellt, wurden die DSBR-Frequenzen der elf Brustepithelzelllinien nach *p53-knockdown* für NHEJ, SSA und HR untersucht.

Die Transfektion der *p53*-negativen Linie MDA-MB-436 mit pSuper-*p53* führte zu keinen signifikanten Veränderungen in den DSBR-Frequenzen (Abb. 26 A-C) und diente als Beweis für den spezifischen Einfluss von *p53-knockdown* auf die DSBR.

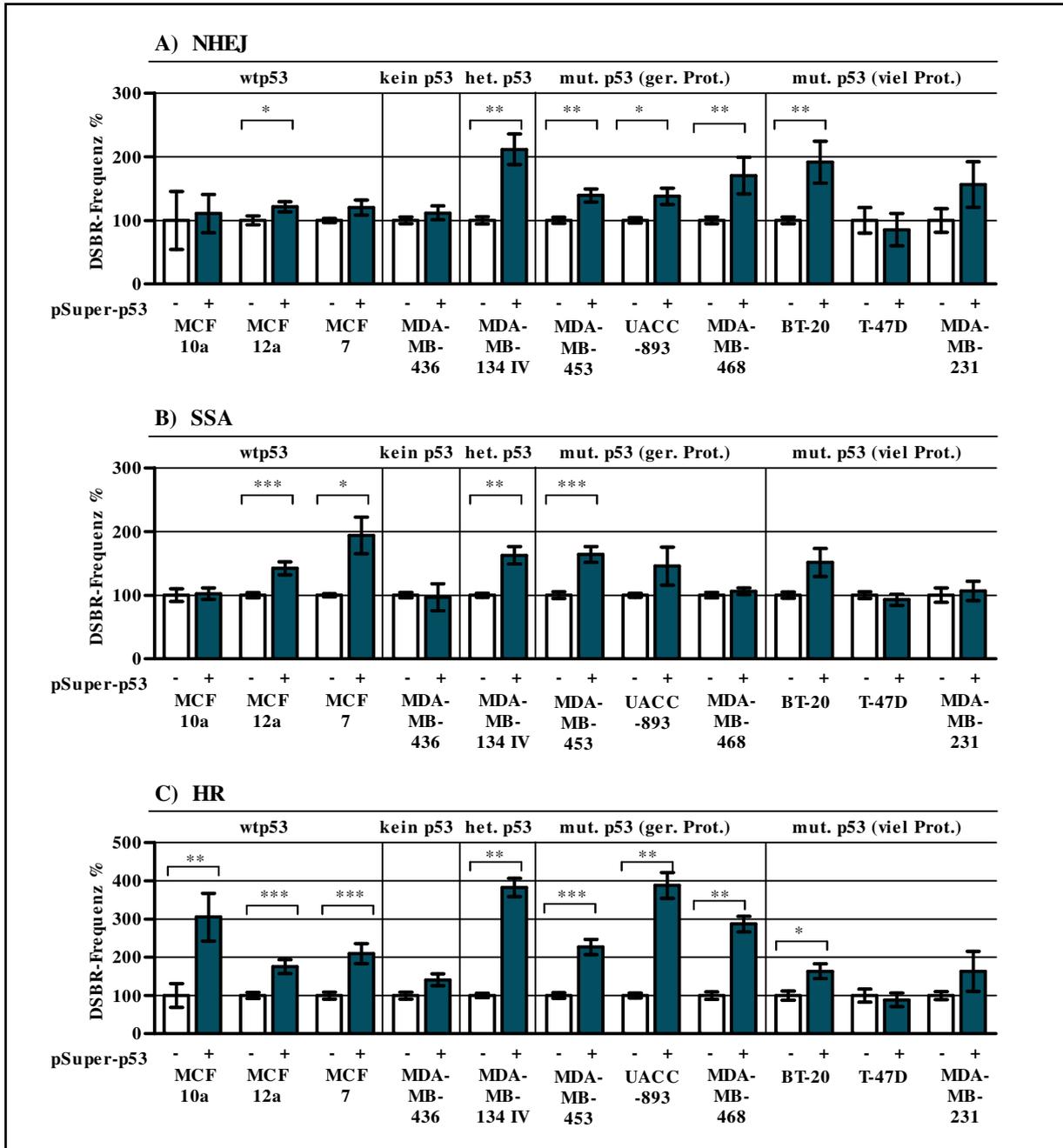
In Brustepithelzellen mit geringem *p53*-Expressionsniveau konnte nach *p53-knockdown* eine signifikante Erhöhung der HR (Abb. 26 C) um das 1,8-3,9-fache detektiert werden (3-fach für MCF10a $p=0,0079$; 1,8-fach für MCF12a $p=0,0005$; 2,1-fach für MCF7 $p=0,0008$; 3,8-fach für MDA-MB-134 IV $p=0,0022$; 2,3-fach für MDA-MB-453 $p<0,0001$; 3,9-fach für UACC-893 $p=0,0043$; 2,9-fach für MDA-MB-468 $p=0,0022$). Die signifikante Erhöhung der HR nach *p53-knockdown* für funktionales wtp53 sowie mutiertes, jedoch partiell aktives *p53* verdeutlicht, dass *p53* ein Hauptakteur bei der Kontrolle der HR in Brustepithelzellen ist.

Für die Zelllinien T47-D und MDA-MB-231 mit einem sehr hohen Expressionsniveau an mutiertem *p53* konnten keine signifikanten Veränderungen in der DSBR detektiert werden (Abb. 26 A-C). In BT-20 wurde lediglich eine 1,6-fache Steigerung der HR (Abb. 26 C, $p=0,0207$) nach *p53-knockdown* beobachtet.

Für NHEJ (Abb. 26 A) wurden nach *p53-knockdown* 1,2-2,1-fach erhöhte Frequenzen in MCF12a (1,2-fach $p=0,0128$), MDA-MB-134VI (2,1-fach $p=0,0022$), MDA-MB-453 (1,4-fach $p=0,0019$), UACC-893 (1,4-fach $p=0,0411$), MDA-MB-468 (1,7-fach $p=0,0022$) und BT-20 (1,9-fach $p=0,0079$) gezeigt. Die DSBR-Frequenzen für SSA (Abb. 26 B) stiegen 1,4-1,9-fach für MCF12a (1,4-fach $p=0,0010$), MCF7 (1,9-fach $p=0,0188$), MDA-MB-134 VI (1,6-fach $p=0,0022$) und MDA-MB-453 (1,6-fach $p=0,0003$) nach *p53-knockdown*.

Insgesamt konnten die eindeutigsten Effekte nach *p53-knockdown* in der HR nachgewiesen werden (Abb. 26 C). Die Erhöhung der HR sowie der Anstieg der NHEJ- und SSA-Frequenzen konnte auf Senkung von wtp53- und mutiertem *p53*-Proteinexpressionsniveau zurückgeführt werden und nicht auf Zellzyklusverschiebungen oder veränderte Rad51-Expressionsniveaus. Zusammenfassend konnte für *TP53*-Mutationen ein vereinfacht dargestelltes DSBR-Defektmuster ermittelt werden, wobei neben den Erhöhungen von NHEJ und SSA die erhebliche Steigerung der HR für Zelllinien mit geringer *p53*-Proteinmenge ausschlaggebend war (Abb. 26, Tabelle). Die Unterschiede in der Erhöhung von kurzer und langer Homologie der HR zeigten, dass mit Ausnahme von MDA-MB-463, die wt*TP53*-

Zellen und *TP53*-Mutanten zwischen den divergierenden Homologien unterscheiden konnten (Keimling and Wiesmüller, 2009).



TP53-DSBR-Defektmuster:

Gen	DSBR-Mechanismus					
	NHEJ	Homologie-gerichtete DSBR				
		SSA	SSA+HR (lang)	SSA+HR (kurz)	HR (lang)	HR (kurz)
TP53	↑	↑	↑	↑	↑↑	↑

Abb. 26 Bestimmung der DSBR-Unterschiede zwischen Brustepithelzelllinien mit wtp53 und Mutanten-p53 nach *knockdown* von p53 mittels pSuper-p53-Plasmid und Etablierung des DSBR-Defektmusters für die Brustkrebs-prädisponierten p53-Genmutationen

Für die Bestimmung der DSBR-Ereignisse wurden die Zellen transfiziert, 24 h kultiviert und anschließend der Anteil grün fluoreszierender Zellen am Durchflusszytometer bestimmt. Die Mittelwerte aus mehreren

Messungen (n=5-23) und die berechneten Standardfehler sind in Balkendiagrammen angegeben. Die weißen Balken repräsentieren die Brustepithelzelllinien nach Transfektion mit pSuper, die grünen Balken nach Transfektion mit pSuper-p53. Die Signifikanzen wurden mit dem ungepaarten Mann-Whitney-Test ermittelt. Signifikante Unterschiede wurden durch Sterne angezeigt. (*p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001). Die Darstellung der relativen Werte erfolgte logarithmisch. Die Zelllinien wurden mit 10 µg Plasmid-Mix bestehend aus 1/6 pCMV-I-SceI, 1/6 DSBR-Plasmid sowie 2/3 pSuper oder pSuper-p53 transfiziert. Je nach untersuchtem DSBR-Mechanismus wurden die folgenden DSBR-Plasmide verwendet **A)** pEJ-EGFP, **B)** p5'-EGFP/HR-EGFP, **C)** pHR-EGFP/5'-EGFP. Abkürzungen: wt=Wildtyp, het.=heterozygote Mutation, mut.=mutiertes, ger.=geringe, Prot.=Proteinmenge. In der **Tabelle** wurde das *TP53*-DSBR-Defektmuster für die untersuchten Reparaturwege vereinfacht dargestellt, wobei nur signifikante Unterschiede visualisiert wurden.

4.2 Anwendung der etablierten DSBR-Defektmuster auf isolierte primäre Zellen aus Brusttumorgewebe und Lymphozyten aus dem Blut derselben Brustkrebspatientinnen

In einem weiteren Teilbereich der Arbeit sollte überprüft werden, ob das *EGFP*-basierte DSBR-Testsystem auf die sehr empfindlichen primären Zellen aus Brusttumorgewebe angewendet werden kann und ob die Identifizierung unterschiedlicher DSBR-Defektmuster möglich ist. Entscheidend war dabei, ob direkt im betroffenen Gewebe unterschiedliche DSBR-Defektmuster erkennbar sind und wenn ja, ob diese Resultate mit den DSBR-Ergebnissen der aus Blut isolierten Lymphozyten derselben Brustkrebspatientin übereinstimmen. Weiterhin wurden für die vergleichende Analyse unterschiedliche Zellarten aus dem Tumormaterial isoliert und auf DSBR-Aktivitäten getestet. Dafür wurde eine Vielzahl von Vorexperimenten durchgeführt, um die geeigneten Kultivierungs-, Transfektions- und Auswerteverfahren zu ermitteln. Dabei wurden die Vorexperimente und Optimierungsarbeiten von mir durchgeführt, während die späteren Arbeiten zur Kultivierung, Transfektion und Messung der DSBR-Frequenzen zum Großteil von Marina Wager, Heike Göggerle und Julia Kaufmann vorgenommen wurden.

4.2.1 Etablierung der primären Zellkultur, Transfektion und Messung der DSBR-Frequenzen

4.2.1.1 Kultivierung der primären Zellen aus Brusttumorgewebe

Bei der Arbeit mit primären Zellen aus Brusttumorgewebe besteht die Schwierigkeit darin, reine Zellkulturen zu gewinnen und diese über mehrere Passagen in Kultur zu halten. Im Folgenden wird auf die Vorversuche zur Etablierung der Zellkultur eingegangen.

Die Brusttumore, die der Frau entnommen wurden, bestanden zum Großteil aus epithelialen Tumorzellen sowie Fibroblasten. Durch Vorarbeiten anderer Arbeitsgruppen konnte das Bearbeiten der Tumorstücke mit einer Schere oder durch Kollagenaseabbau als ungeeignete Methoden zur Zellgewinnung verworfen werden. Durch die Kooperation mit der indischen

Arbeitsgruppe von Frau Prof. Ralhan (*All India Institute of Medical Sciences, New Delhi*) wurde zunächst folgende Methode angewandt.

Am Tag der Tumorentnahme wurde das erhaltene Tumorstück unter sterilen Bedingungen vom Fettgewebe getrennt und beides mit einem Skalpell in ca. 1-3 mm³ kleine Stückchen geschnitten und separat in Zellkulturflaschen ausgesät. Bereits 5-10 Tage nach der Aussaat dieser Tumorstückchen konnten vereinzelt Zell-Plaques oder Zellanhäufungen beobachtet werden. Morphologisch wurde hierbei zwischen Epithelzellen, EMT-Zellen und Fibroblasten unterschieden (Abb. 27 A-C).

Wie die Abb. 27 A verdeutlicht, wiesen die Epithelzellen eine reguläre eckige bis ovale Morphologie mit wenigen Zwischenräumen auf. Epithelzellen wuchsen langsam in Zell-Plaques und benötigten enge Zellkontakte zum Überleben. Die Anhaftung der Zellen an die Oberfläche der Zellkulturflasche war sehr stark, was eine spätere Ablösung ohne Schädigung der Zellen erschwerte.

Die durch spindelförmige, meist irreguläre, zytoplasmatische Fortsätze gekennzeichneten Fibroblasten (Abb. 27 C) waren auf diese Zellkontakte nicht angewiesen, vermehrten sich sehr schnell und konnten dabei andere Zellarten überwachsen.

Die EMT-Zellen (Abb. 27 B) stellten morphologisch eine Zwischenform beider Zellarten dar. Im mikroskopischen Vergleich ähnelten sie durch ihre irreguläre, weit gefächerte Form den Fibroblasten, waren in der Kultivierung jedoch anspruchsvoller, da sie auch Zellkontakte zum Überleben benötigten. Ausschlaggebend für die Ähnlichkeit zwischen EMT-Zellen und Fibroblasten war die epitheliale-mesenchymale Transition, ein Prozess, bei dem Epithelzellen infolge einer gesenkten E-Cadherin-Expression eine Neugestaltung des Cytoskelettes durchlaufen. Infolge der verminderten E-Cadherin-Expression ist die Zell-Zell-Adhäsion der Epithelzellen vermindert, was zu einer verstärkten Mobilität der Zellen führt. Des Weiteren kommt es zur Expression mesenchymaler Komponenten. Diese Brustkrebszellen besitzen dann die Fähigkeit in die Lymph- und Blutbahn einzudringen und an anderer Stelle sekundäre Tumore zu bilden (Kang and Massague, 2004; Thiery, 2002).

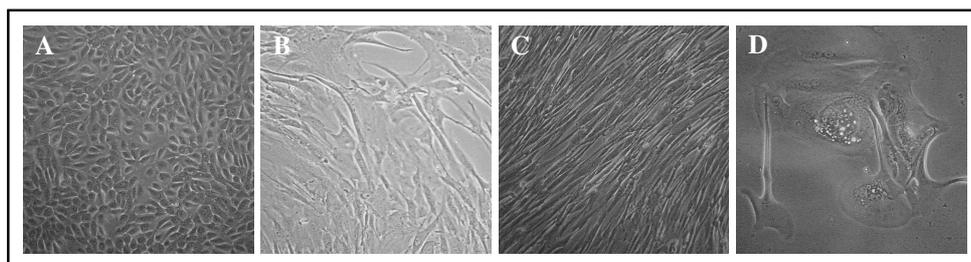


Abb. 27 Hellfeldaufnahmen der primären, aus Tumorgewebe isolieren Zellen

A) Epithelzellen, B) EMT-Zellen, C) Fibroblasten D) seneszente Epithelzellen wurden am Mikroskop mit 10-facher Vergrößerung aufgenommen und mit dem Bildbearbeitungsprogramm Gimp 2.6.4 bearbeitet

Um reine Kulturen aus Epithel-, EMT-, oder Fibroblastenzellen zu erhalten und diese über längere Zeit stabil zu vermehren, wurde eine Vielzahl unterschiedlicher Methoden ausgetestet.

Beginnend mit der Größe und Oberflächenbeschaffung der einzelnen Zellkulturflaschen und -schalen, die wichtig für die Anhaftung der verschiedenen Zellarten sind, wurden die kleinen Tumorstückchen auf 6-Well-Platten, 10 cm Zellkulturschalen sowie 25 cm² und 75 cm² Zellkulturflaschen ausgesät. Infolge der zu geringen Ausbreitungsfläche und schlechten Handhabbarkeit der 6-Well-Platten und der erhöhten Kontaminationsgefahr bei der Verwendung von Zellkulturschalen wurden Zellkulturflaschen verwendet. Die Nutzung der 75 cm² Zellkulturflaschen erwies sich lediglich für die Kultivierung der schnell wachsenden Fibroblasten als geeignet (Abb. 27 C).

Da die Epithelzellen für ein gutes Wachstumsverhalten enge Zellkontakte benötigten, wurden für die Kultivierung 25 cm² Flaschen bevorzugt. Um das Anhaften der primären Zellen weiter zu begünstigen, wurden die Zellkulturflaschen zwischenzeitlich mit Kollagen beschichtet. Dieser sehr arbeitsaufwendige, mit erhöhter Kontaminationsgefahr einhergehende Zwischenschritt erwies sich als ungeeignet, da sich die Kollagenschicht infolge der Kultivierungs- und Trypsinierungsprozesse ablöste und daran anhaftende Zellkomplexe verloren gingen. Die optimale Anhaftung der primären Epithel- und EMT-Zellen wurde durch die Verwendung von Zellkulturflaschen mit Primaria-Beschichtung von BD erzielt.

Zur Gewinnung reiner, langlebiger Epithelzellkulturen wurden auch verschiedene Medien und Medienzusätze getestet. Hierbei sollte das Wachstum der Fibroblasten gehemmt, das der Epithelzellen dafür gefördert werden. Ein wichtiger Punkt war die Verhinderung der Seneszenz der Epithelzellen (Abb. 27 D). Mit dem Medium für Brustkrebszellen konnten gute Ergebnisse, bezogen auf die Anhaftung und Vermehrung der Epithelzellen in Plaques, erzielt werden. Um Seneszenz und Apoptose der Epithelzellen und die extrem schnelle Vermehrung der Fibroblasten zu vermeiden, wurden nacheinander FBS mit *Horse-Serum* ersetzt, MEM-D-Valin-Medium oder Genitacin zugesetzt.

Zur Optimierung der primären Zellkultur wurden verschiedene Zusätze und Medien, wie Hypophysenextrakt, Hydrocortison und die Nutzung von *Quantum 286 for Epithelial cells* (PAA) getestet. Der Wechsel des Antibiotikums von Refobacin auf Streptomycin/Penicillin im Medium für Brustkrebszellen sowie ein Medium-Mix bestehend aus 2/3 Medium für Brustkrebszellen und 1/3 *Quantum 286 for Epithelial cells* (PAA) konnte die bei Epithelzellen auftretende Seneszenz hinauszögern (Abb. 27 D). Das schnelle Wachstum der Fibroblasten

konnte aber erst durch den Mediumwechsel zu *Mammary Epithelial Cells Growth Media* von Promocell weitgehend gestoppt werden.

Weitere Selektionsmöglichkeiten standen in Form von differentieller Trypsinierung sowie Positiv- und Negativselektion zur Verfügung. Bei der differentiellen Trypsinierung (zunehmende Trypsinkonzentrationen von 0,002 % bis 0,1 % oder gleich bleibende Trypsinkonzentration bei Zunahme der Inkubationszeit) wurden die starken Hafteigenschaften der Epithelzellen an die Oberfläche der Zellkulturflasche genutzt, um Fibroblasten mit geringerer Anhaftung an die Oberflächen zu entfernen. Mit dieser Methode konnten jedoch nicht alle Fibroblasten entfernt werden und häufig wiederholtes trypsinieren schädigte die Epithelzellen dauerhaft.

Die für die Vermehrung der Epithelzellen notwendige Ablösung der Zellen aus den Zellplaques und von der beschichteten Oberfläche war am schonensten unter Verwendung des *TNS-Kits* von Promocell, da die Trypsinierung mit herkömmlichen Trypsin/EDTA-Gemischen die Zellen so stark schädigte, dass ein erneutes Anwachsen mit hohen Zellverlusten einherging. Zusätzlich zu den Trypsinierungsschritten wurde die Auftrennung der Zellen mittels Positiv- und Negativselektion getestet. Die Verwendung der Negativselektion konnte aufgrund der geringen Spezifität der Fibroblasten-Antikörper nicht durchgeführt werden. Die Positivselektion mit dem EMA-Antikörper erwies sich dagegen als optimal.

Aus den vorangegangenen Optimierungsschritten ergab sich für die Bearbeitung und Kultivierung der primären Zellen folgende Durchführung:

Die in kleine Tumorstückchen zerteilten Tumorproben wurden auf 25 cm² Flaschen ausgesät und mit Medium für primäre Zellen aus Brustgewebe oder *Mammary Epithelial Cells Growth Media* von Promocell in einem Brutschrank kultiviert. Für die Versorgung der Zellen mit frischem Medium erfolgte alle drei bis vier Tage ein Mediumwechsel, bei dem lediglich die Hälfte des vorhandenen Mediums ausgetauscht wurde, um wichtige zelleigene Wachstumsfaktoren beizubehalten. Sobald Epithelplaque-Anhäufungen in den Flaschen gesichtet wurden, erfolgte zur Eindämmung des Fibroblastenwachstums ein Mediumwechsel zu *Mammary Epithelial Cells Growth Media*. Für die Kultivierung von Fibroblasten und EMT-Zellen wurden die Zellen mit dem Medium für primäre Zellen aus Brustgewebe inkubiert. Reine Epithelzellkultur-Flaschen wurden ab einer Konfluenz von 80 % mit Hilfe des *TNS-Kits* von Promocell trypsinisiert und zur Vermehrung in neue Flaschen ausgesät. Mischkulturen wurden zunächst durch differentielle Trypsinierung und später mittels

Positivselektion voneinander getrennt und kultiviert. Die Kultivierung der primären Zellen wurde vorwiegend von Marina Wager, Heike Göggerle und Julia Kaufmann durchgeführt.

4.2.1.2 Bestimmung der Zellarten mit der IHC-Färbung

Für die Einteilung der Zellarten wurde die IHC-Färbung durchgeführt. Durch die Verwendung spezifischer Antikörper wie Anti-EMA [Dako (Clone E29, N1504)], Anti-Cytokeratin 8/18 [Biogenex (Klon 5D3, AM131-5M)] und Anti-Vimentin [Dako (Klon V9, N1521)] konnte meist eine eindeutige Zuordnung der Zellen in Epithelzellen, EMT-Zellen oder Fibroblasten erfolgen (Abb. 15 und Tab. 5). Die Arbeiten zur IHC-Färbung wurden von Marina Wager, Heike Göggerle und Julia Kaufmann durchgeführt.

4.2.1.3 Bestimmung der geeigneten Transfektionsmethode für primäre Zellen aus Brusttumorgewebe

Nach erfolgreicher Kultivierung der primären Zellen wurde die geeignete Methode zur Transfektion ausgetestet. Die Transfektion von primären, adhären Zellen aus dem Brusttumorgewebe erwies sich zu Beginn unserer Arbeit aufgrund der geringen Zellausbeute und hohen Sensitivität der Zellen als äußerst schwierig. Die hohe Sensitivität der Zellen hatte eine hohe Toxizitätsrate und geringe Transfektionseffizienz zur Folge.

Es gab nur wenig Anhaltspunkte primäre Zellen schonend bei gleichzeitig hoher Transfektionseffizienz zu transfizieren. Am geeignetesten schien die Nukleofektionsmethode von Amaxa, einer Kombination aus Lipofektion und Elektroporation. Diese Transfektionsmethode wurde für die Anwendung auf primäre Brustepithelzellen optimiert (*Cell Line Nucleofector Kit V*, Programm S-28, 5 µg DNA-Plasmid-Mix).

Im Verlauf meiner Doktorarbeit wurden weitere Transfektionsmethoden und -reagenzien getestet. Unter anderem wurde von Amaxa ein speziell für primäre Brustkrebszellen zugeschnittenes Protokoll mit neuer Nukleofektorlösung (*Human Mammary Epithelial Cell Kit*, HMEC) und Programmen getestet. Die Unterschiede zu den bestehenden Ergebnissen erwiesen sich jedoch als marginal.

Als neue Transfektionsmethode wurde die Lipofektion mit *FuGENE[®]HD Transfection Reagent* und *FuGENE[®]6 Transfection Reagent* von Roche nach Angaben des Herstellers ausgetestet. Hierbei wurden jedoch sehr geringe Transfektionseffizienzen erzielt. Letztendlich überzeugte für die Nukleofektionsmethode von Amaxa der optimale DNA-Gehalt von 5 µg mit guter Transfektionseffizienz bei vergleichsweise geringer Toxizität. Des Weiteren wurde eine Vielzahl von Zelllinien, wie MCF10a (nicht-transformierte Brustepithelzelllinie mit wtTP53), MCF12a (nicht-transformierte Brustepithelzelllinie mit wtTP53), MCF7

(Brustkarzinomzelllinie mit wt*TP53*), MDA-MB-157 (Brustkarzinomzelllinie mit *TP53*-Mutation), HT1080 (Fibrosarkomzelllinie mit wt*TP53*) und 76NTERT (nicht-transformierte Brustepithelzelllinie mit wt*TP53*) als mögliche Kontrollzelllinien in Betracht gezogen. Als Kontrollzelllinien wurden letztendlich MCF12a und MDA-MB-157 aufgrund der damit erzielten reproduzierbaren Ergebnisse regelmäßig mitgeführt.

Innerhalb der Arbeit stellte sich heraus, dass sich mit zunehmender Passagenzahl der primären Zellen die DSBR-Frequenzen innerhalb einer Kultur erheblich veränderten, so dass diese nicht auswertbar waren. Daher wurden im Folgenden nur DSBR-Messungen mit Zellkulturen bis zu einer Passage p=4 durchgeführt und ausgewertet.

Infolge der, je nach Tumorgröße und Zellart, schwankenden Zellausbeute, wurde im Vorfeld der Arbeit die Anzahl möglicher Ansätze begrenzt und eine Hierarchie in der Abfolge (pEJ-EGFP für NHEJ; pΔ-EGFP/5'-EGFP für HR kurze Homologie; pΔ-EGFP/3'-EGFP für SSA/HR kurze Homologie; pHR-EGFP/3'-EGFP für SSA/HR lange Homologie) festgelegt, wobei pwtEGFP als Positivkontrolle immer mitgeführt wurde. Ein Ansatz bestand aus drei gleichen Anteilen von pBS, pCMV-I-SceI sowie dem jeweiligen DSBR-Plasmid.

4.2.1.4 Messung der DSBR-Frequenzen primärer Zellen aus Brusttumorgewebe am Durchflusszytometer und Analyse der Ergebnisse

Die Verwendung der schonenden Transfektionsmethode von Amaxa führte zu einer Überlebensrate von ca. 50 % der Zellen. Die lebenden Zellen wurden am Durchflusszytometer im FSC-/SSC-*Dot-Plot*-Diagramm markiert und für die Analyse der DSBR-Frequenzen berücksichtigt (siehe Abb. 11). Je Ansatz konnten 50.000 bis 100.000 lebende primäre Zellen gezählt und die darin befindlichen grün leuchtenden Zellen im FL-1/FL-2-*Dot-Plot*-Diagramm detektiert werden.

Um mögliche, experimentell bedingte Schwankungen in den DSBR-Messungen zu eliminieren, wurden wenn technisch möglich parallel zu jeder Messung der primären Epithel- und EMT-Zellen sowie Fibroblasten die DSBR-Ereignisse in den Kontrollzelllinien MCF12a und MDA-MB-157 analysiert.

Für die Berechnung der absoluten DSBR-Ereignisse in primären Zellen wurde der Anteil grün fluoreszierender Zellen mit der jeweiligen Transfektionseffizienz korrigiert. Die Messungen der DSBR-Frequenzen sowie die γ H2AX-Färbungen der primären Zellen wurden zum Großteil von Marina Wager, Heike Göggerle und Julia Kaufmann durchgeführt.

4.2.1.5 Bestimmung der γ H2AX-Immunantwort nach Behandlung der primären Zellen aus Brusttumorgewebe mit Bleomycin

Parallel zu den DSBR-Messungen wurden für die Epithel- und EMT-Zellkulturen γ H2AX-Analysen vorgenommen, um die Vergleichbarkeit unterschiedlicher Methoden zur Bestimmung von DSBR-Aktivitäten in primären Zellen aus Brusttumorgewebe zu überprüfen. Die primären Epithel- und EMT-Zellen wurden dafür auf Objektgläschen ausgesät und mit 6 mU Bleomycin bzw. ddH₂O für 24h inkubiert. Das Glycosid Bleomycin bindet an Guanin-/Cytosin-reiche Regionen der DNA, leitet dabei Einzel- und Doppelstrangbrüche sowie DNA-Fragmentierung ein und verursacht in Folge eine verstärkte Rekombinationsreparatur (Dutta *et al.*, 2005; Sikic, 1986). Mithilfe des Schadensensors H2AX, der infolge auftretender DNA-Schäden an Ser139 phosphoryliert wird und per Immunfluoreszenzanalyse in intensiv gefärbten, distinkten, punktförmigen Foci im Kern akkumuliert (Tanaka *et al.*, 2007), konnte die DNA-Schadwirkung von Bleomycin untersucht, sowie die Reparaturkapazität der Zellen nach einer anschließenden Reinkubation ohne Bleomycin überprüft werden. Für die Vergleichbarkeit der Ergebnisse sowie als Kontrolle für die Funktionalität der γ H2AX-Färbung wurden bei jeder Bestimmung der γ H2AX-Foci die Kontrollzelllinien MCF12a sowie MCF7 mitgeführt. Die quantitative Auswertung wurde im Balkendiagramm dargestellt, wobei für die bessere Vergleichbarkeit relativierte Ergebnisse dargestellt wurden.

4.2.1.6 DNA-Schadenswirkung von Bleomycin auf die Kontrollzelllinie MCF7

In Abb. 28 A wurden repräsentative Bilder der γ H2AX-Fociverteilung in der Kontrollzelllinie MCF7 direkt nach Bleomycinbehandlung/ddH₂O sowie nach einer Reinkubationszeit von 24 h in Bleomycin-freiem dargestellt. Nach Behandlung der MCF7-Zellen mit Bleomycin konnte ein deutlicher Anstieg der γ H2AX-Focianzahl demonstriert werden. In dem Kontrollpräparat (ddH₂O) war die Akkumulation der γ H2AX-Foci nur sehr schwach ausgeprägt. Nach der Regenerationsphase von 24 h konnte für Bleomycin-behandelte Zellen ein starker Rückgang der γ H2AX-Focianzahl detektiert, für die Kontrollpräparate eine leichte Zunahme der γ H2AX-Färbung nachgewiesen werden. Die Überlagerung mit DAPI zeigte deutlich die Akkumulation von γ H2AX-Foci in Kern der MCF7-Zellen.

Die quantitative Auswertung mehrerer γ H2AX-Färbungen wurde in Abb. 28 B dargestellt. MCF7-Zellen wiesen eine signifikante Erhöhung des γ H2AX-Focigehaltes von 100 % ohne Bleomycininkubation auf 1100 % nach Behandlung mit 6 mU Bleomycin ($p=0,0178$) auf. Nach einer Regenerationsphase von 24 h sank der γ H2AX-Focigehaltes auf 680 % ab.

Interessanterweise wurde für die Kontrollpräparate eine nicht signifikante Erhöhung der γ H2AX-Immunantwort auf 490 % nach einer Regenerationszeit von 24 h nachgewiesen.

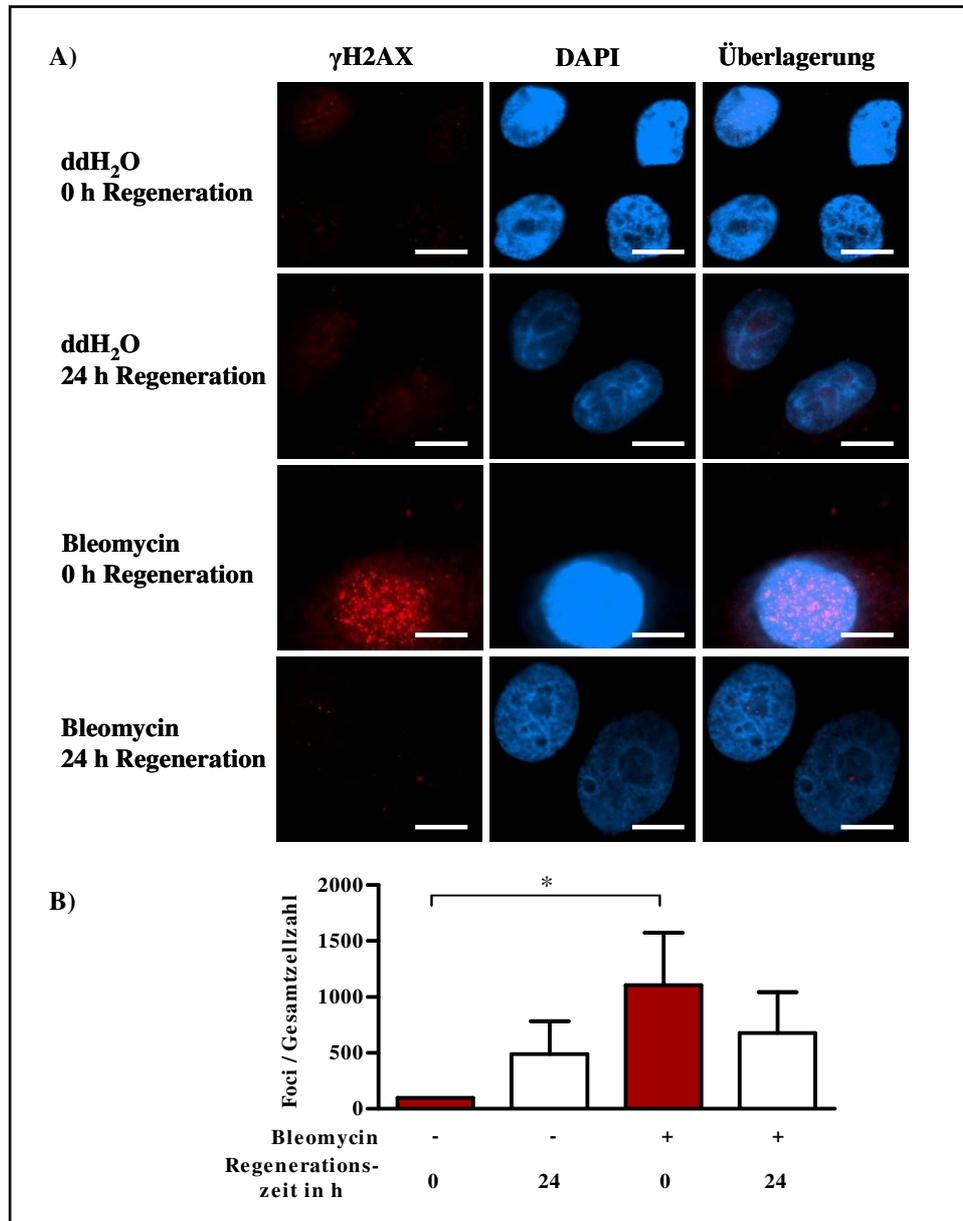


Abb. 28 Immunfluoreszenzanalysen mit MCF7-Zellen zur Detektion der nukleären Verteilung von γ H2AX nach Bleomycininkubation und quantitativen Auswertung der γ H2AX-Foci

A) Die MCF7-Zellen wurden auf Objektgläschen ausgesät und 24 h mit 6 mU Bleomycin bzw. ddH₂O kultiviert und anschließend bzw. nach einer Regenerationsphase von weiteren 24 h auf den Objektgläsern fixiert. Die Immunfärbung der Präparate erfolgte mit einem spezifischen Antikörper gegen phosphoryliertes H2AX und einem Alexa-555 gekoppelten Sekundärantikörper (rot). Die DNA wurde mit DAPI (blau) angefärbt. Die Fluoreszenzbilder wurden mit 100-facher Vergrößerung aufgenommen. Für die Überlagerung wurde die *Software Cell^F 2.5*, für die weitere Bearbeitung, das Bildbearbeitungsprogramm Gimp 2.6.4 verwendet. Der Größenstandard entspricht 10 μ m (weiße Linie). **B)** Die Mittelwerte aus mehreren Messungen (n=22), relativiert auf die Kontrollwerte zu 0 h ohne Bleomycinbehandlung (=100 %, entspricht 3 Foci/Zelle) und dem berechneten Standardfehler sind im Balkendiagramm angegeben. Die roten Balken repräsentieren die Zellen direkt nach Behandlung mit Bleomycin/ddH₂O, die weißen Balken die Zellen nach einer Regenerationsphase von 24 h. Die quantitative Auswertung erfolgte mit der *Software Cell^F 2.5* durch die Ermittlung der Anzahl roter Foci in 50 Zellkernen/Ansatz. Die Signifikanzen wurden mit dem ungepaarten Mann-Whitney-Test ermittelt. Signifikante Unterschiede wurden durch Sterne angezeigt. (*p<0,05).

4.2.1.7 DNA-Schadenswirkung von Bleomycin auf die Kontrollzelllinie MCF12a

In Abb. 29 wurden die Mittelwerte von mehreren γ H2AX-Färbungen und die ermittelten Standardfehler in einem Balkendiagramm graphisch dargestellt. Es konnte eine deutlich, jedoch nicht signifikante Abnahme der γ H2AX-Immunantwort von 430 %, direkt nach der Bleomycininkubation, auf 140 %, nach einer Regenerationsphase von 24 h, verzeichnet werden. Die Kontrollpräparate ohne Bleomycinbehandlung wiesen eine Senkung von 100 % auf 60 % der Focianzahl nach 24 h auf.

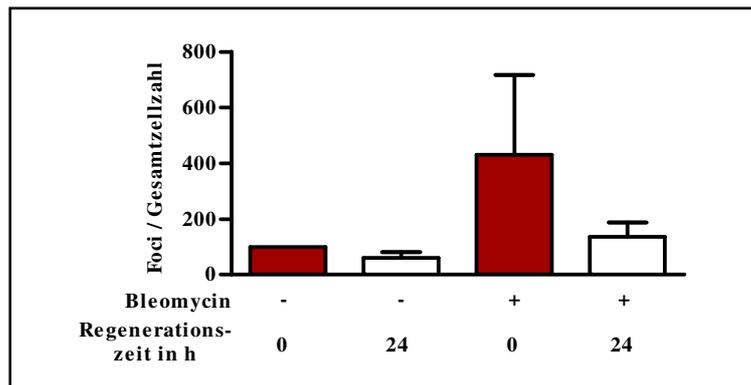


Abb. 29 Immunfluoreszenzanalysen mit MCF12a-Zellen zur Detektion der nukleären Verteilung von γ H2AX nach Bleomycininkubation und quantitative Auswertung der γ H2AX-Foci

Die MCF12a-Zellen wurden auf Objektgläschen ausgesät und 24 h mit 6 mU Bleomycin bzw. ddH₂O kultiviert und anschließend bzw. nach einer Regenerationsphase von weiteren 24 h auf den Objektgläsern fixiert. Die Immunfärbung der Präparate erfolgte mit einem spezifischen Antikörper gegen phosphoryliertes H2AX und einem Alexa-555 gekoppelten Sekundärantikörper. Die Mittelwerte aus mehreren Messungen (n=15), relativiert auf die Kontrollwerte zu 0 h ohne Bleomycinbehandlung (=100 %, entspricht 6 Foci/Zelle) und dem berechneten Standardfehler sind im Balkendiagramm angegeben. Die roten Balken repräsentieren die Zellen direkt nach Behandlung mit Bleomycin/ddH₂O, die weißen Balken die Zellen nach einer Regenerationsphase von 24 h. Die quantitative Auswertung erfolgte mit der Software Cell^F 2.5 durch die Ermittlung der Anzahl roter Foci in 50 Zellkernen/Ansatz.

4.2.2 Ergebnisse der DSBR-Messungen mit primären Zellen aus Brusttumorgewebe und Lymphozyten aus dem Blut derselben Brustkrebspatientinnen

Für die Bestimmung der DSBR-Aktivitäten in primären Zellen aus Brusttumorgewebe standen in einem Rahmen von fast drei Jahren 77 Brusttumore von Patientinnen zur Verfügung. Von diesen Tumoren konnten insgesamt 23 Epithelzell-, 42 EMT-Zell- und 56 Fibroblastenkulturen isoliert und die DSBR-Aktivitäten nach Transfektion mittels Durchflusszytometrie gemessen werden. Somit konnten zu 30 % Epithelzellen, 55 % EMT-Zellen und 73 % Fibroblasten erfolgreich kultiviert werden. Bei 36 Tumoren konnten mehrere Zellarten parallel kultiviert und genügend Zellen für die Messungen der DSBR-Ereignisse gewonnen werden.

Infolge der hohen Sensitivität der primären Zellen aus Brusttumorgewebe gegenüber der Transfektion mit DSBR-Plasmiden wurden zum Teil sehr hohe Toxizitäten und geringe Transfektionseffizienzen ermittelt. Dies führte mehrfach zu sehr hohen

Standardabweichungen innerhalb einer Messreihe. Deswegen wurden DSBR-Messungen mit Transfektionseffizienzen von weniger als 0,5 % und Standardabweichungen innerhalb einer Messreihe von über 50 % in der Auswertung nicht berücksichtigt.

Letztendlich wurden 47 Tumore mit 16 primären Epithelzell-, 16 EMT-Zell- und 30 Fibroblastenkulturen in die Auswertung der DSBR einbezogen. Aus 14 Tumoren wurden mehrere Zellarten, für 27 Tumore konnten zusätzlich Lymphozyten aus dem Blut der entsprechenden Patientinnen isoliert und gemessen werden. Die Transfektionseffizienz der primären Epithelzellen betrug durchschnittlich 5 %. Die EMT-Zellen und Fibroblasten wiesen mit 12 % und 17 % wesentlich höhere Effizienzen auf.

Die Analyse der DSBR-Aktivitäten in Epithel-, EMT- und Fibroblastenzellen zeigte für jede Zellart unterschiedliche DSBR-Niveaus auf (siehe Tab. 16 im Anhang 9.4).

Die Epithelzellen wiesen zum Beispiel mit 0,105 % einen höheren Medianwert für NHEJ-Frequenz auf, als EMT- oder Fibroblastenkulturen mit 0,014 % bzw. 0,022 % (Tab. 10). Entsprechend dieser Erkenntnisse wurde für die vergleichende Auswertung der DSBR-Aktivitäten in den verschiedenen primären Zelltypen der jeweilige Medianwert als Bezugsparameter eingeführt (Tab. 10) und in die nachfolgenden Abbildungen als Gerade eingezeichnet. Die Medianwerte zu den primären Lymphozyten (Tab. 10) entsprechen den DSBR-Ergebnissen aller Brustkrebspatientinnen aus Abschnitt 4.3.

DSBR-Mechanismus	DSBR-Plasmide	Medianwerte der DSBR-Frequenzen (%) der primären Zellkulturen (n=Anzahl)			
		Epithelzellen	EMT-Zellen	Fibroblasten	Lymphozyten
NHEJ	pEJ-EGFP	0,105 (16)	0,014 (16)	0,022 (30)	0,021 (174)
SSA/HR lange Homologie	pHR-EGFP/3'-EGFP	0,287 (9)	0,623 (5)	0,132 (23)	0,118 (78)
SSA/HR kurze Homologie	pΔ-EGFP/3'-EGFP	0,292 (10)	0,072 (9)	0,133 (26)	0,091 (98)
HR kurze Homologie	pΔ-EGFP/5'-EGFP	0,032 (14)	0,005 (9)	0,014 (26)	

Tab. 10 Medianwerte der DSBR-Frequenzen der primären Zellen aus Brusttumorgewebe und der Lymphozyten aus dem Blut von Brustkrebspatientinnen

Die Untersuchung der DSBR-Frequenzen zu NHEJ, SSA/HR und HR in den primären Zellen aus dem Brusttumorgewebe und den Lymphozyten aus dem Blut derselben Patientinnen ermöglichte die Klassifizierung von verschiedenen DSBR-Defekttypen. Hierbei war es möglich 14 Tumore dem *BRCA1*-, drei Tumore dem *BRCA2*-, sowie dem *TP53*- und neun Tumore dem *NBN/RAD50*-DSBR-Defekttyp zuzuordnen. Sieben Tumore konnten mehreren (Misch-DSBR-Defekttypen) und 13 Tumore keinem speziellen DSBR-Defekttyp zugeordnet werden. Im folgendem wird für jeden detektierten DSBR-Defekttyp exemplarisch ein Beispiel im Detail dargestellt. Die Ergebnisse der DSBR-Messungen für die auswertbaren

47 Tumore sind in Tab. 16 und Tab. 17 im Anhang unter Abschnitt 9.4 für primäre Epithel-, EMT-, Fibroblastenzellen und Lymphozyten aus dem Blut der jeweiligen Patientin aufgelistet.

4.2.2.1 Detektion des putativ hereditären BRCA1-DSBR-Defektmusters in den primären Zellen des Tumormaterials B1926/08 und Lymphozyten aus derselben Brustkrebspatientin

Für die Ermittlung des DSBR-Defekttypes des Tumors B1926/08 konnten primäre EMT- und Fibroblastenzellen aus dem Tumormaterial und Lymphozyten aus dem Blut der Brustkrebspatientin isoliert, kultiviert und nach Transfektion DSBR-Frequenzen mittels Durchflusszytometrie gemessen und analysiert werden. Epithelzellen wurden nicht isoliert. Abb. 30 A zeigt die Hellfeldaufnahme der EMT- und Fibroblastenkulturen am Tag der Transfektion. Die Fibroblasten (Abb. 30 A, rechts) waren morphologisch durch lange spindelförmige Fortsätze charakterisiert. Die EMT-Zellen zeichneten sich durch großflächige, lang gezogene, zum Teil irreguläre Strukturen aus (Abb. 30 A, links). Neben der morphologisch/visuellen Einteilung der Zellen am Mikroskop erfolgte die Klassifizierung der Zellarten mittels IHC-Färbung (Abb. 30 B). Die Fibroblasten wiesen eine positive Farbreaktion nach Inkubation mit Anti-Vimentin auf, während die EMT-Zellen schwache Signale nach der Behandlung mit Anti-EMA, Anti-Cytokeratin 8/18 und Anti-Vimentin zeigten.

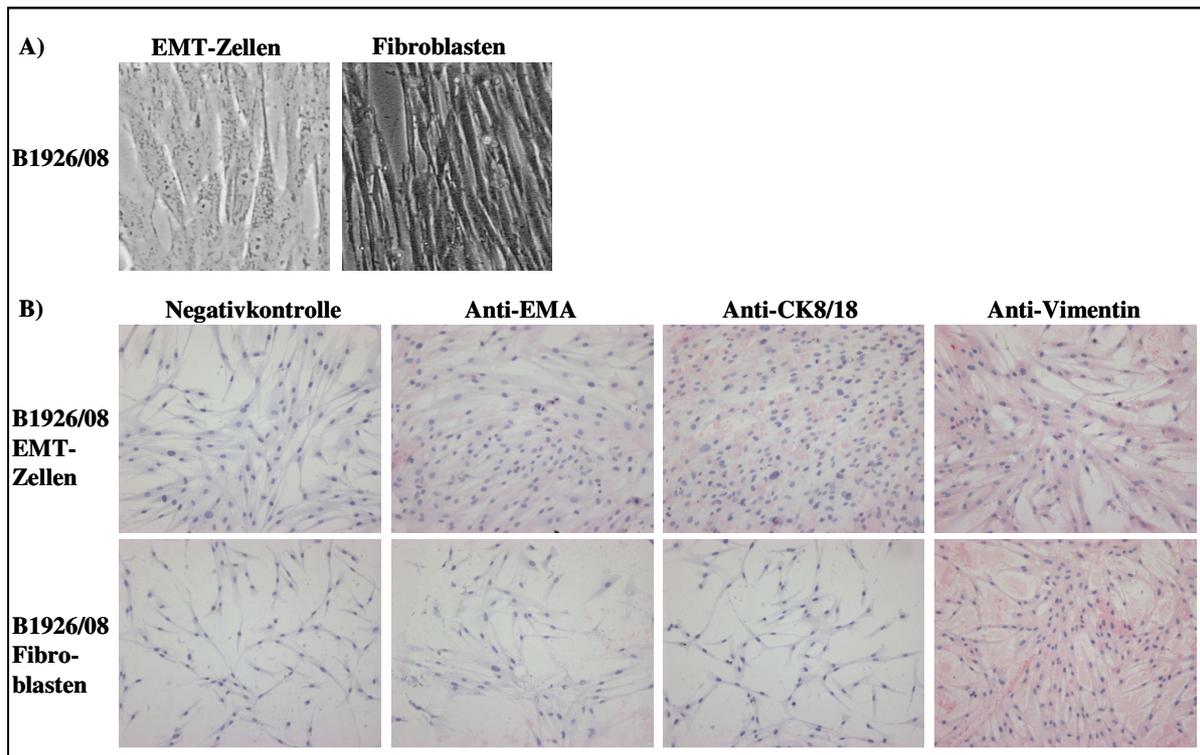


Abb. 30 Hellfeldaufnahme und IHC-Färbung der isolierten EMT- und Fibroblastenkulturen aus dem Tumormaterial B1926/08

A) Die getrennt kultivierten Zellarten des Tumormaterials B1926/08 wurden mit einer 10-fachen Vergrößerung aufgenommen. Mit dem Bildbearbeitungsprogramm Gimp 2.6.4 wurde ein repräsentativer Bildbereich ausgewählt und dargestellt. **B)** Jeweils $0,5 \times 10^5$ Zellen wurden am Tag der Transfektion auf Objektträger ausgesät, 24 h nach Aussaat mit Methanol fixiert und mit Antikörpern über Nacht inkubiert. Die Detektion der gebundenen primären Antikörper erfolgte mit *Fast Red* (Rotfärbung). Für die Negativkontrolle wurden die Zellen nur mit Proteinblockierungslösung inkubiert. Für die Eingruppierung in unterschiedliche Zellarten wurden die fixierten Zellen mit den Antikörpern Anti-EMA, Anti-Cytokeratin 8/18 und Anti-Vimentin inkubiert. Die Epithelzelllinien MCF7 und MCF12a wurden zur Kontrolle bei jeder IHC-Färbung mitgeführt. Anhand der IHC-Färbung war eine eindeutige Charakterisierung der Zellkulturen in EMT-Zellen und Fibroblasten möglich. Die Charakterisierung der Zellen erfolgte visuell am Mikroskop, in Abhängigkeit von der Farbreaktion (Rotfärbung) der Zellen. Vergrößerung:10-fach

Die quantitative Auswertung der DSBR-Messungen wurde in Abb. 31 graphisch dargestellt. Mit 0,030 % bzw. 0,049 % wiesen die primären EMT-Zellen und Fibroblasten des Tumors B1926/08 im Vergleich zum jeweiligen Medianwert (siehe Tab. 10) eine Verdopplung der NHEJ-Frequenzen auf (Abb. 31 A). Die Lymphozyten zeigten mit 0,073 % eine 3,5-fache Erhöhung der NHEJ-Frequenzen. Für SSA/HR mit kurzer Homologie (Abb. 31 C) wurde für die Fibroblasten eine Verdopplung, für die Lymphozyten mit 1,932 % eine Erhöhung um das 21-fache analysiert. Für SSA/HR mit langer Homologie (Abb. 31 B) konnte für die Lymphozyten eine Steigerung um das 12-fache ermittelt werden. Die DSBR-Ergebnisse der HR (Abb. 31 D) wiesen aufgrund der insgesamt geringen Zahl an grün fluoreszierenden Zellen für EMT-Zellen und Fibroblasten enorme Standardabweichungen auf, wodurch die Aussagekraft stark eingeschränkt war. Für die EMT-Zellen wurde keine Änderung der HR im Vergleich zum Median, für die Fibroblasten eine 4-fache Senkung nachgewiesen. Die

untersuchten EMT- und Fibroblastenzellen des Tumormaterials B1926/08 sowie die Lymphozyten aus derselben Brustkrebspatientin verwendeten für die Reparatur der künstlich initiierten DSBs bevorzugt die fehlerhaften DSBR-Wege, wie das Mikrohomologie-gerichtete NHEJ sowie SSA. Diese Resultate wurden bereits in den lymphoblastoiden Zelllinien HA166 und HCC1937BL mit heterozygoten *BRCA1*-Mutationen detektiert. Infolge der Übereinstimmung des DSBR-Defektmusters zwischen den Tumor bildenden EMT-Zellen und den mit den Tumorzellen im Tumorexplantat vergesellschafteten Fibroblasten sowie den Lymphozyten aus dem Blut der Patientin, wurde das Tumormaterial B1926/08 dem hereditären *BRCA1*-DSBR-Defekt-Typ zugeordnet. Dies bedeutet, dass bei dieser Patientin eine oder mehrere genetische Veränderungen postuliert werden, die zum Defekt im *Brcal*-Reaktionsweg führen.

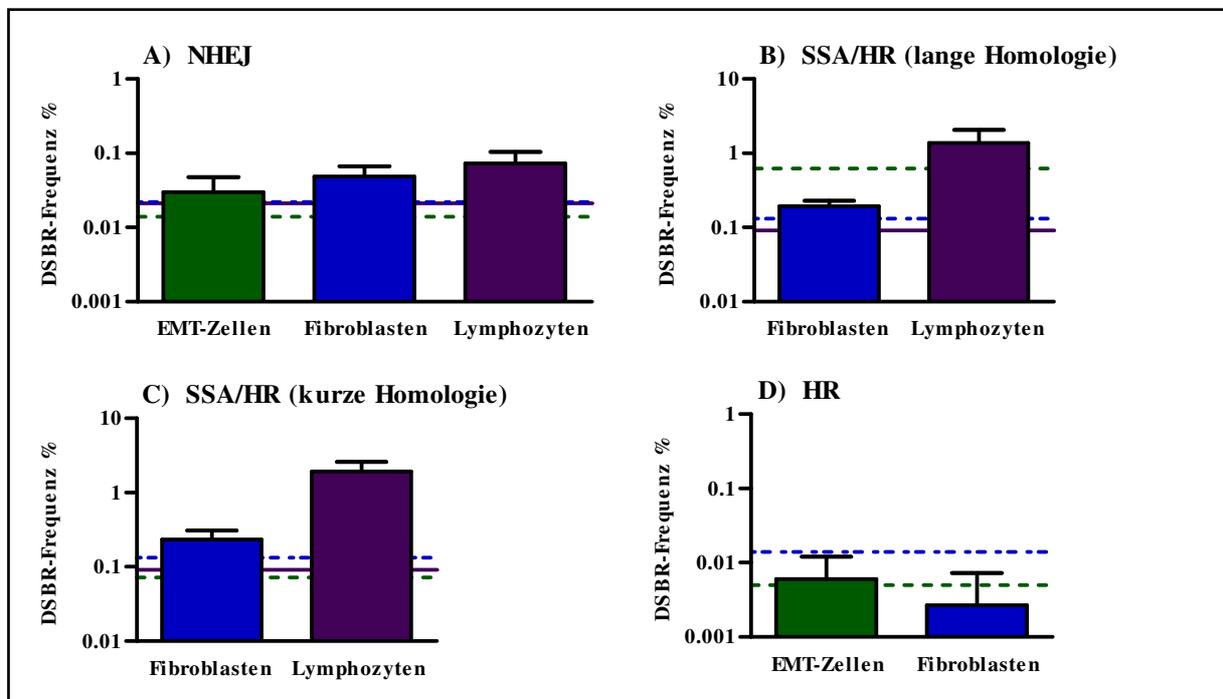


Abb. 31 Analyse der DSBR-Aktivitäten in primären Zellen aus dem Tumormaterial B1926/08 und in Lymphozyten aus dem Blut derselben Brustkrebspatientin

Für die Bestimmung der DSBR-Ereignisse wurden die Zellen mit einem Mix aus DSBR-, pBS- und pCMV-I-SceI-Expressionsplasmid transfiziert, 24 h kultiviert und anschließend der Anteil grün fluoreszierender Zellen am Durchflusszytometer bestimmt. Die Mittelwerte und die berechneten Standardabweichungen sind in Balkendiagrammen angegeben. Die primären EMT-Zellen (grün), Fibroblasten (blau) und Lymphozyten (violett) wurden mit den DSBR-Plasmiden **A)** pEJ-EGFP, **B)** pHR-EGFP/3'-EGFP, **C)** pΔ-EGFP/3'-EGFP und **D)** pΔ-EGFP/5'-EGFP transfiziert. Die Geraden markieren die Medianwerte zu den jeweiligen Zellarten und DSBR-Plasmiden (Tab. 10). Die Medianwerte zu den einzelnen Zellarten sind wie folgt dargestellt: EMT-Zellen (Medianwerte in %: pEJ-EGFP=0,014; pHR-EGFP/3'-EGFP=0,623; pΔ-EGFP/3'-EGFP=0,072; pΔ-EGFP/5'-EGFP=0,005) wurden grün gestrichelt, Fibroblasten (Medianwerte in %: pEJ-EGFP=0,022; pHR-EGFP/3'-EGFP=0,132; pΔ-EGFP/3'-EGFP=0,133; pΔ-EGFP/5'-EGFP=0,014) blau gestrichelt und Lymphozyten (Medianwerte in %: pEJ-EGFP=0,021; pHR-EGFP/3'-EGFP=0,118; pΔ-EGFP/3'-EGFP=0,091) durchgehend violett markiert.

Parallel zur DSBR-Messung wurde die γ H2AX-Fociverteilung der EMT-Zellen nach Bleomycinbehandlung durchgeführt (Abb. 32). Die quantitative Auswertung ergab für die

EMT-Zellen des Tumormaterials B1926/08 nach Bleomycininkubation eine Verdreifachung der Focianzahl im Vergleich zum Kontrollpräparat, wobei nach einer Regenerationszeit von 24 h eine weitere Akkumulation der Schäden auf das 5-fache nachgewiesen wurde. Demzufolge sind die EMT-Zellen des Tumormaterials B1926/08 stark Reparatur-defizient.

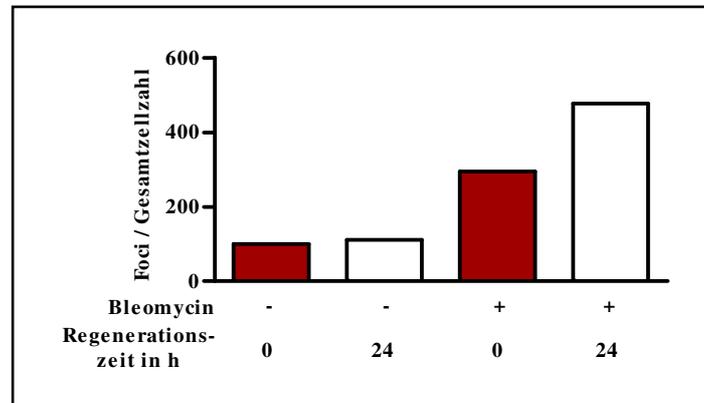


Abb. 32 Immunfluoreszenzanalyse mit EMT-Zellen des Tumormaterials B1926/08 zur Detektion der nukleären Verteilung von γ H2AX nach Bleomycininkubation und quantitative Auswertung der γ H2AX-Foci

Die EMT-Zellen wurden auf Objektgläsern ausgesät und 24 h mit 6 mU Bleomycin bzw. ddH₂O kultiviert und anschließend bzw. nach einer Regenerationsphase von weiteren 24 h auf den Objektgläsern fixiert. Die Immunfärbung der Präparate erfolgte mit einem spezifischen Antikörper gegen phosphoryliertes H2AX und einem Alexa-555 gekoppelten Sekundärantikörper. Die Werte einer Messung (n=1), relativiert auf die Kontrollwerte zu 0 h ohne Bleomycinbehandlung (=100 %, entspricht 0,3 Foci/Zelle) sind angegeben. Die roten Balken repräsentieren die Zellen direkt nach Behandlung mit Bleomycin/ddH₂O, die weißen Balken die Zellen nach einer Regenerationsphase von 24 h. Die quantitative Auswertung erfolgte mit der Software Cell^f 2.5 durch die Ermittlung der Anzahl roter Foci in 50 Zellkernen/Ansatz.

4.2.2.2 Detektion des putativ hereditären BRCA2-DSBR-Defektmusters in den primären Zellen des Tumormaterials B1905/08 und Lymphozyten aus derselben Brustkrebspatientin

Für die Bestimmung des DSBR-Defektmusters konnten Epithel- und EMT-Zellen aus dem Tumormaterial B1905/08 sowie Lymphozyten aus dem Blut der Brustkrebspatientin gewonnen werden. Fibroblasten waren jedoch nicht isolierbar. In Abb. 33 A wurden die Hellfeldaufnahmen der Epithel- und EMT-Zellen dargestellt. Die Epithelzellen wiesen reguläre eckige Strukturen auf (Abb. 33 A, links), während die EMT-Zellen eine irreguläre, zum Teil fächerförmige, großflächige Morphologie demonstrierten (Abb. 33 A, rechts).

Die Aufnahmen der IHC-Färbung in Abb. 33 B zeigten für die EMT-Zellen im Vergleich zur Negativkontrolle eine intensive Rotfärbung nach Inkubation mit Anti-Cytokeratin 8/18 sowie Anti-Vimentin. Die Epithelzellen zeigten eine Rotfärbung für Cytokeratin 8/18, jedoch nicht deutlich für Vimentin.

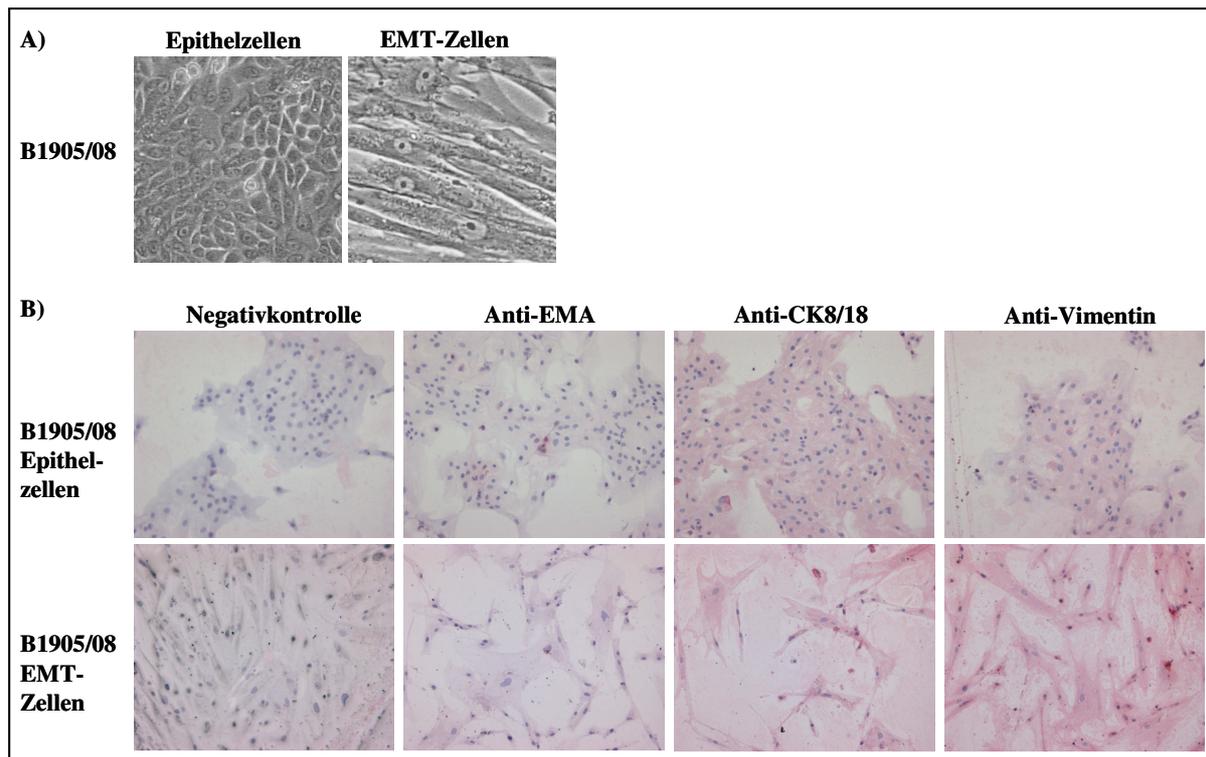


Abb. 33 Hellfeldaufnahme und IHC-Färbung der isolierten Epithel- und EMT-Zellkulturen aus dem Tumormaterial B1905/08

A) Die getrennt kultivierten Zellarten des Tumormaterials B1905/08 wurden mit einer 10-fachen Vergrößerung aufgenommen. Mit dem Bildbearbeitungsprogramm Gimp 2.6.4 wurde ein repräsentativer Bildbereich ausgewählt und dargestellt. B) Jeweils $0,5 \times 10^5$ Zellen wurden am Tag der Transfektion auf Objektträger ausgesät, 24 h nach Aussaat mit Methanol fixiert und mit Antikörpern über Nacht inkubiert. Die Detektion der gebundenen primären Antikörper erfolgte mit *Fast Red* (Rotfärbung). Für die Negativkontrolle wurden die Zellen nur mit Proteinblockierungslösung inkubiert. Für die Eingruppierung in unterschiedliche Zellarten wurden die fixierten Zellen mit den Antikörpern Anti-EMA, Anti-Cytokeratin 8/18 und Anti-Vimentin inkubiert. Die Epithelzelllinien MCF7 und MCF12a wurden zur Kontrolle bei jeder IHC-Färbung mitgeführt. Anhand der IHC-Färbung war eine eindeutige Charakterisierung der Zellkulturen in Epithel- und EMT-Zellen möglich. Die Charakterisierung der Zellen erfolgte visuell am Mikroskop, in Abhängigkeit von der Farbreaktion (Rotfärbung) der Zellen. Vergrößerung: 10-fach

Die DSBR-Frequenzen zu den primären Epithelzellen zeigten für SSA/HR mit kurzer Homologie (Abb. 34 B) eine 1,7-fache Steigerung, für NHEJ und HR (Abb. 34 A, C) wurden jedoch keine Veränderung im Vergleich zu den jeweiligen Medianwerten detektiert. Die primären Lymphozyten wiesen für SSA/HR mit kurzer Homologie (Abb. 34 B) ebenfalls eine 1,7-fache Erhöhung auf. Die Frequenzen für das NHEJ (Abb. 34 A) lagen mit 0,003 % unterhalb des Medianwertes für sämtliche Blutproben. Mit EMT-Zellen konnten für NHEJ keine grün fluoreszierenden Zellen nachgewiesen werden (Abb. 34 A). Das DSBR-Muster der Epithelzellen des Tumors B1926/08 sowie der Lymphozyten derselben Brustkrebspatientin zeigte somit eine Erhöhung von SSA (Abb. 34 B). Ein ähnliches DSBR-Defektmuster wurde mit den lymphoblastoiden Zelllinien HA238 und GM13023A mit *BRCA2/FANCD1*-Mutation detektiert. Anhand dieser Erkenntnis wurde das DSBR-Muster der aus dem Tumormaterial B1905/08 und dem Blut gewonnenen Zellen dem hereditären *BRCA2*-DSBR-Defektmuster

zugeordnet, womit die Patientin eine oder mehrere genetische Veränderungen aufweisen könnte, die zu Defekten im Brca2-Reaktionsweg führen.

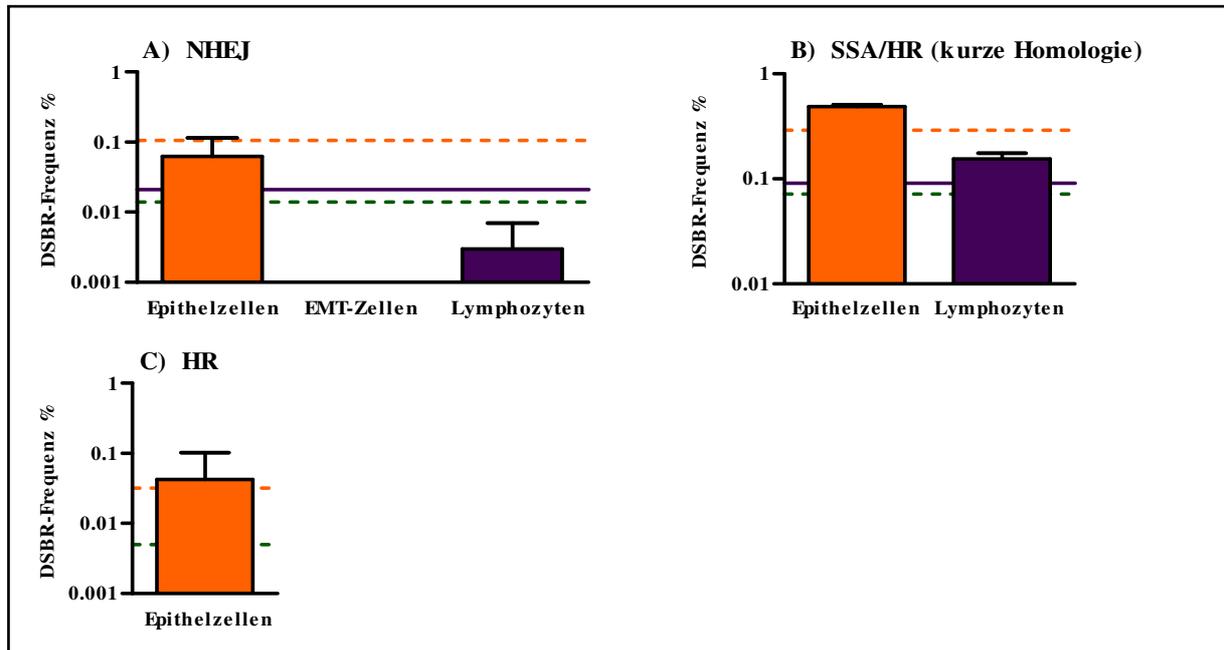


Abb. 34 Analyse der DSBR-Aktivitäten in primären Zellen aus Tumormaterial B1905/08 und in Lymphozyten aus dem Blut derselben Brustkrebspatientin

Für die Bestimmung der DSBR-Ereignisse wurden die Zellen mit einem Mix aus DSBR-, pBS- und pCMV-I-SceI-Expressionsplasmid transfiziert, 24 h kultiviert und anschließend der Anteil grün fluoreszierender Zellen am Durchflusszytometer bestimmt. Die Mittelwerte und die berechneten Standardabweichungen sind in Balkendiagrammen angegeben. Die primären Epithelzellen (orange), EMT-Zellen (grün) und Lymphozyten (violett) wurden mit den DSBR-Plasmiden **A)** pEJ-EGFP, **B)** pΔ-EGFP/3'-EGFP und **C)** pΔ-EGFP/5'-EGFP transfiziert. Die Geraden markieren die Medianwerte zu den jeweiligen Zellarten und DSBR-Plasmiden (Tab. 10). Die Medianwerte zu den einzelnen Zellarten sind wie folgt dargestellt: EMT-Zellen (Medianwerte in %: pEJ-EGFP=0,014; pΔ-EGFP/3'-EGFP=0,072; pΔ-EGFP/5'-EGFP=0,005) wurden grün gestrichelt, Epithel (Medianwerte in %: pEJ-EGFP=0,105; pΔ-EGFP/3'-EGFP=0,292; pΔ-EGFP/5'-EGFP=0,032) orange gestrichelt und Lymphozyten (Medianwerte in %: pEJ-EGFP=0,021; pΔ-EGFP/3'-EGFP=0,091) durchgehend violett markiert.

Die quantitative Auswertung der γ H2AX-Färbung (Abb. 35) demonstrierte für die Kontrollpräparate (ddH₂O) eine Senkung der relativierten Focianzahlen von 100 % auf 66 % nach einer Regenerationszeit von 24 h. Die Zellen zeigten direkt nach Bleomycininkubation keine Zunahme der Focianzahl. Nach einer Regenerationsphase von 24 h konnte jedoch eine Verdoppelung der γ H2AX-Focianzahl auf 188 % detektiert werden, was auf eine zeitlich verzögerte Akkumulation von DNA-Schäden hindeutet. Die Zunahme der Brüche in der Regenerationsphase könnte durch die Umwandlung von Einzelstrangbrüchen in DSBe an der Replikationsgabel in proliferierenden Zellen erklärt werden.

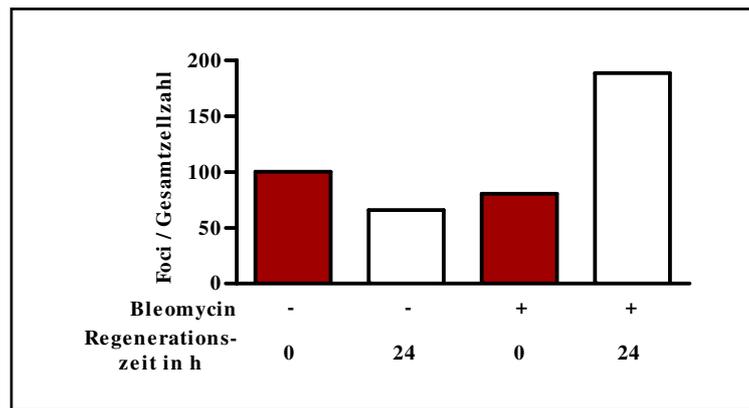


Abb. 35 Immunfluoreszenzanalyse mit Epithelzellen des Tumormaterials B1905/08 zur Detektion der nukleären Verteilung von γ H2AX nach Bleomycininkubation und quantitative Auswertung der γ H2AX-Foci

Die Epithelzellen wurden auf Objektgläschen ausgesät und 24 h mit 6 mU Bleomycin bzw. ddH₂O kultiviert und anschließend bzw. nach einer Regenerationsphase von weiteren 24 h auf den Objektgläsern fixiert. Die Immunfärbung der Präparate erfolgte mit einem spezifischen Antikörper gegen phosphoryliertes H2AX und einem Alexa-555 gekoppelten Sekundärantikörper. Die Werte einer γ H2AX-Färbung (n=1), relativiert auf die Kontrollwerte zu 0 h ohne Bleomycinbehandlung (=100%, entspricht 3,6 Foci/Zelle) sind angegeben. Die roten Balken repräsentieren die Zellen direkt nach Behandlung mit Bleomycin/ddH₂O, die weißen Balken die Zellen nach einer Regenerationsphase von 24 h. Die quantitative Auswertung erfolgte mit der *Software Cell^f 2.5* durch die Ermittlung der Anzahl roter Foci in 50 Zellkernen/Ansatz.

4.2.2.3 Detektion des putativ hereditären NBN/RAD50-DSBR-Defektmusters in den primären Zellen des Tumormaterials B4841/08 und Lymphozyten aus derselben Brustkrebspatientin

Für die Untersuchung der DSBR-Aktivitäten konnten Epithelzellen und Fibroblasten aus dem Tumormaterial B4841/08 und Lymphozyten aus dem Blut derselben Brustkrebspatientin isoliert und kultiviert werden. EMT-Zellen waren nicht isolierbar. Die in Abb. 36 A dargestellten Fibroblastenzellen zeichneten sich durch eine spindelförmig, fischgräten-artige Anordnung aus und wurden nach der Positivselektion als nicht EMA-markierte Zellen aus einer Mischkultur gewonnen. Infolge der IHC-Färbung (Abb. 36 B) konnten die Epithelzellen durch eine intensive Rotfärbung mit Anti-Cytokeratin 8/18 sowie einer eindeutigen Signalgebung mit Anti-EMA ermittelt werden. Interessanterweise wurde an diesem Färbetag auch eine intensive Rotfärbung von Anti-Vimentin bei Epithelzellen detektiert. Da an diesem Tag die Kontrollzelllinien MCF12a und MCF7 ebenfalls eine positive Farbreaktion auf Vimentin zeigten, wurde diese als falsch-positiv eingestuft und nicht weiter berücksichtigt. Die Fibroblasten wurden durch die intensive Rotfärbung von Anti-Vimentin charakterisiert.

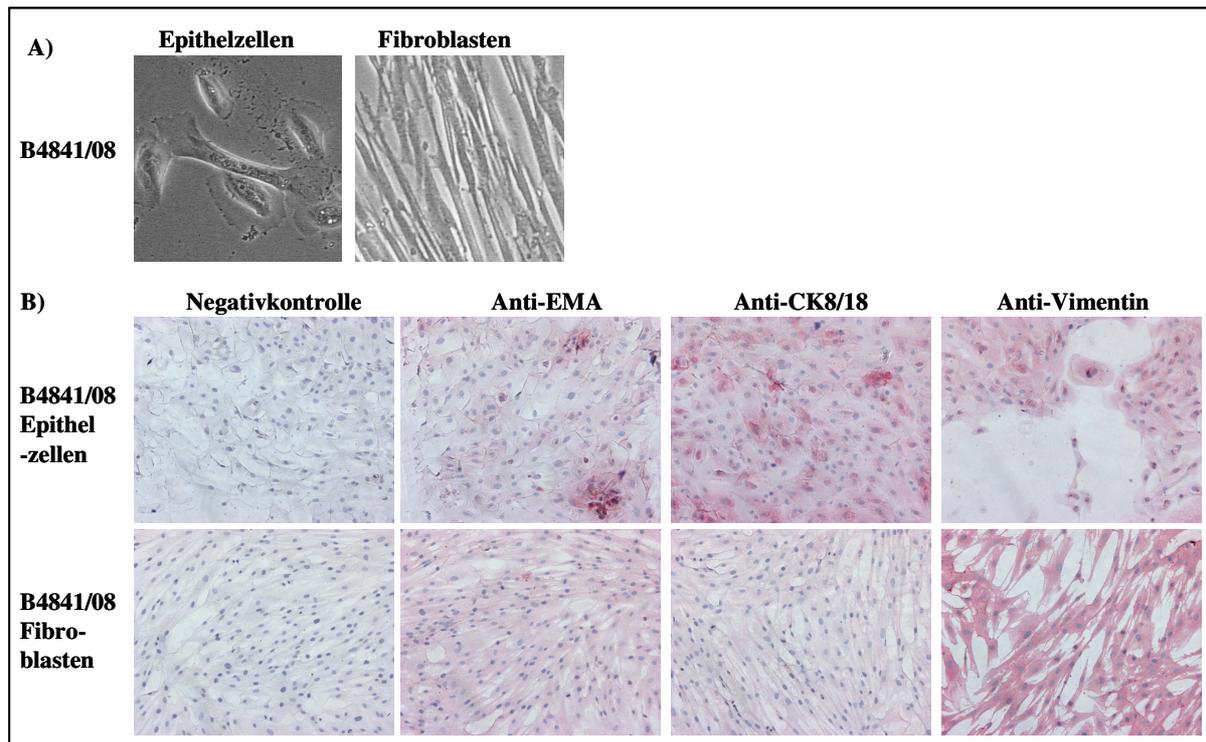


Abb. 36 Hellfeldaufnahme und IHC-Färbung der isolierten Epithel- und Fibroblastenkulturen aus dem Tumormaterial B4841/08

A) Die getrennt kultivierten Zellarten des Tumormaterials B4841/08 wurden mit einer 10-fachen Vergrößerung aufgenommen. Mit dem Bildbearbeitungsprogramm Gimp 2.6.4 wurde ein repräsentativer Bildbereich ausgewählt und dargestellt. B) Jeweils $0,5 \times 10^5$ Zellen wurden am Tag der Transfektion auf Objektträger ausgesät, 24 h nach Aussaat mit Methanol fixiert und mit Antikörpern über Nacht inkubiert. Die Detektion der gebundenen primären Antikörper erfolgte mit *Fast Red* (Rotfärbung). Für die Negativkontrolle wurden die Zellen nur mit Proteinblockierungslösung inkubiert. Für die Eingruppierung in unterschiedliche Zellarten wurden die fixierten Zellen mit den Antikörpern Anti-EMA, Anti-Cytokeratin 8/18 und Anti-Vimentin inkubiert. Die Epithelzelllinien MCF7 und MCF12a wurden zur Kontrolle bei jeder IHC-Färbung mitgeführt. Anhand der IHC-Färbung war eine eindeutige Charakterisierung der Zellkulturen in EMT-Zellen und Fibroblasten möglich. Die Charakterisierung der Zellen erfolgte visuell am Mikroskop, in Abhängigkeit von der Farbreaktion (Rotfärbung) der Zellen. Vergrößerung:10-fach

Die Ergebnisse der DSBR-Messungen wurden in Abb. 37 graphisch dargestellt. Die Fibroblasten wiesen für NHEJ (Abb. 37 A) und SSA/HR mit langer Homologie (Abb. 37 B) eine Reduktion auf 15 %, für SSA/HR mit kurzer Homologie (Abb. 37 C) eine Senkung der DSBR-Frequenzen auf 50 % im Vergleich zu den jeweiligen Medianwerten auf. Die primären Lymphozyten zeigten eine drastische Reduktion für das NHEJ (Abb. 37 A), sowie eine Senkung der DSBR-Daten auf 50 % bzw. 30 % für SSA/HR mit langer bzw. kurzer Homologie (Abb. 37 B-C), verglichen mit den Medianwerten aller Brustkrebspatientinnen. Die Epithelzellen lagen mit den DSBR-Daten für SSA/HR ca. 1,5-fach über den Medianwerten aller Epithelzellen (Abb. 37 B-C), HR war 4-fach erhöht (Abb. 37 D) und NHEJ (Abb. 37 A) erlaubte aufgrund der hohen Standardabweichung keine eindeutige Aussage. Die Ergebnisse zu den Fibroblasten und primären Lymphozyten lassen infolge der starken Reduktion aller DSBR-Daten auf einen hereditären *NBN/RAD50*-DSBR-Defekttyp

schließen. Die Erhöhung der HR in den Epithelzellen könnte auf eine im Tumor erworbene, zusätzliche *TP53*-Mutation hindeuten.

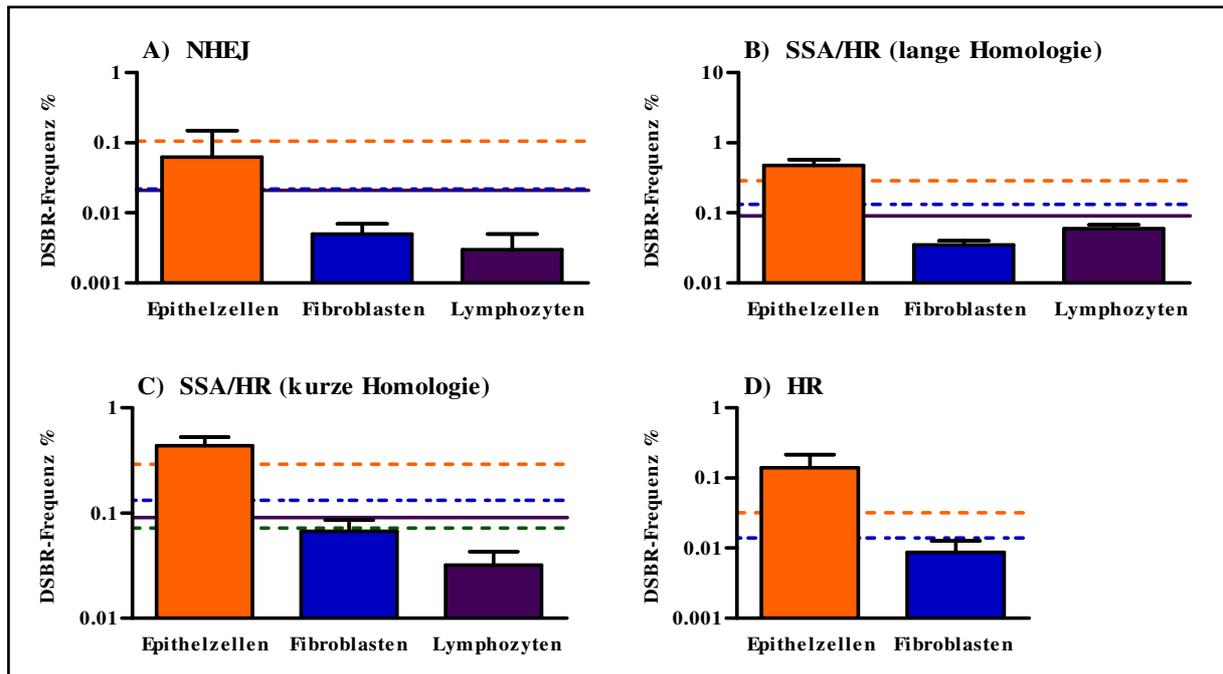


Abb. 37 Analyse der DSBR-Aktivitäten in primären Zellen aus Tumormaterial B4841/08 und in Lymphozyten aus dem Blut derselben Brustkrebspatientin

Für die Bestimmung der DSBR-Ereignisse wurden die Zellen mit einem Mix aus DSBR-, pBS- und pCMV-I-SceI-Expressionsplasmid transfiziert, 24 h kultiviert und anschließend der Anteil grün fluoreszierender Zellen am Durchflusszytometer bestimmt. Die Mittelwerte und die berechneten Standardabweichungen sind in Balkendiagrammen angegeben. Die primären Epithelzellen (orange), Fibroblasten (blau) und Lymphozyten (violett) wurden mit den DSBR-Plasmiden **A**) pEJ-EGFP, **B**) pHR-EGFP/ 3'-EGFP, **C**) pΔ-EGFP/3'-EGFP und **D**) pΔ-EGFP/5'-EGFP transfiziert. Die Geraden markieren die Medianwerte zu den jeweiligen Zellarten und DSBR-Plasmiden (Tab. 10). Die Medianwerte zu den einzelnen Zellarten sind wie folgt dargestellt: die Fibroblasten (Medianwerte in %: pEJ-EGFP=0,022; pHR-EGFP/3'-EGFP=0,132; pΔ-EGFP/3'-EGFP=0,133; pΔ-EGFP/5'-EGFP=0,014) wurden blau gestrichelt, Epithelzellen (Medianwerte in %: pEJ-EGFP=0,105; pHR-EGFP/3'-EGFP=0,287; pΔ-EGFP/3'-EGFP=0,292; pΔ-EGFP/5'-EGFP=0,032) orange gestrichelt und Lymphozyten (Medianwerte in %: pEJ-EGFP=0,021; pHR-EGFP/3'-EGFP=0,118; pΔ-EGFP/3'-EGFP=0,091) durchgehend violett markiert.

Die quantitative Auswertung der γ H2AX-Immunantwort in den primären Epithelzellen (Abb. 38) zeigte einen drastischen Anstieg der Focianzahl direkt nach der Bleomycininkubation auf das 4-fache des Ausgangswertes. Nach der Reinkubationszeit von 24 h konnte eine Reduktion der Focianzahl auf 80 % detektiert werden. Die Kontrollpräparate wiesen einen geringen Anstieg auf 160 % nach einer Regenerationszeit von 24 h auf. Dementsprechend sind die Zellen befähigt, induzierte DSBe zu reparieren, wobei die DSBR wahrscheinlich vorwiegend über das fehlerfreie NHEJ erfolgt, welches per γ H2AX-Analyse zu 80-90 % nachgewiesen wird (Riballo *et al.*, 2004).

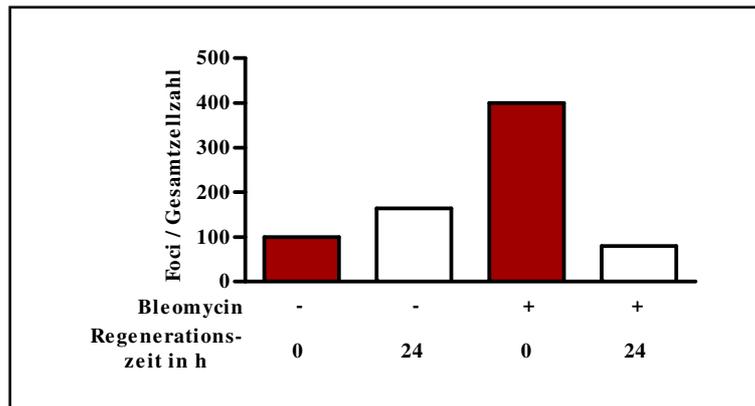


Abb. 38 Immunfluoreszenzanalyse mit Epithelzellen des Tumormaterials B4841/08 zur Detektion der nukleären Verteilung von γ H2AX nach Bleomycininkubation und quantitative Auswertung der γ H2AX-Foci

Die Epithelzellen wurden auf Objektgläsern ausgesät und 24 h mit 6 mU Bleomycin bzw. ddH₂O kultiviert und anschließend bzw. nach einer Regenerationsphase von weiteren 24 h auf den Objektgläsern fixiert. Die Immunfärbung der Präparate erfolgte mit einem spezifischen Antikörper gegen phosphoryliertes H2AX und einem Alexa-555 gekoppelten Sekundärantikörper. Die Werte einer γ H2AX-Färbung (n=1), relativiert auf Kontrollwerte zu 0 h ohne Bleomycinbehandlung (=100 %, entspricht 0,5 Foci/Zelle) sind angegeben. Die roten Balken repräsentieren die Zellen direkt nach Behandlung mit Bleomycin/ddH₂O, die weißen Balken die Zellen nach einer Regenerationsphase von 24 h. Die quantitative Auswertung erfolgte mit der Software Cell^F 2.5 durch die Ermittlung der Anzahl roter Foci in 50 Zellkernen/Ansatz.

4.2.2.4 Detektion des putativ nicht hereditären BRCA1-DSBR-Defektmusters in den primären Zellen des Tumormaterials G1676/06 und Lymphozyten aus derselben Brustkrebspatientin

Aus dem zur Verfügung stehenden Tumormaterial G1676/06 konnten Epithelzellen und Fibroblasten zur Weiterkultivierung gewonnen und aus dem Blut derselben Patientin primäre Lymphozyten isoliert werden. EMT-Zellen wurden nicht isoliert. In Abb. 39 A wurden die morphologischen Besonderheiten der unterschiedlichen Zellarten in repräsentativen Aufnahmen dargestellt. Die Epithelzellen (Abb. 39 A, links) zeigten ebene, eckige bis ovale Formen, die Fibroblasten eine spindelförmige, lang gezogene Morphologie auf (Abb. 39 A, rechts).

Da nicht genügend Epithelzellen kultiviert wurden, konnte die IHC-Färbung nur für die Fibroblasten durchgeführt werden und ist in Abb. 39 B als Bildfolge dargestellt. Das Ausbleiben einer Immunantwort nach Inkubation mit Anti-EMA und Anti-Cytokeratin 8/18 und die schwache Rotfärbung für Anti-Vimentin lässt eindeutig auf Fibroblasten schließen.

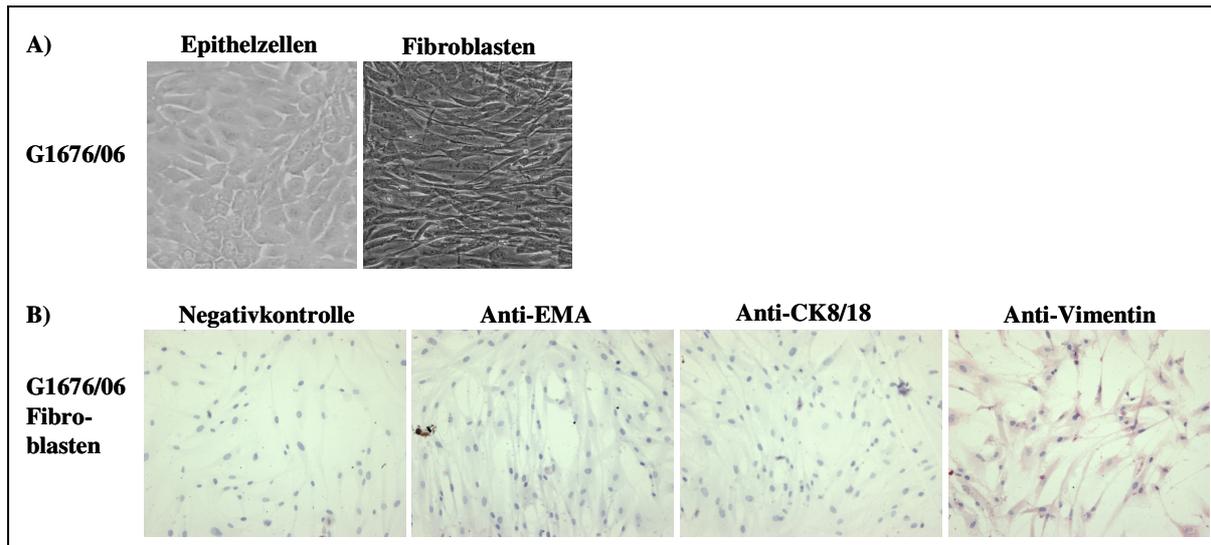


Abb. 39 Hellfeldaufnahme und IHC-Färbung der isolierten Epithel- und Fibroblastenkulturen aus dem Tumormaterial G1676/06

A) Die getrennt kultivierten Zellarten des Tumormaterials G1676/06 wurden mit einer 10-fachen Vergrößerung aufgenommen. Mit dem Bildbearbeitungsprogramm Gimp 2.6.4 wurde ein repräsentativer Bildbereich ausgewählt und dargestellt. B) Jeweils $0,5 \times 10^5$ Zellen wurden am Tag der Transfektion auf Objektträger ausgesät, 24 h nach Aussaat mit Methanol fixiert und mit Antikörpern über Nacht inkubiert. Die Detektion der gebundenen primären Antikörper erfolgte mit *Fast Red* (Rotfärbung). Für die Negativkontrolle wurden die Zellen nur mit Proteinblockierungslösung inkubiert. Für die Eingruppierung in unterschiedliche Zellarten wurden die fixierten Zellen mit den Antikörpern Anti-EMA, Anti-Cytokeratin 8/18 und Anti-Vimentin inkubiert. Die Epithelzelllinien MCF7 und MCF12a wurden zur Kontrolle bei jeder IHC-Färbung mitgeführt. Anhand der IHC-Färbung war eine eindeutige Charakterisierung der Fibroblasten möglich. Die Charakterisierung der Zellen erfolgte visuell am Mikroskop, in Abhängigkeit von der Farbreaktion (Rotfärbung) der Zellen. Vergrößerung: 10-fach

Die quantitative Auswertung der DSB-R-Ergebnisse wurde in Abb. 40 graphisch dargestellt. Die Epithelzellen des Tumormaterials G1676/06 wiesen mit 0,467 % eine 4,5-fache Erhöhung der NHEJ-Frequenzen auf (Abb. 40 A), während die Lymphozyten für NHEJ und die primären Fibroblasten für NHEJ, SSA/HR mit langer und kurzer Homologie sowie HR (Abb. 40 A-D) keine Unterschiede zu den jeweils ermittelten Medianwerten aufzeigten. Die Erhöhung der NHEJ-Frequenzen für die primären Epithelzellen könnte auf eine spontane Mutation im *BRCA1*-Gen oder eine Erniedrigung der *Brcal*-Expression durch epigenetische Mechanismen, wie sie in 20-30 % der Tumore beobachtet wurden (siehe Review Ralhan *et al.*, 2007), hindeuten. Für die genauere Einteilung fehlt jedoch die Messung von SSA/HR und HR mit Epithelzellen, da eine Erhöhung von NHEJ sowohl für den *BRCA1*- als auch seltener für den *BRCA2*-DSBR-Defekttyp detektiert wurde.

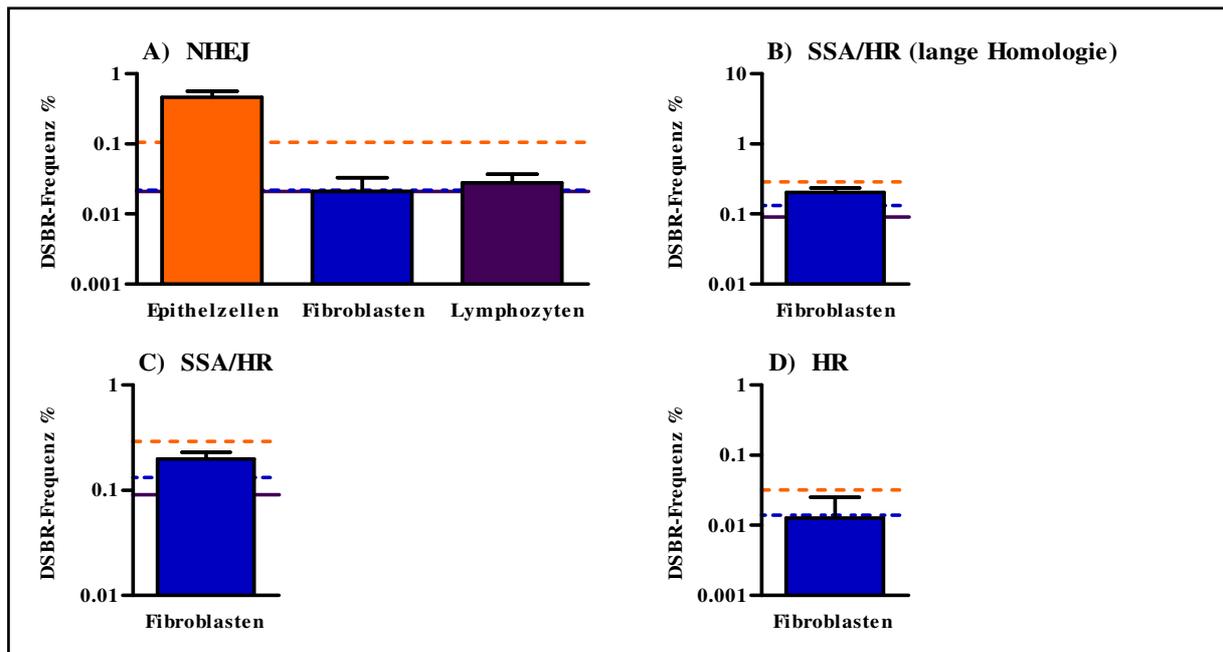


Abb. 40 Analyse der DSBR-Aktivitäten in primären Zellen aus Tumormaterial G1676/06 und in Lymphozyten aus dem Blut derselben Brustkrebspatientin

Für die Bestimmung der DSBR-Ereignisse wurden die Zellen mit einem Mix aus DSBR-, pBS- und pCMV-I-SceI-Expressionsplasmid transfiziert, 24 h kultiviert und anschließend der Anteil grün fluoreszierender Zellen am Durchflusszytometer bestimmt. Die Mittelwerte und die berechneten Standardabweichungen sind in Balkendiagrammen angegeben. Die primären Epithelzellen (orange), Fibroblasten (blau) und Lymphozyten (violett) wurden mit den DSBR-Plasmiden **A)** pEJ-EGFP, **B)** pHR-EGFP/3'-EGFP, **C)** pΔ-EGFP/3'-EGFP und **D)** pΔ-EGFP/5'-EGFP transfiziert. Die Geraden markieren die Medianwerte zu den jeweiligen Zellarten und DSBR-Plasmiden (Tab. 10). Die Medianwerten zu den einzelnen Zellarten sind wie folgt dargestellt: Fibroblasten (Medianwerte in %: pEJ-EGFP=0,022; pHR-EGFP/3'-EGFP=0,132; pΔ-EGFP/3'-EGFP=0,133; pΔ-EGFP/5'-EGFP=0,014) werden blau gestrichelt, Epithel (Medianwerte in %: pEJ-EGFP=0,105; pHR-EGFP/3'-EGFP=0,287; pΔ-EGFP/3'-EGFP=0,292; pΔ-EGFP/5'-EGFP=0,032) orange gestrichelt und Lymphozyten (Medianwerte in %: pEJ-EGFP=0,021; pHR-EGFP/3'-EGFP=0,118; pΔ-EGFP/3'-EGFP=0,091) durchgehend violett markiert.

4.2.2.5 Detektion des putativ nicht hereditären TP53-DSBR-Defektmusters in den primären Zellen des Tumormaterials B12666/07 und Lymphozyten derselben Brustkrebspatientin

Aus dem Tumormaterial B12666/07 konnten für die DSBR-Analysen primäre Epithelzellen und parallel dazu aus dem Blut der Patientin primäre Lymphozyten gewonnen werden. EMT-Zellen und Fibroblasten konnten jedoch nicht aus dem Tumormaterial isoliert werden. In Abb. 41 A ist ein charakteristischer Ausschnitt einer mit Epithelzellen bewachsenen Zellkulturflasche abgebildet. Da Epithelzellen meist als Zellanhäufungen in so genannten Plaques auftreten, kommt es infolge von Zellteilungen im Inneren dieser Zellhaufen zu einer starken Verdichtung der Zellen. Damit einhergehend ändert sich die Morphologie dieser Zellen. Während die Zellen am Rand eines Plaques als Monolayer ebene, eckige bis ovale Formen annehmen, werden diese im Zentrum stark verengt, und treten zum Teil mehrschichtig auf. Die ausgewählte Abbildung zeigt diese Anordnung. Während die Zellen

im linken Bildbereich verdichtete, mehrschichtige Strukturen vorweisen, sind die Zellen im rechten, unteren Bildbereich größer, ebenmäßiger und zeigen eher die typische epitheliale Ausprägung.

Die IHC-Färbung der primären Zellen wurde in Abb. 41 B dargestellt. Die untersuchten Zellen waren Cytokeratin 8/18 und EMA positiv und wurden trotz leichter Rotfärbung nach Anti-Vimentin-Inkubation als Epithelzellen charakterisiert, da die Morphologie der Zellen die typische epitheliale Ausprägung aufwies.

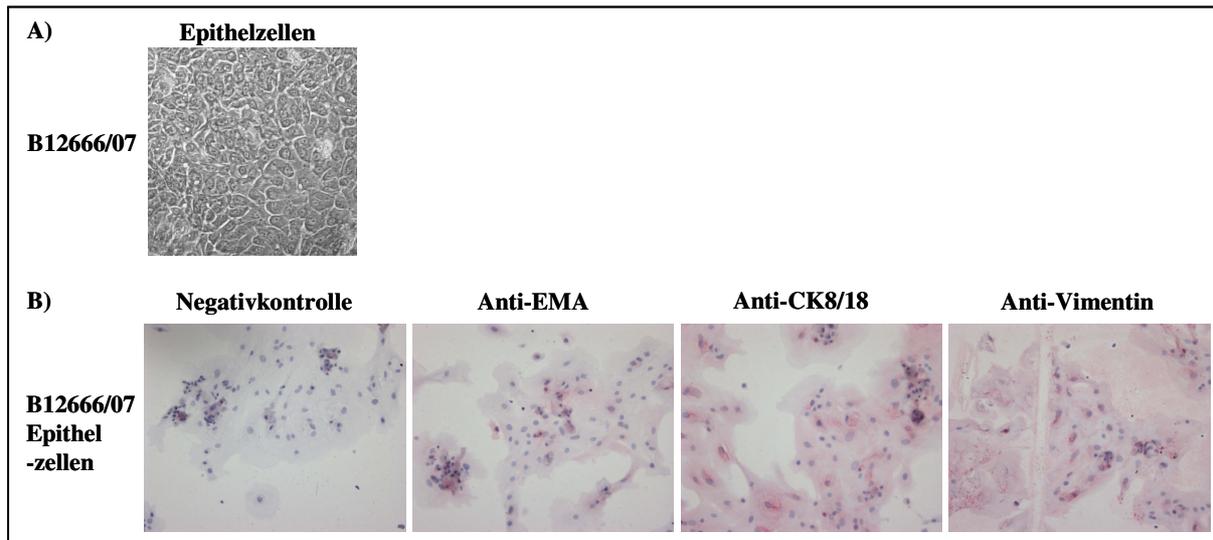


Abb. 41 Hellfeldaufnahme und IHC-Färbung der isolierten Epithelzellen aus dem Tumormaterial B12666/07

A) Die Epithelzellen des Tumors B12666/07 wurden mit einer 10-fachen Vergrößerung aufgenommen. Mit dem Bildbearbeitungsprogramm Gimp 2.6.4 wurde ein repräsentativer Bildbereich ausgewählt und dargestellt. **B)** Jeweils $0,5 \times 10^5$ Zellen wurden am Tag der Transfektion auf Objektträger ausgesät, 24 h nach Aussaat mit Methanol fixiert und mit Antikörpern über Nacht inkubiert. Die Detektion der gebundenen primären Antikörper erfolgte mit *Fast Red* (Rotfärbung). Für die Negativkontrolle wurden die Zellen nur mit Proteinblockierungslösung inkubiert. Für die Eingruppierung in unterschiedliche Zellarten wurden die fixierten Zellen mit den Antikörpern Anti-EMA, Anti-Cytokeratin 8/18 und Anti-Vimentin inkubiert. Die Epithelzelllinien MCF7 und MCF12a wurden zur Kontrolle bei jeder IHC-Färbung mitgeführt. Anhand der IHC-Färbung war eine eindeutige Charakterisierung der Epithelzellen möglich. Die Charakterisierung der Zellen erfolgte visuell am Mikroskop, in Abhängigkeit von der Farbreaktion (Rotfärbung) der Zellen. Vergrößerung: 10-fach

Die quantitative Analyse der DSBR-Ergebnisse und die ermittelten Standardabweichungen sind in Abb. 42 in Balkendiagrammen graphisch dargestellt. Darin ersichtlich lagen die NHEJ- und SSA/HR-Frequenzen der Epithelzellen (Abb. 42 A-C) im Bereich der ermittelten Medianwerte. Für die HR (Abb. 42 D) konnte eine 3-fache Steigerung detektiert werden, was möglicherweise auf eine nicht hereditäre, also im Tumor erworbene *TP53*-Mutation hindeutet. Die NHEJ-Frequenzen der primären Lymphozyten aus dem Blut der Brustkrebspatientin wiesen dagegen eine Reduktion im Vergleich zum ermittelten Medianwert auf.

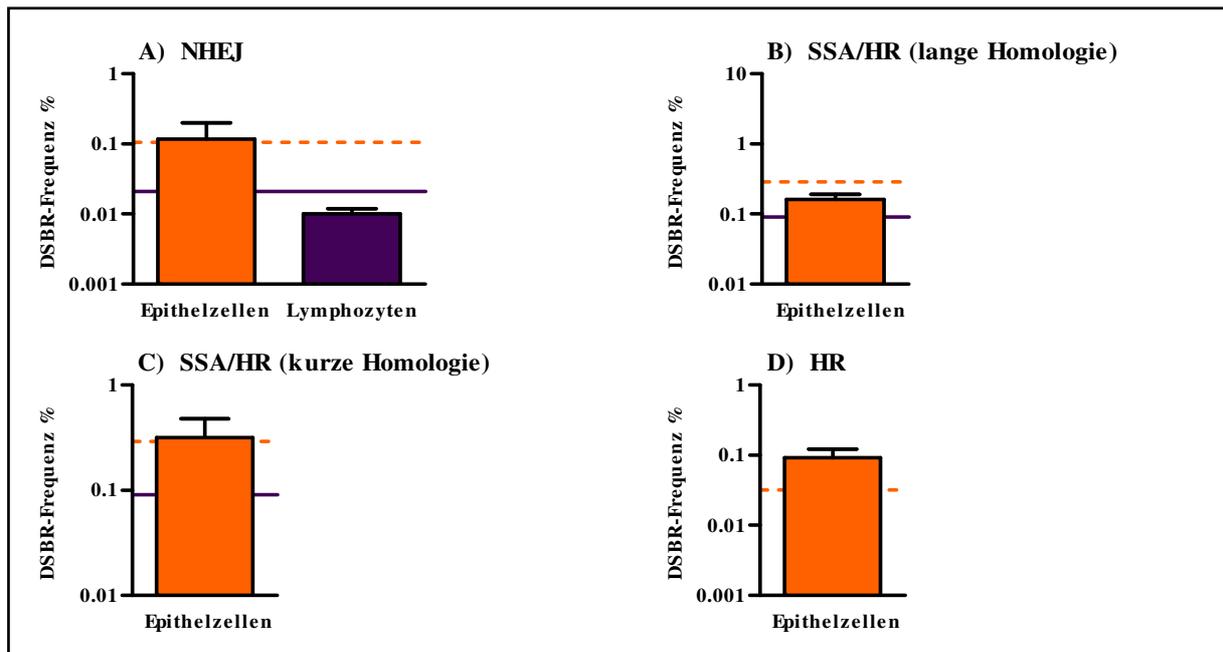


Abb. 42 Analyse der DSBR-Aktivitäten in primären Zellen aus Tumormaterial B12666/07 und in Lymphozyten aus dem Blut derselben Brustkrebspatientin

Für die Bestimmung der DSBR-Ereignisse wurden die Zellen mit einem Mix aus DSBR-, pBS- und pCMV-I-SceI-Expressionsplasmid transfiziert, 24 h kultiviert und anschließend der Anteil grün fluoreszierender Zellen am Durchflusszytometer bestimmt. Die Mittelwerte und die berechneten Standardabweichungen sind in Balkendiagrammen angegeben. Die primären Epithelzellen (orange) und Lymphozyten (violett) wurden mit den DSBR-Plasmiden **A**) pEJ-EGFP, **B**) pHR-EGFP/3'-EGFP, **C**) pΔ-EGFP/3'-EGFP und **D**) pΔ-EGFP/5'-EGFP transfiziert. Die Geraden markieren die Medianwerte zu den jeweiligen Zellarten und DSBR-Plasmiden (Tab. 10). Die Medianwerten zu den einzelnen Zellarten sind wie folgt dargestellt: Epithel (Medianwerte in %: pEJ-EGFP=0,105; pHR-EGFP/3'-EGFP=0,287; pΔ-EGFP/3'-EGFP=0,292; pΔ-EGFP/5'-EGFP=0,032) sind orange gestrichelt und Lymphozyten (Medianwerte in %: pEJ-EGFP=0,021; pHR-EGFP/3'-EGFP=0,118; pΔ-EGFP/3'-EGFP=0,091) durchgehend violett markiert.

Die quantitative Auswertung (Abb. 43) der γ H2AX-Focibildung im Tumor B12666/07 zeigte für Zellen ohne Bleomycinbehandlung eine 7-fache Steigerung der Focianzahl nach einer Reinkubationszeit von 24 h. Die Bleomycinbehandlung der primären Epithelzellen führte zu einer Verdreifachung der γ H2AX-Focianzahl, die infolge der Regenerationsphase von 24 h konstant blieb. Diesbezüglich sind die Epithelzellen des Tumormaterials B12666/07 nicht fähig künstlich induzierte DSBe zu reparieren, sind also Reparatur-defizient. Die starke Zunahme in der Kontrolle könnte auf hohen Replikationsstress in diesen Zellen hinweisen, welcher bereits in Tumorzellen beobachtet wurde (Bartkova *et al.*, 2005; Chanoux *et al.*, 2009; Gorgoulis *et al.*, 2005).

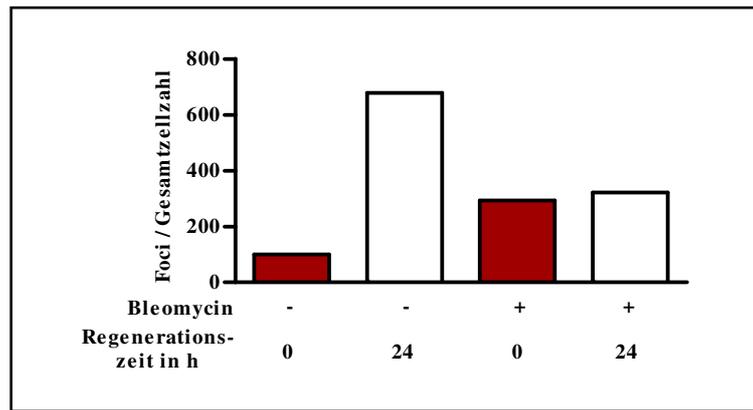


Abb. 43 Immunfluoreszenzanalyse mit Epithelzellen des Tumormaterials B12666/07 zur Detektion der nukleären Verteilung von γ H2AX nach Bleomycininkubation und quantitative Auswertung der γ H2AX-Foci

Die Epithelzellen wurden auf Objektgläschen ausgesät und 24 h mit 6 μ M Bleomycin bzw. ddH₂O kultiviert und anschließend bzw. nach einer Regenerationsphase von weiteren 24 h auf den Objektgläsern fixiert. Die Immunfärbung der Präparate erfolgte mit einem spezifischen Antikörper gegen phosphoryliertes H2AX und einem Alexa-555 gekoppelten Sekundärantikörper. Die Werte einer γ H2AX-Färbung ($n=1$), relativiert auf Kontrollwerte 0 h ohne Bleomycinbehandlung (=100 %, entspricht 3 Foci/Zelle) sind angegeben. Die roten Balken repräsentieren die Zellen direkt nach Behandlung mit Bleomycin/ddH₂O, die weißen Balken die Zellen nach einer Regenerationsphase von 24 h. Die quantitative Auswertung erfolgte mit der Software Cell^f 2.5 durch die Ermittlung der Anzahl roter Foci in 50 Zellkernen/Ansatz.

4.2.3 DSBR-Defektmuster vergleichend für die verschiedenen Zellarten

Wie bereits beschrieben, wurden für die Einteilung der Brusttumore in die unterschiedlichen DSBR-Defekttypen die DSBR-Aktivitäten der verschiedenen Zellarten aus dem Tumormaterial und der Lymphozyten aus dem Blut derselben Brustkrebspatientinnen detektiert. Dabei war es teilweise möglich die Zellen in die bereits beschriebenen *BRCA1*-, *BRCA2*-, *NBN/RAD50*- und *TP53*-DSBR-Defektmuster einzuordnen. Neben diesen Einteilungskriterien wurden zwei weitere nämlich der „Misch-DSBR-Defekt“ und die Kategorie „nicht einteilbar“ erstellt. Ein Misch-DSBR-Defekt lag vor, wenn die ermittelten DSBR-Aktivitäten die Einteilung des Tumormaterials in zwei DSBR-Defekttypen ermöglichte. Wie zum Beispiel bei dem Tumormaterial G2080/05 (siehe Anhang 9.4, Tab. 17), bei dem die drastische Erhöhung der HR eine Einteilung in den *TP53*-DSBR-Defekttyp, die starke Erhöhung von NHEJ und SSA/HR jedoch die Einteilung in den *BRCA1*-DSBR-Defekttyp ermöglichte. Wenn die DSBR-Aktivitäten der Zellen jedoch nahe dem Medianwert für die jeweilige Zellart lagen, oder die Aussagen der verschiedenen Zellarten zu widersprüchlich waren, konnte keine Aussage getroffen werden. Das Tumormaterial war demzufolge nicht in ein DSBR-Defektmuster einteilbar. Als Beispiel könnte der Tumor G732/07 (siehe Anhang 9.4, Tab. 17) genannt werden, bei dem die DSBR-Aktivitäten der Epithelzellen nahe dem ermittelten Medianwert lagen und keine Aussage ermöglichten, während für die Fibroblasten ein *NBN/RAD50*-, für die Lymphozyten ein *TP53*-DSBR-

Defektmuster deklariert werden könnte. Diesbezüglich war die Einteilung der Tumore in die verschiedenen Kategorien zum Teil sehr schwierig.

Bei genauerer Analyse fiel auf, dass die Ergebnisse der 16 primären Epithelzellkulturen am besten für die Einteilung in die spezifischen DSBR-Defekttypen geeignet waren. Diesbezüglich lieferten 13 Epithelzellkulturen bereits ohne Betrachtung anderer Zellarten der Brustkrebspatientinnen deutliche Aussagen zur Einteilung in die Kategorien *BRCA1*-, *BRCA2*-, *NBN/RAD50*-, *TP53*-DSBR-Defektmuster und Misch-DSBR-Defekt. Bei den EMT-Zellen konnten 12 von 16 Zellkulturen in diese Kategorien eingeteilt werden.

Die Untersuchung der DSBR-Aktivitäten in den tumorbildenden Epithelzellen bzw. EMT-Zellen allein ermöglichte jedoch keine Aussage über putativ hereditäre DSBR-Defektmuster, da die Defektmuster sowohl auf erbliche als auch auf epigenetische Faktoren zurückzuführen wären. Diesbezüglich war die Messung der DSBR-Aktivitäten in den Fibroblasten und/oder in den Lymphozyten aus dem Blut der Patientin notwendig. Interessanterweise konnten auch für Fibroblasten und Lymphozyten eindeutige Effekte in der DSBR detektiert werden, womit die zusätzliche Messung dieser Zellen die Einteilung in putativ hereditäre DSBR-Defektmuster ermöglichte. Die Analyse der DSBR-Aktivitäten der 30 Fibroblastenkulturen ermöglichte die Einteilung von 20 Kulturen in die Kategorien *BRCA1*-, *BRCA2*-, *NBN/RAD50*-, *TP53*-DSBR-Defektmuster und Misch-DSBR-Defekt, bei den Lymphozyten der entsprechenden Brustkrebspatientinnen konnten 19 von 27 Kulturen eingestuft werden.

Für 20 der insgesamt 47 Brusttumore konnten die DSBR-Aktivitäten von Epithel- bzw. EMT-Zellen und Fibroblasten bzw. Lymphozyten aus dem Blut der Patientin detektiert werden. Bei der Analyse dieser 20 Patientinnen zeigte sich, dass elf dem putativ hereditären DSBR-Defektmuster zugeordnet werden konnten. Demzufolge wurde mit dem *EGFP*-basierten DSBR-Testsystem über 50 % der Tumore (11 von 20) ein putativ hereditärer DSBR-Defekt zugewiesen, wohingegen laut Literatur lediglich 10-25 % der Brustkrebserkrankungen hereditär bedingt sind (Ralhan *et al.*, 2007; Szpirer and Szpirer, 2007). Die DSBR-Aktivitäten von vier Patientinnen deuten eher auf epigenetische Faktoren oder im Tumor erworbene Mutationen hin. Für fünf Patientinnen erlaubten die DSBR-Aktivitäten der primären Zellen keine eindeutigen Aussagen (siehe Anhang 9.4, Tab. 17). Demzufolge ist für weiterführende Studien neben der Messung der DSBR-Aktivitäten in Epithel- und EMT-Zellen auch die Analyse der DSBR-Aktivitäten in Fibroblasten bzw. in Lymphozyten aus dem Blut der Patientinnen notwendig, um zwischen putativ erblichen und epigenetischen Faktoren unterscheiden zu können.

4.2.4 Vergleichende Analyse zwischen den DSBR-Frequenzen und der DNA-Reparaturkapazität der primären Epithel- und EMT-Zellen nach Bleomycinschadwirkung

Während der Evaluierung der DSBR-Daten und DNA-Reparaturkapazitäten nach Bleomycinschadwirkung zu primären Zellen aus Brusttumorgewebe wurde eine Möglichkeit gesucht, die Ergebnisse beider Methoden zueinander in Bezug zu setzen. Während die Messungen der DSBR-Aktivitäten mit primären Epithel- und EMT-Zellen einen Anhaltspunkt über den präferierten DSBR-Mechanismus lieferten, wies die Auswertung der γ H2AX-Fociverteilung indirekt auf die DNA-Reparaturkapazität der Zellen hin.

Für zehn Epithelzellkulturen konnten neben den DSBR-Messungen auch γ H2AX-Analysen nach Bleomycinschadwirkung durchgeführt werden. In Tab. 11 wurden die relativen γ H2AX-Focianzahlen (relativiert auf die Kontrollpräparate 0 h ohne Bleomycinbehandlung) direkt nach Bleomycininkubation (0 h Regeneration) sowie nach einer Reinkubationszeit von 24 h in Bleomycin-freiem Medium (24 h Regeneration) dargestellt.

Die Reparaturkapazität der Zellen wurde mit der Formel $[100 - (\text{relative Focianzahl nach Regenerationszeit von 24 h} / \text{relative Focianzahl direkt nach Bleomycinschadwirkung}) \times 100]$ berechnet. Diesbezüglich konnte abgeleitet werden, ob die Zellen die nach Schadwirkung entstandenen DSBe reparieren können. Zusätzlich wurden für den direkten Vergleich zwischen DSBR-Frequenz und Reparaturkapazität nach Bleomycinschadwirkung, die DSBR-Ergebnisse der Epithelzellen in die Tabelle mit aufgenommen.

Konnte eine Senkung der relativen γ H2AX-Focianzahl nach einer Regenerationszeit von 24 h detektiert werden, ergab sich für die Reparaturkapazität ein positiver Wert. Diese Zellen waren in der Lage, durch Bleomycinbehandlung induzierte DSBe zu reparieren und waren somit Reparatur-profizient. Eine Zunahme der relativen γ H2AX-Focianzahl nach einer Regenerationsphase von 24 h deutete auf eine Akkumulation der DNA-Schäden hin und zeigte mögliche Defizite der Zellen auf, Bleomycin-induzierte Schäden zu reparieren. Für die Reparaturkapazität ergab sich daraus ein negativer Wert.

Für den Vergleich von DSBR-Frequenzen und Reparaturkapazität nach Bleomycinschadwirkung wurde folgende Hypothese erstellt. Weist eine Zellkultur hohe mutagene DSBR-Frequenzen auf (Werte liegen überhalb des Medianwertes für das jeweilige DSBR-Plasmid, siehe Tab. 10), liegt dem eine negative Reparaturkapazität nach Bleomycinschadwirkung zugrunde (Reparaturdefizienz). Wurde eine geringe mutagene DSBR-Aktivität ermittelt, war die Zelle auch in der Lage Bleomycin-induzierte DSBe korrekt

zu reparieren und wies demzufolge eine positive Reparaturkapazität nach Bleomycinschadwirkung auf (Reparaturprofizienz).

Epithelzellen	relative γ H2AX-Focianzahl nach Bleomycinschadwirkung (%)			DSBR-Frequenz (%)			
	0 h Regeneration	24 h Regeneration	Reparaturkapazität	NHEJ	SSA/HR l. H.	SSA/HR k. H.	HR
G2182/05	82,3	42,6	48,2	0,029	0,260	0,145	0,015
G777/06	131,2	216,5	-65,0	0,291	0,314	0,267	0,058
G553/07	200,0	165,0	17,5	0,268	0,094	0,142	0,0
G1065/07	526,3	652,6	-24,0	0,356	4,978	3,911	1,244
B8172/07	245,2	725,8	-196	0,134	0,287	0,153	0,0
B8565/07	236,1	331,3	-40,3	0,063			0,0
B12666/07	293	323	-10,3	0,117	0,163	0,317	0,092
B1154/98	715,7	413,7	42,2	0,0			0,0
B1905/08	80,8	188,5	-133,3	0,063		0,488	0,042
B4841/08	400,0	80,0	80,0	0,062	0,472	0,435	0,140

Tab. 11 Relative γ H2AX-Focianzahlen und Reparaturkapazität nach Bleomycinschadwirkung und DSBR-Frequenzen der primären Epithelzellen nach Transfektion mit DSBR-Plasmiden

Die γ H2AX-Focianzahlen der Epithelzellen nach Bleomycinschadwirkung wurden auf die jeweiligen Kontrollwerte ohne Bleomycininkubation (0 h ohne Bleomycin) relativiert. Die Reparaturkapazität wurde mit der Formel $[100 - (\text{relative Focianzahl nach Regenerationszeit von 24 h} / \text{relative Focianzahl nach Regenerationszeit von 0 h}) \times 100]$ berechnet. Für die Bestimmung der DSBR-Frequenzen wurden die primären Epithelzellen mit einem Mix aus DSBR-, pBS- und pCMV-I-SceI Expressionsplasmid transfiziert, 24 h kultiviert und anschließend der Anteil grün fluoreszierender Zellen am Durchflusszytometer bestimmt und mit der Transfektionseffizienz (wtEGFP) korrigiert. NHEJ (pEJ-EGFP), SSA/HR lange Homologie (pHR-EGFP/3'-EGFP), SSA/HR kurze Homologie (p Δ -EGFP/3'-EGFP) und HR kurze Homologie (p Δ -EGFP/5'-EGFP). Abkürzungen l.=kurze, h.=lange, H.=Homologie

Für die schematische Darstellung der Reparaturkapazität und der DSBR-Frequenzen wurden Punktdiagramme gewählt (Abb. 44). Die roten Punkte stellen die DSBR-Frequenzen, die blauen Punkte die Reparaturkapazität dar. Die rot gestrichelte Linie verkörpert den für jedes DSBR-Plasmid ermittelten Medianwert für Epithelzellen (Tab. 10), während die blaue Linie als Null-Markierung für die Reparaturkapazität dient. Die Auftragung der Reparaturkapazität erfolgte reziprok. Befanden sich DSBR-Frequenz und Reparaturkapazität der Zellen nach Bleomycinschadwirkung über den jeweiligen Markierungslinien, konnte einer hohen mutagenen DSBR-Frequenz eine negative Reparaturkapazität zugewiesen werden. Die Zellkulturen G777/06, G1065/07, B8172/07 und B12666/07 (Abb. 44 A), wiesen zum Beispiel hohe mutagene NHEJ-Frequenzen sowie negative Reparaturkapazitäten auf. Lagen DSBR-Frequenz und Reparaturkapazität unter den Markierungslinien, wiesen die Zellkulturen geringe mutagene DSBR-Aktivitäten auf und waren ebenfalls in der Lage Bleomycin-induzierte DSBe zu reparieren. Folglich zeigten B4841/08, G2182/05, B1154/08 (Abb. 44 A) geringe mutagene NHEJ-Frequenzen sowie positive Reparaturkapazitäten. Für die Zellkulturen G553/07, B8565/07 und B1905/08 (Abb. 44 A) konnte für die NHEJ-Frequenzen und die Reparaturkapazitäten nach Bleomycinschadwirkung die Hypothese nicht bestätigt werden. Insgesamt konnte für die Epithelzellen beim Vergleich der

Reparaturkapazität nach Bleomycinschadwirkung versus NHEJ eine Kongruenz von 70 % (7 von 10), versus SSA/HR mit langer Homologie von 71 % (5 von 7) versus SSA/HR mit kurzer Homologie von 62 % (5 von 8) und versus HR mit kurzer Homologie eine Übereinstimmung von 70 % (7 von 10) ermittelt werden (Abb. 44 A-D, Tab. 11). Bei der Kombination aller DSBR-Formen (oder auch nur NHEJ und HR) lagen für 90 % (9 von 10) der Epithelzellen Korrelationen von zumindest einem Reaktionsweg der DSBR mit der Reparaturkapazität nach Bleomycinschadwirkung vor. 50 % (G777/06, G1065/07, B8172/07, B12666/07, B1905/08) aller Epithelzellkulturen wurden übereinstimmend als Reparaturdefizient eingestuft.

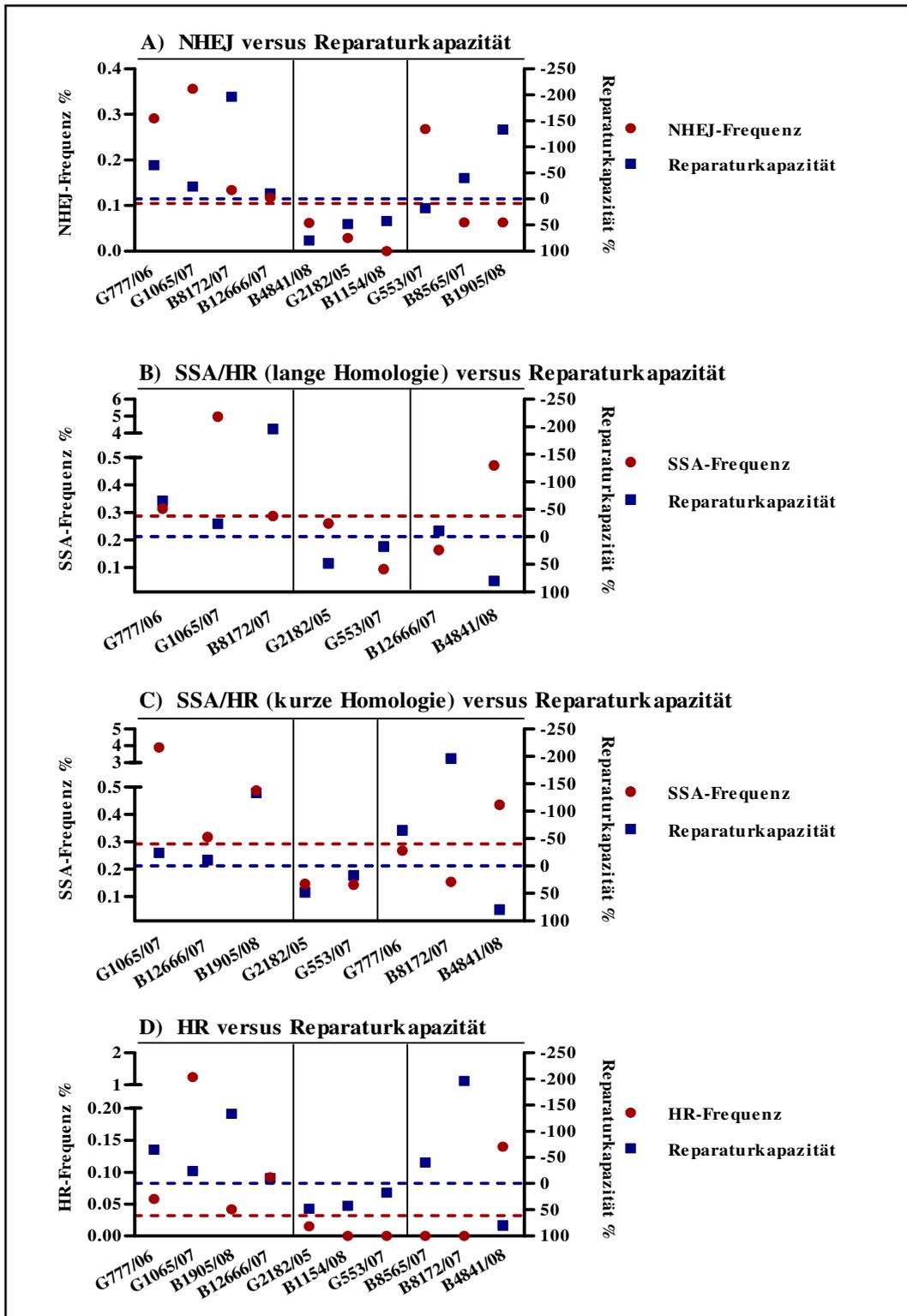


Abb. 44 Vergleich zwischen DSBR-Frequenzen und Reparaturkapazität nach Bleomycinschadwirkung für die primären Epithelzellen

Für die Bestimmung der DSBR-Ereignisse wurden die primären Epithelzellen mit einem Mix aus DSBR-, pBS- und pCMV-I-SceI Expressionsplasmid transfiziert. Die primären Epithelzellen wurden mit den DSBR-Plasmiden A) pEJ-EGFP, B) pHR-EGFP/ 3'-EGFP, C) pΔ-EGFP/3'-EGFP und D) pΔ-EGFP/5'-EGFP transfiziert, 24 h kultiviert und anschließend der Anteil grün fluoreszierender Zellen am Durchflusszytometer bestimmt. Die DSBR-Ereignisse der Epithelzellen sind als rote Punkte, die Medianwerte der DSBR-Plasmide aller Epithelzellen als gestrichelte rote Gerade eingezeichnet (Medianwerte der Epithelzellen für: pEJ-EGFP=0,105; pHR-EGFP/3'-EGFP=0,287; pΔ-EGFP/3'-EGFP=0,292; pΔ-EGFP/5'-EGFP=0,032).

Die relativen Reparaturkapazitäten der primären Epithelzellen nach Bleomycinschadwirkung wurden als blaue

Punkte dargestellt. Die blau-gestrichelte Linie deutet eine Reparaturkapazität von 0 an. Die Epithelzellen wurden auf Objektgläschen ausgesät und 24 h mit 6 mU Bleomycin bzw. ddH₂O kultiviert und anschließend bzw. nach einer Regenerationsphase von weiteren 24 h auf den Objektgläsern fixiert. Die Immunfärbung der Präparate erfolgte mit einem spezifischen Antikörper gegen phosphoryliertes H2AX und dem Sekundärintikörper Alexa-555 (rot). Für die quantitative Auswertung der Focianzahl wurde die *Software Cell^F 2.5* verwendet.

Auf der x-Achse wurde der Name des Tumormaterials angegeben. Die linke y-Achse gibt die DSBR-Frequenzen der Zellkulturen, abhängig vom verwendeten DSBR-Plasmid wieder. Die rechte y-Achse verzeichnet die Reparaturkapazität nach Bleomycinbehandlung der Zellen. Eine negative Reparaturkapazität verkörpert eine Zunahme der DNA-Schäden (Zunahme der γ H2AX-Focianzahlen nach einer Regenerationszeit von 24 h), während eine positive Reparaturkapazität auf eine Senkung der γ H2AX-Focianzahlen hindeutet.

Der Vergleich zwischen den DSBR-Aktivitäten und Reparaturkapazitäten nach Bleomycinschadwirkung war ebenfalls für sieben EMT-Zellkulturen möglich. In Tab. 12 wurden die relativen γ H2AX-Focianzahlen, die ermittelte Reparaturkapazität sowie die DSBR-Frequenzen dargestellt. Die Zellkulturen G495/06, G550/06, B8318/07 sowie B1154/08 wiesen negative Reparaturkapazitäten auf. Die graphische Anordnung der Ergebnisse von DSBR und Reparaturkapazität nach Bleomycinschadwirkung wurde für jedes DSBR-Plasmid in einem Punktdiagramm in Abb. 45 dargestellt. Dabei war es nicht möglich die Ergebnisse der EMT-Zellen aus dem Tumormaterial B8318/07 graphisch darzustellen.

EMT-Zellen	relative γ H2AX-Focianzahl			DSBR-Frequenz			
	0 h Regeneration	24 h Regeneration	Reparatur- effizienz	NHEJ	SSA/HR l. H.	SSA/HR k. H.	HR
G495/06	161,1	179,9	-11,7	0,121	0,293	0,384	0,018
G550/06	272,5	348,0	-27,7	0,614	1,139	1,040	0,0
G295/07	127,9	95,6	25,3	0,013			
G323/07	5133,3	3600,0	29,9	0,013			
B8318/07	261,5	7130,8	-2626,5	0,0		0,068	0,051
B1154/08	1100,0	450,0	59,1	0,091		0,084	0,0
B1926/08	294,1	476,5	-62	0,030			0,006

Tab. 12 Relative γ H2AX-Focianzahlen und Reparaturkapazität nach Bleomycinschadwirkung und DSBR-Frequenzen der primären EMT-Zellen nach Transfektion mit DSBR-Plasmiden

Die γ H2AX-Focianzahlen der EMT-Zellen nach Bleomycinschadwirkung wurden auf die jeweiligen Kontrollwerte ohne Bleomycininkubation (0 h ohne Bleomycin) relativiert. Die Reparaturkapazität wurde mit der Formel $[100 - (\text{relative Focianzahl nach Regenerationszeit von 24 h} / \text{relative Focianzahl nach Regenerationszeit von 0 h}) \times 100]$ berechnet. Für die Bestimmung der DSBR-Frequenzen wurden die primären Epithelzellen mit einem Mix aus DSBR-, pBS- und pCMV-I-SceI Expressionsplasmid transfiziert, 24 h kultiviert und anschließend der Anteil grün fluoreszierender Zellen am Durchflusszytometer bestimmt und mit der Transfektionseffizienz (wtEGFP) korrigiert. NHEJ (pEJ-EGFP), SSA/HR lange Homologie (pHR-EGFP/ 3'-EGFP), SSA/HR kurze Homologie (p Δ -EGFP/3'-EGFP) und HR kurze Homologie (p Δ -EGFP/5'-EGFP). Abkürzungen l.=kurze, h.=lange, H.=Homologie

Für G495/06, G550/06 und B1926/08 konnten mit dem *EGFP*-basierten DSBR-Testsystem hohe NHEJ-Frequenzen (Werte liegen über dem Median von 0,014 %, Tab. 10) und mit der γ H2AX-Focianalyse negative Reparaturkapazitäten nach Bleomycinschadwirkung detektiert werden (Tab. 12, Abb. 45 A). G295/07 und G323/07 wiesen geringe NHEJ-Frequenzen sowie positive Reparaturkapazitäten nach DNA-Schädigung auf (Tab. 12, Abb. 45 A) und bestätigten somit ebenfalls die Hypothese. Für B8318/07 und B1154/08 konnte beim Vergleich der NHEJ-Frequenzen mit der Reparaturkapazität keine Übereinstimmung ermittelt

werden (für B1154/08 siehe Abb. 45 A). Insgesamt konnte für NHEJ eine 71 %ige (5 von 7), für SSA/HR mit langer Homologie eine 50 %ige (1 von 2), für SSA/HR mit kurzer Homologie eine 50 %ige (2 von 4) und für HR mit kurzer Homologie eine 80 %ige (4 von 5) Übereinstimmung mit den Ergebnissen der γ H2AX-Focianalyse gewonnen werden (Tab. 12, Abb. 45 A-D). Diesbezüglich zeigte sich für die EMT-Zellen, wie zuvor auch bei den Epithelzellen, beim Vergleich der Reparaturkapazität nach Bleomycinschadwirkung mit den DSBR-Aktivitäten zumindest für NHEJ und HR eine große Übereinstimmung der Ergebnisse. Bei der Kombination von NHEJ und HR lagen für alle sieben EMT-Zellkulturen Korrelationen von zumindest einem Reaktionsweg der DSBR mit der Reparaturkapazität nach Bleomycinschadwirkung vor. 57 % (G495/06, G550/06, B1926/08, B8318/07) aller EMT-Zellkulturen wurden übereinstimmend als Reparatur-defizient eingestuft.

Insgesamt zeigte die vergleichende Analyse der Ergebnisse des *EGFP*-basierten DSBR-Testsystems mit der γ H2AX-Fociverteilung nach Bleomycinschadwirkung für Epithel- und EMT-Zellen eine große Übereinstimmung zwischen beiden Methoden. Damit konnten die mit dem *EGFP*-basierten DSBR-Testsystem ermittelten DSBR-Defekte in Epithel- und EMT-Zellen mit der γ H2AX-Analyse größtenteils bestätigt werden.

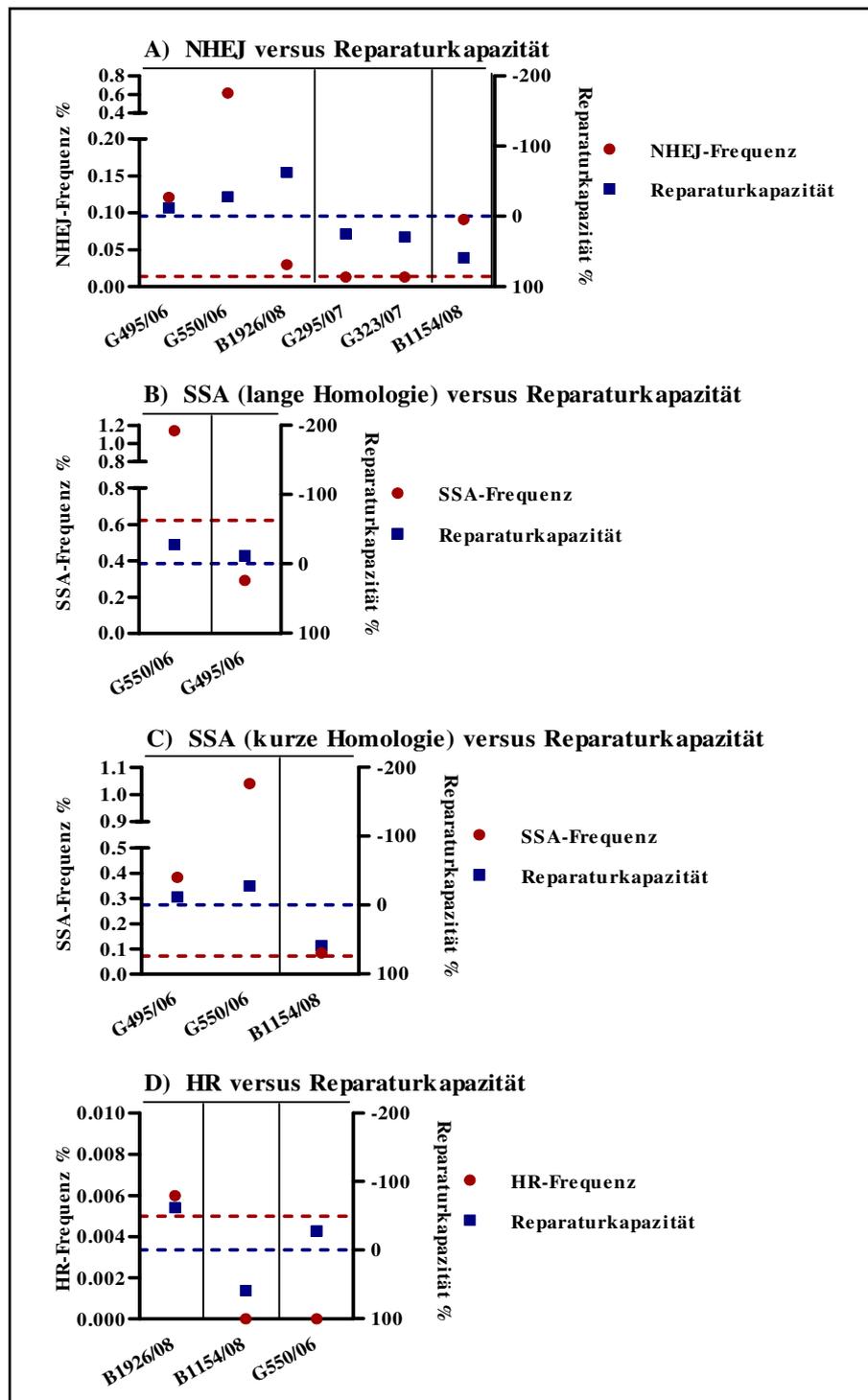


Abb. 45 Vergleich zwischen DSBR-Frequenzen und Reparaturkapazität nach Bleomycinschadwirkung für die primären EMT-Zellen

Für die Bestimmung der DSBR-Ereignisse wurden die primären EMT-Zellen mit einem Mix aus DSBR-, pBS- und pCMV-I-SceI Expressionsplasmid transfiziert. Die primären EMT-Zellen wurden mit den DSBR-Plasmiden **A)** pEJ-EGFP, **B)** pHR-EGFP/ 3'-EGFP, **C)** pΔ-EGFP/3'-EGFP und **D)** pΔ-EGFP/5'-EGFP transfiziert, 24 h kultiviert und anschließend der Anteil grün fluoreszierender Zellen am Durchflusszytometer bestimmt. Die DSBR-Ereignisse der EMT-Zellen sind als rote Punkte, die Medianwerte der DSBR-Plasmide aller EMT-Zellen als gestrichelte rote Gerade eingezeichnet (Medianwerte der EMT-Zellen für: pEJ-EGFP=0,014; pHR-EGFP/3'-EGFP=0,623; pΔ-EGFP/3'-EGFP=0,072; pΔ-EGFP/5'-EGFP=0,005).

Die relativen Reparaturkapazitäten der primären EMT-Zellen nach Bleomycinschadwirkung wurden als blaue Punkte dargestellt. Die blau-gestrichelte Linie deutet eine Reparaturkapazität von 0 an. Die EMT-Zellen wurden auf Objektgläsern ausgesät und 24 h mit 6 mU Bleomycin bzw. ddH₂O kultiviert und anschließend bzw. nach einer Regenerationsphase von weiteren 24 h auf den Objektgläsern fixiert. Die Immunfärbung der Präparate

erfolgte mit einem spezifischen Antikörper gegen phosphoryliertes H2AX und dem Sekundärantikörper Alexa-555 (rot). Für die quantitative Auswertung der Focianzahl wurde die *Software Cell^f 2.5* verwendet. Auf der x-Achse wurde der Name des Tumormaterials angegeben. Die linke y-Achse gibt die DSBR-Frequenzen der Zellkulturen, abhängig vom verwendeten DSBR-Plasmid wieder. Die rechte y-Achse verzeichnet die Reparaturkapazität nach Bleomycinbehandlung der Zellen. Eine negative Reparaturkapazität verkörpert eine Zunahme der DNA-Schäden (Zunahme der γ H2AX-Focianzahlen nach einer Regenerationszeit von 24 h), während eine positive Reparaturkapazität auf eine Senkung der γ H2AX-Focianzahlen hindeutet.

4.3 Anwendung des *EGFP*-basierten DSBR-Testsystems auf primäre Lymphozyten aus dem Blut von Brustkrebspatientinnen, Mitgliedern aus Hochrisikofamilien und Kontrollprobandinnen

Im dritten Teil dieser Arbeit wurde das *EGFP*-basierte DSBR-Testsystem auf primäre, aus Frischblut isolierte Lymphozyten von Brustkrebspatientinnen, Mitglieder aus Familien mit erhöhtem Risiko für Brust- und Eierstockkrebs und Kontrollprobandinnen ohne diagnostizierte Krebserkrankung übertragen. Dabei sollte untersucht werden, ob Unterschiede in den DSBR-Aktivitäten der einzelnen Versuchsgruppen detektiert werden können und das *EGFP*-basierte DSBR-Testsystem als Biomarker zur Brustkrebsfrüherkennung angewendet werden kann. Dafür wurde eine Vielzahl von Vorexperimenten durchgeführt, um die geeigneten Kultivierungs-, Transfektions-, und Auswerteverfahren zu ermitteln. Diesbezüglich wurden die Vorexperimente und Optimierungsverfahren vor mir ausgeführt. Bei der Durchführung der anschließenden Routinearbeiten wurde ich von Marina Wager, Heike Göggerle und Julia Kaufmann unterstützt.

4.3.1 Etablierung der primären Lymphozytenkultur, Transfektion und Messung der DSBR-Frequenzen

4.3.1.1 Auswahl der optimalen Bedingungen für die Kultivierung der primären Lymphozyten

Um die optimalen Bedingungen für die Kultivierung der primären Lymphozyten zu ermitteln, wurden unterschiedliche Isolierungsverfahren, Medien und Zellkulturschalen getestet.

Die Kultivierung von Vollblut erwies sich als nicht geeignet, da die in der Zellsuspension vorhandenen Erythrozyten die Zellzählung, die für Zellaussaat und Transfektion notwendig war, unmöglich machten und eine Isolierung der Lymphozyten kurz vor der Transfektion die Lymphozyten zu stark schädigte. Die Lyse der Erythrozyten kurz nach der Blutentnahme führte zu einem Vitalitäts- und Wachstumsverlust der Lymphozyten.

Am geeignetsten erwies sich die Isolierung der Lymphozyten am Tag der Blutabnahme durch die Verwendung des Dichtegradienten Ficoll. Um weitere, unnötige Zellverluste durch Zentrifugationsschritte, die zur Entfernung der Thrombozyten notwendig sind, zu vermeiden,

wurden die Lymphozyten zunächst mit und ohne Thrombozyten für 72 h kultiviert und beobachtet. Die Zellzählungen zeigten jedoch, dass die Thrombozyten die Vermehrung der Lymphozyten beeinträchtigten, womit diese zukünftig durch mehrfache Wasch- und Zentrifugationsschritte entfernt werden mussten.

Um die Zellausbeute nach der Isolierung weiter zu erhöhen wurden die primären Lymphozyten mit den Nährmedien RPMI (mit 15 % FBS, 2 % Glutamin, 2 % PHA, mit/ohne Interleukin2) oder *Quantum PBL* (von PAA mit 2 % PHA) ausgesät sowie unterschiedliche Zellkulturgefäße (10 cm Schale, senkrecht stehende Zellkulturflasche, 6-Well-Loch) und Zellkonzentrationen ($0,5 \times 10^6$ bis 2×10^6) ausgetestet.

Die höchste Zellausbeute an Lymphozyten wurde mit der Aussaat von 2×10^6 Zellen/mL *Quantum PBL* Medium mit 2 % PHA, auf 6-Well-Platten und einer Inkubationszeit von 72 h im Brutschrank erreicht.

4.3.1.2 Identifizierung der geeigneten Transfektionsmethode

Um die optimale Transfektionsmethode zu ermitteln wurden die primären Lymphozyten im ersten Vorversuch mit Elektroporation (200-240 V) und Nukleofektion (*Cell Line Nucleofector Kit V*) transfiziert. Die Transfektionseffizienz wurde 24 h nach Transfektion am Immunfluoreszenz-Mikroskop und Durchflusszytometer ermittelt.

Die Nukleofektionsmethode nach Amaxa erwies sich aufgrund der höheren Transfektionseffizienz und Zellvitalität am geeignetsten. Zur Ermittlung der optimalen Nukleofektionsbedingungen wurden unterschiedliche Nukleofektionslösungen (*Cell Line Nucleofector Kit V*, *Human B Cell Nucleofector Kit*, *Human T Cell Nucleofector Kit*), Programme am Amaxa *Nucleofector I* bzw. *II* (U-15, T-20, T-23, S-28), Zellzahlen ($0,5 \times 10^6$ bis 2×10^6) und DNA-Mengen (3 bis 10 μ g) eingesetzt. Weiterhin wurden die Transfektionseffizienzen von direkt nach der Blutentnahme isolierten Zellen und von Lymphozyten, die mit unterschiedlichen Nährsubstraten (PHA und/oder Interleukin2-Stimulation, *Quantum PBL*- oder RPMI-Medium) aktiviert und kultiviert wurden, ausgetestet. Ein kritischer Punkt war die Wachstumsstimulierung der transfizierten Zellen mit PHA. Sofortige PHA-Zugabe nach der Transfektion war zytotoxisch. Eine PHA-Zugabe 4 h bzw. 8 h nach der Transfektion schien gemäß der Transfektionseffizienz und Vitalität der Zellen besser geeignet. Da eine Behandlung der Zellen 8 h nach Transfektion unpraktikabel war, wurden die Zellen 4 h nach Transfektion mit PHA versetzt (2 % Endkonzentration).

Die Verwendung von speziell endotoxinfreier Plasmid-DNA brachte keine weitere Verbesserung.

Parallel zur Etablierung der Bedingungen für die primären Lymphozyten wurden verschiedene lymphoblastoide Zelllinien, nämlich HA169, TK6, 416MI, HA166, FinCo3 und GM02253F getestet, um die idealen Kontrollzelllinien zu identifizieren, die permanent mitgeführt werden sollten. Aus diesen Vorversuchen konnte das folgende, optimale Protokoll etabliert werden:

Die Lymphozyten wurden am Tag der Blutentnahme mittels Ficoll isoliert, anschließend in Waschschritten von den Thrombozyten getrennt und 72 h in *Quantum PBL* mit 2 % PHA kultiviert. Anschließend wurden 1×10^6 Zellen in 100 μ L *Human B Cell Nukleofector Kit* und 10 μ g Plasmid-DNA-Mix mit dem Programm U-15 transfiziert. Die Zellen wurden in Transfektionsmedium für primäre Lymphozyten überführt und 4 h nach Transfektion mit PHA (Endkonzentration 2 %) stimuliert. 24 h nach der Transfektion erfolgte die Messung der DSBR-Frequenz am Durchflusszytometer. Als Kontrollzelllinien wurden 416MI und TK6 mitgeführt. Als DSBR-Plasmide wurden pEJ-NHEJ (NHEJ), p Δ -EGFP/3'-EGFP (SSA/HR kurze Homologie) und pHR-EGFP/3'-EGFP (SSA/HR lange Homologie) verwendet, wobei ein Mix aus pBS, pCMV-I-SceI und dem DSBR-Plasmid (1:1:1) transfiziert wurde. Als Positivkontrolle diente die Transfektion mit pwtEGFP (anstelle von pBS), wobei Transfektionseffizienzen von 20 bis 50 % in primären Lymphozyten und Zelllinien erreicht wurden. Alle Plasmid-Mixe wurden in dreifachen Ansätzen eingesetzt. Andernfalls wurde nach der vorher festgelegten Hierarchie zuerst NHEJ dann SSA/HR mit kurzer bzw. langer Homologie gemessen.

4.3.1.3 Messung der DSBR-Frequenzen am Durchflusszytometer und Auswertung der Ergebnisse

Trotz Auswahl einer schonenden Transfektionsmethode und Stimulierung der Zellen mit PHA erst 4 h nach Transfektion konnten nur ca. 20-30 % der primären Lymphozyten für die Berechnung der DSBR einbezogen werden. Dieser Anteil an lebenden, proliferierenden Lymphozyten wurde am Durchflusszytometer im FSC-/SSC-*Dot-Plot*-Diagramm markiert und in der Analyse der DSBR berücksichtigt (siehe Abb. 11). Je Ansatz konnten 60.000 bis 100.000 proliferierende Lymphozyten gezählt und die darin befindlichen grün leuchtenden Zellen im FL-1/FL-2-*Dot-Plot*-Diagramm detektiert werden. Um mögliche, experimentell bedingte Schwankungen in den DSBR-Frequenzen eliminieren zu können, wurden parallel zu jeder Messung mit primären Lymphozyten die DSBR-Ereignisse in den Kontrollzelllinien 416MI und TK6 analysiert. Für die Bestimmung der absoluten DSBR-Ereignisse in den primären Lymphozyten wurde der Anteil grün fluoreszierender Zellen mit der jeweiligen Transfektionseffizienz korrigiert. Für die Ermittlung der relativen Werte wurden die

korrigierten Daten für jedes Plasmid zu den DSBR-Frequenzen der parallel gemessenen Kontrolllinien 416MI und TK6 ins Verhältnis gesetzt. Anhand dieser Berechnungen standen für fast alle in primären Lymphozyten analysierten DSBR-Aktivitäten die absoluten sowie die auf 416MI und TK6 relativierten Ergebnisse zur Verfügung.

4.3.2 Nachweis von DSBR-Defekten in primären Lymphozyten zur Identifizierung von erhöhtem Brustkrebsrisiko

Für die Untersuchung der DSBR-Aktivitäten konnten, wie in Tab. 13 verzeichnet, 174 Brustkrebspatientinnen, 246 Frauen ohne diagnostizierten Krebs und 35 Frauen aus Hochrisikofamilien getestet werden. Im Mittel wurde für die Patientinnen ein Alter von 60,9 Jahren, für die Kontrollen von 52,9 Jahren und für die Frauen aus Hochrisikofamilien von 40,1 Jahren errechnet. Der Altersbereich der untersuchten Probanden lag zwischen 20 und 89 Jahren. Das Spektrum der Brustkrebspatientinnen war auf ein Alter von ≥ 31 Jahren und der Frauen aus Hochrisikofamilien auf ≤ 55 Jahre verschoben.

Gruppen	Anzahl	Mittelwert Alter (in Jahren)	Altersspektrum (in Jahren)
Brustkrebspatientinnen	174	60,9 (SD±12,2)	31 - 87
Kontrollprobandinnen	246	52,9 (SD±18,4)	20 - 89
Frauen aus Hochrisikofamilien	35	40,1 (SD±8,5)	24 - 55

Tab. 13 Anzahl, mittleres Alter und Altersspektrum der untersuchten Probandinnen
SD=Standardabweichung

In Abb. 46 wurden die untersuchten Gruppen dem Alter entsprechend in Dekaden zusammengefasst und in einem Balkendiagramm gegenübergestellt. Dabei konnten für die Brustkrebspatientinnen und Mitglieder der Hochrisikofamilien eine glockenförmige Verteilung des Altersspektrums ermittelt werden.

Der Altersbereich der 40-89 jährigen wies in etwa die gleiche Anzahl an Brustkrebspatientinnen und Kontrollprobandinnen auf, wobei für den Altersbereich der 20-39jährigen die Anzahl an Kontrollprobandinnen überwog. Der Großteil rekrutierter Frauen aus Hochrisikofamilien lag im Gegensatz zu den Brustkrebspatientinnen in einem Bereich von 30-49 Jahren. Für die Überprüfung und Gegenüberstellung der DSBR war eine altersangepasste Verteilung von Brustkrebspatientinnen, Kontrollprobandinnen und Mitgliedern aus Hochrisikofamilien notwendig.

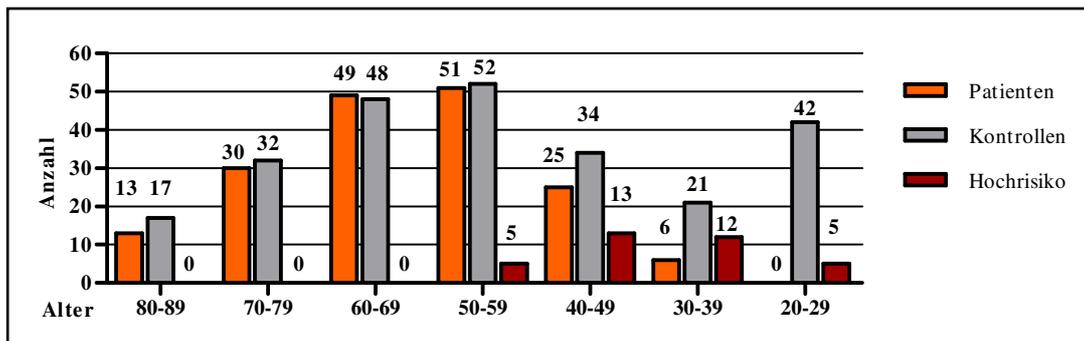


Abb. 46 Altersverteilung der Brustkrebspatientinnen, Kontrollprobandinnen und Mitglieder aus Hochrisikofamilien

Für die Ermittlung der Altersverteilung wurde das Alter der Probanden am Tag der Blutentnahme notiert und in Dekaden zusammengefasst. Die Anzahl der Probanden sind in einem Balkendiagramm dargestellt. Die Kontrollprobanden sind grau, die Brustkrebspatientinnen orange und die Frauen aus Hochrisikofamilien braun unterlegt.

4.3.2.1 Zunahme von Mikrohomologie-gerichtetem NHEJ bei Brustkrebspatientinnen und Mitgliedern aus Hochrisikofamilien

Die Gegenüberstellung aller absoluten NHEJ-Frequenzen (Abb. 47 A) wies signifikante Unterschiede zwischen Kontroll- und Brustkrebs- sowie Kontroll- und Brustkrebs-prädisponierten Probandinnen aus Hochrisikofamilien auf. Für Brustkrebspatientinnen (n=174) bzw. Brustkrebs-prädisponierte Frauen (n=35) konnten mit den Medianwerten 0,021 % bzw. 0,033 % 2,5-4-fache signifikante Erhöhungen des fehlerhaften Mikrohomologie-gerichteten NHEJ im Vergleich zu den Kontrollprobandinnen (n=246) mit 0,008 % detektiert werden. In Abb. 47 B wurde die Altersgruppe der 30-59jährigen separat betrachtet, da nur in diesem Altersspektrum alle drei untersuchten Fraktionen vertreten waren. Dabei wiesen die Brustkrebspatientinnen (n=82) und Brustkrebs-prädisponierten Frauen (n=30) mit den Medianwerten 0,020 % bzw. 0,037 % signifikante 2- bzw. 3,5-fache Steigerungen der NHEJ-Frequenzen im Vergleich zu den Kontrollprobandinnen (n=107) mit 0,010 % auf.

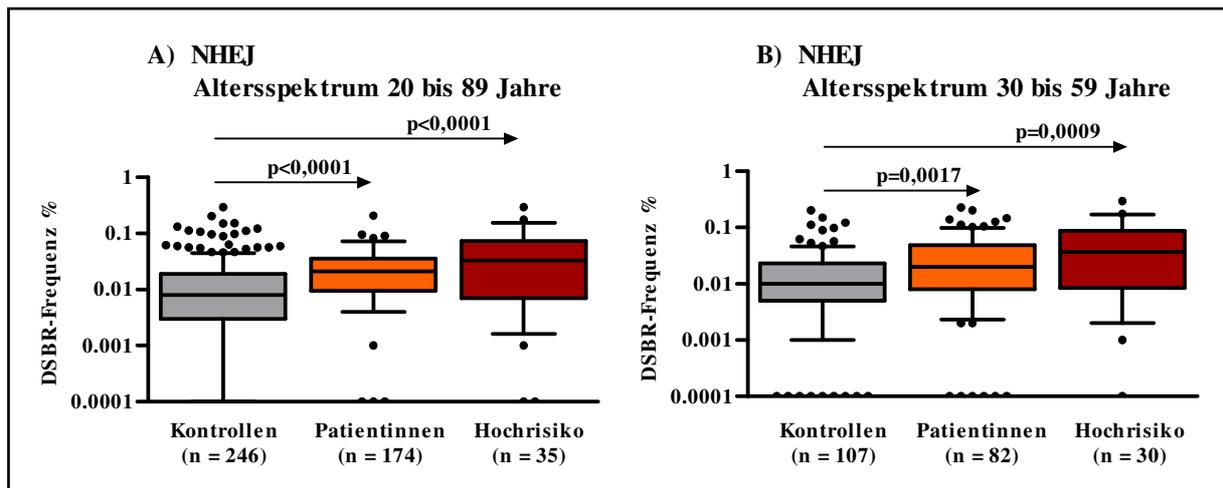


Abb. 47 Unterschiede zwischen den absoluten NHEJ-Frequenzen der primären Lymphozyten von Kontrollprobandinnen, Brustkrebspatientinnen und Mitgliedern aus Hochrisikofamilien

Die absoluten NHEJ-Frequenzen der primären Lymphozyten wurden in Box-Plot-Diagrammen logarithmisch dargestellt. Die Box verkörpert 50 % der inneren Werte. Der Median wird durch eine horizontale Gerade in der Box dargestellt. Die Whisker umfassen die äußeren Werte von der 10-90sten Percentile, Ausreißer werden als Punkte dargestellt. Die Kontrollprobandinnen (n=246/107) sind grau, die Brustkrebspatientinnen (n=174/82) orange und die Frauen aus Hochrisikofamilien (n=35/30) braun unterlegt. Die Signifikanzen wurden mit dem ungepaarten Mann-Whitney-Test ermittelt und signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) im Diagramm verzeichnet. Die primären Lymphozyten wurden isoliert, 72 h kultiviert und mit 10 μg DNA-Plasmid-Mix, bestehend aus 1/3 pBS, 1/3 pCMV-I-SceI, 1/3 pEJ-EGFP, transfiziert. Die Quantifizierung der grün fluoreszierenden Zellen erfolgte am Durchflusszytometer. **A)** absolute NHEJ-Frequenzen der Altersgruppe von 20 bis 89 Jahren, **B)** absolute NHEJ-Frequenzen der Altersgruppe von 30 -59 Jahren

4.3.2.2 Zunahme der mutagenen DSBR-Aktivitäten bei benigner Läsion, Brustkrebs und Mitgliedern aus Hochrisikofamilien

Neben den zu untersuchenden Gruppen konnten zusätzlich zehn Frauen mit benigner Läsion der weiblichen Brustdrüse rekrutiert werden, bei denen kein Anhalt auf Malignität diagnostiziert wurde. Die Diagnosen dieser Brustveränderungen wiesen Mikroverkalkung, Mastopathie, benignes Fibroadenom oder blutige Mamillensekretion auf. Die altersunabhängige Gegenüberstellung aller auf 416MI relativierten DSBR-Frequenzen (Abb. 48 A-C) zeigte für benigne Läsionen der Brustdrüse, Brustkrebspatientinnen sowie den Mitglieder aus Hochrisikofamilien signifikante Erhöhungen der mutagenen DSBR-Formen NHEJ und SSA/HR im Vergleich zu den Kontrollprobandinnen.

Für die benignen Läsionen wurden für NHEJ und SSA/HR 3-fache Erhöhungen, für Brustkrebspatientinnen und Brustkrebs-prädisponierte Frauen 2-fache Steigerungen im Vergleich zu den Kontrollprobandinnen ermittelt (Abb. 48 A-C). Infolge der geringen Anzahl an Frauen mit einer benignen Brustläsion (n=7-10) wurde eine Einteilung in eine altersabhängige Gegenüberstellung nicht erwogen.

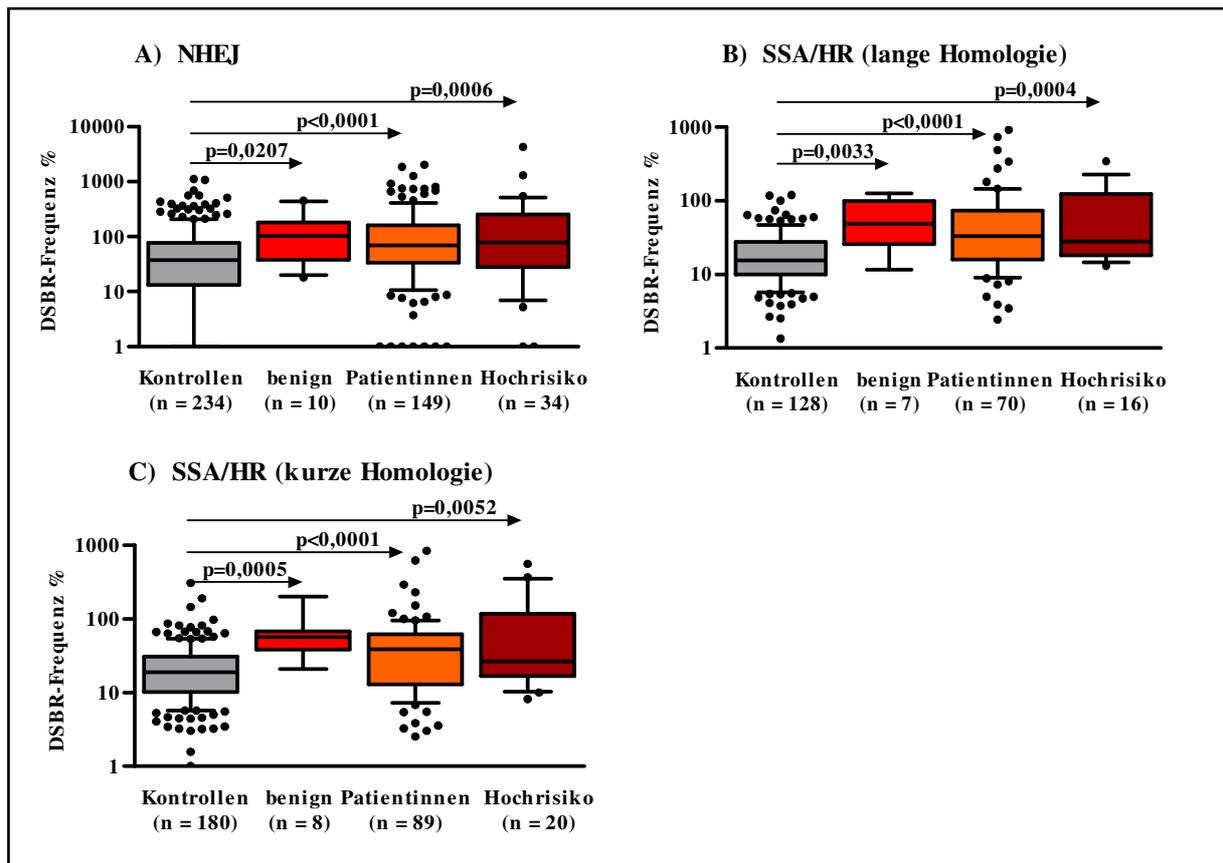


Abb. 48 Unterschiede zwischen den relativen DSBR-Frequenzen der primären Lymphozyten von Kontrollprobandinnen, Frauen mit benigner Brustläsion, Brustkrebspatientinnen und Mitgliedern aus Hochrisikofamilien

Die auf 416MI relativierten DSBR-Frequenzen der primären Lymphozyten wurden in Box-Plot-Diagrammen logarithmisch dargestellt. Die Box verkörpert 50 % der inneren Werte. Der Median wird durch eine horizontale Gerade in der Box dargestellt. Die Whisker umfassen die äußeren Werte von der 10-90sten Perzentile, Ausreißer werden als Punkte dargestellt. Die Kontrollprobandinnen sind grau, Frauen mit benignen Brustveränderungen wurden rot, die Brustkrebspatientinnen orange und die Frauen aus Hochrisikofamilien braun unterlegt. Die Signifikanzen wurden mit dem ungepaarten Mann-Whitney-Test ermittelt und signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) im Diagramm verzeichnet. Die primären Lymphozyten wurden isoliert, 72 h kultiviert und mit 10 μ g DNA-Plasmid-Mix, bestehen aus 1/3 pBS, 1/3 pCMV-I-SceI, 1/3 DSBR-Plasmid, transfiziert. Die Ermittlung der grün fluoreszierenden Zellen erfolgte am Durchflusszytometer. Je nach untersuchtem DSBR-Mechanismus wurden folgende DSBR-Plasmide verwendet. **A)** pEJ-EGFP (Absolutwerte in %: Kontrollen=0,008, benign=0,013, Patientinnen=0,021, Hochrisiko=0,033), **B)** pHR-EGFP/3'-EGFP (Absolutwerte in %: Kontrollen=0,081, benign=0,126, Patientinnen=0,118, Hochrisiko=0,165), **C)** p Δ -EGFP/3'-EGFP (Absolutwerte in %: Kontrollen=0,079, benign=0,099, Patientinnen=0,091, Hochrisiko=0,135)

4.3.2.3 Altersabhängigkeit der DSBR-Aktivitäten

In Abb. 49 wurden die Medianwerte der DSBR-Frequenzen von Kontrollprobandinnen und Brustkrebspatientinnen in Dekaden zusammengefasst und in Liniendiagrammen gegenüber gestellt. Dabei sollte überprüft werden, ob die DSBR-Aktivitäten der Kontrollprobandinnen und Brustkrebspatientinnen einem Alterseinfluss unterliegen.

Die absoluten NHEJ-Frequenzen (Abb. 49 A) der Kontrollprobandinnen zeigten altersabhängig eine konstante Senkung von 0,014 % in den 20-29jährigen auf 0,0035 % in den 60-69jährigen und verblieb bei den älteren auf niedrigem Niveau. Die NHEJ-Werte der

Brustkrebspatientinnen lagen mit 0,03 % bei den 30-39jährigen 2-fach über den Kontrollwerten und stagnierten nach Senkung auf 0,018 % in den 50-59jährigen auf einem gleich bleibend hohen Niveau. Damit zeigte sich für die fehlerhafte, Mikrohomologiegerichtete NHEJ-DSBR (Abb. 49 A) in Kontrollprobandinnen, in geringerem Maße auch in Brustkrebspatientinnen eine altersabhängige Reduktion, wobei in keinem Altersbereich eine Annäherung oder Überlappung der Medianwerte diagnostiziert wurde.

Die Gegenüberstellung der DSBR-Frequenzen von SSA/HR mit langer Homologie in Abb. 49 B zeigte für die Kontrollprobandinnen eine deutliche altersabhängige Senkung von 0,177 % der 20-29-jährigen auf 0,045 % der 70-79jährigen. Die Werte für die Brustkrebspatientinnen lagen in einem Bereich von 0,211 % bis 0,043 %, also weniger deutlich über den SSA/HR-Frequenzen der Kontrollprobandinnen, wobei die größten Unterschiede in dem für die Brustkrebsfrüherkennung wichtigen Zeitraum vom 40-49igsten Jahrgang lag.

Die Darstellung der SSA/HR-Frequenzen mit kurzer Homologie (Abb. 49 C) zeigte für die Kontrollprobandinnen eine konstante, gleich bleibende DSBR-Frequenz von ca. 0,08 %. In den jüngeren Brustkrebspatientinnen (30-39jährige) konnten hohe Reparaturfrequenzen von 0,175 % nachgewiesen werden, die sich jedoch in der Altersgruppe ≥ 50 Jahre an das Niveau der Kontrollprobandinnen angleichen. Für die 30-49jährigen konnten jedoch auch für SSA/HR mit kurzer Homologie (Abb. 49 C) starke, bis zu 2,5-fache Unterschiede zwischen Brustkrebspatientinnen und Kontrollprobandinnen diagnostiziert werden.

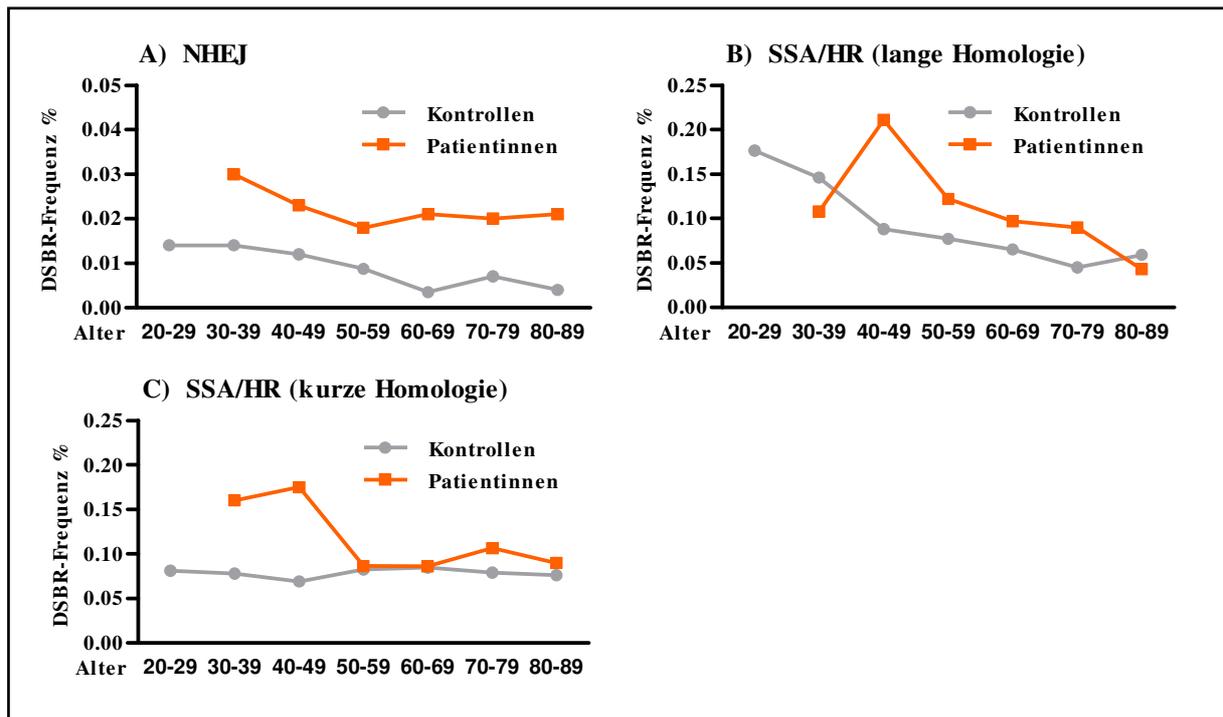


Abb. 49 Altersabhängigkeit der absoluten DSBR-Frequenzen in primären Lymphozyten von Kontrollprobandinnen und Brustkrebspatientinnen

Die absoluten Medianwerte zu einzelnen Altersdekaden der Kontrollprobandinnen (grau) und Brustkrebspatientinnen (orange) wurden in Liniendiagrammen zusammengefasst und gegenübergestellt. Die Auftragung der Ergebnisse erfolgte linear. Die primären Lymphozyten wurden isoliert, 72 h kultiviert und mit 10 µg DNA-Plasmid-Mix, bestehen aus 1/3 pBS, 1/3 pCMV-I-SceI, 1/3 DSBR-Plasmid transfiziert. Die Quantifizierung der grün fluoreszierenden Zellen erfolgte am Durchflusszytometer. Je nach untersuchtem DSBR-Mechanismus wurden folgende DSBR-Plasmide verwendet A) pEJ-EGFP, B) pHR-EGFP/3'-EGFP, C) pΔ-EGFP/3'-EGFP.

Aufgrund dieser Beobachtungen könnte die Bestimmung der NHEJ-Frequenzen in primären Lymphozyten altersunabhängig für die Unterscheidung zwischen Kontroll- und Brustkrebsprobandinnen verwendet werden. Die SSA/HR-Daten könnten unterstützend für die Ermittlung der Brustkrebswahrscheinlichkeit bei jungen Probandinnen herangezogen werden.

4.3.2.4 Einfluss der Menopause auf die DSBR-Aktivitäten

Ein mit dem Alter einhergehender Prozess ist der Eintritt der Frau in die Menopause. Im Durchschnitt tritt bei Frauen die Menopause im 50. bis 51. Lebensjahr durch Reduktion der endokrinen Funktion der Eierstöcke auf und führt zur Änderung im Hormonhaushalt, verbunden mit einer Senkung des Östrogenspiegels (Bernstein, 2002). Da die Abbauprodukte von Östrogen mutagene Eigenschaften besitzen und durch Anlagerung an die DNA unter anderem auch DSBe hervorrufen können (Liehr, 1990; Liehr *et al.*, 1986), wurde im folgenden der Einfluss der Menopause auf die DSBR-Aktivitäten von Kontrollprobandinnen

und Brustkrebspatientinnen untersucht. Hierfür wurden die Frauen im Vorfeld zu ihrem menopausalen Stadium befragt.

In Abb. 50 A wurden die absoluten NHEJ-Frequenzen von Kontrollprobandinnen und Brustkrebspatientinnen in Abhängigkeit ihres menopausalen Stadiums gegenübergestellt. Während in der Gruppe der Kontrollprobandinnen eine signifikante Senkung des Mikrohomologie-gerichteten NHEJ von 0,010 % auf 0,005 % in postmenopausalen Frauen detektiert werden konnte, wurde für die Brustkrebspatientinnen keine entsprechende Änderung der fehlerhaften DSBR festgestellt. Mit 0,023 % bzw. 0,020 % lag die NHEJ-Frequenz der Brustkrebspatientinnen, sowohl für prä-/perimenopausale wie für postmenopausale Frauen deutlich über dem Niveau der Kontrollprobandinnen.

In Abb. 50 B zeigten die DSBR-Ergebnisse für Kontrollprobandinnen wie auch für Brustkrebspatientinnen signifikante Senkungen der SSA/HR-Frequenzen für postmenopausale Frauen im Vergleich zu prä- und perimenopausalen Frauen. Für die Kontrollprobandinnen konnte nach Eintritt in die Menopause eine Senkung von 0,107 % auf 0,065 % für Brustkrebspatientinnen eine Reduktion von 0,180 % auf 0,108 % detektiert werden.

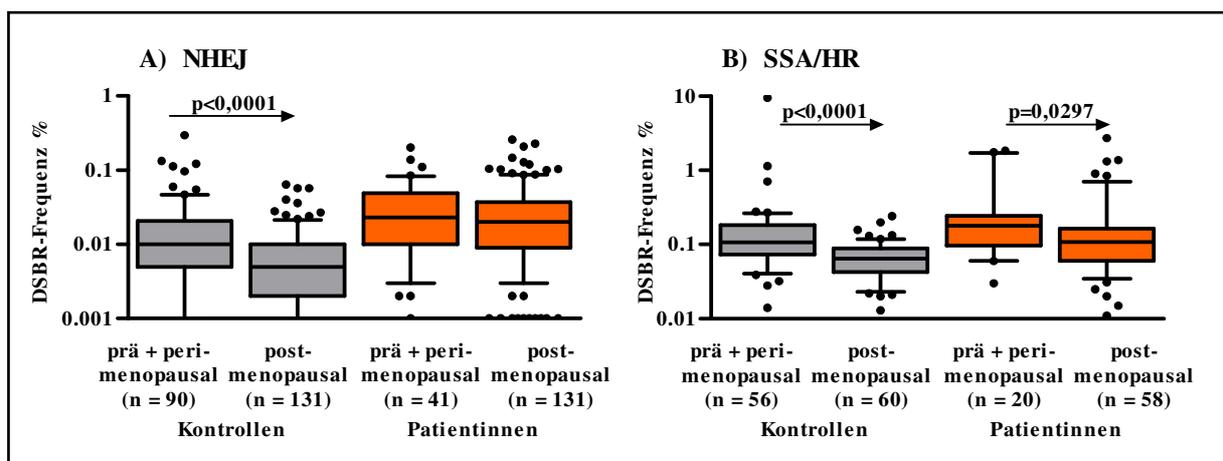


Abb. 50 Einfluss der Menopause auf die DSBR-Frequenzen der primären Lymphozyten von Brustkrebspatientinnen und Kontrollprobandinnen

Die absoluten DSBR-Frequenzen der primären Lymphozyten wurden in *Box-Plot*-Diagrammen logarithmisch dargestellt. Die Box verkörpert 50 % der inneren Werte. Der Median wird durch eine horizontale Gerade in der Box dargestellt. Die *Whisker* umfassen die äußeren Werte von der 10-90sten Percentile, Ausreißer werden als Punkte dargestellt. Die Kontrollprobanden sind grau, die Brustkrebspatientinnen orange unterlegt. Die primären Lymphozyten wurden isoliert, 72 h kultiviert und mit 10 µg DNA-Plasmid-Mix, bestehen aus 1/3 pBS, 1/3 pCMV-I-SceI, 1/3 DSBR-Plasmid, transfiziert. Die Quantifizierung der grün fluoreszierenden Zellen erfolgte am Durchflusszytometer. Die DSBR-Frequenzen in den primären Lymphozyten wurden in Abhängigkeit der prä-/perimenopausalen sowie postmenopausalen Phase der Probandinnen zusammengefasst. Die Signifikanzen wurden mit dem ungepaarten Mann-Whitney-Test ermittelt und signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) im Diagramm verzeichnet. Je nach untersuchtem DSBR-Mechanismus wurden folgende DSBR-Plasmide verwendet. **A)** pEJ-EGFP, **B)** pHR-EGFP/3'-EGFP.

4.3.2.5 Einfluss von Kinderlosigkeit auf die DSBR-Aktivitäten

Im Verlauf dieser Studie wurden für fast alle Kontrollprobandinnen Informationen zur Anzahl eigener Kinder eingeholt. Die in Abb. 51 dargestellten absoluten NHEJ-Frequenzen wiesen auf einen deutlichen Zusammenhang zwischen Kinderlosigkeit und hohem Niveau an mutagener DSBR hin. Frauen mit mindestens einem eigenen Kind wiesen eine NHEJ-Frequenz von 0,005 % auf. Frauen ohne eigene Kinder zeigten mit 0,011 % eine signifikante, 2-fache Erhöhung der Mikrohomologie-gerichteten NHEJ-Frequenzen auf.

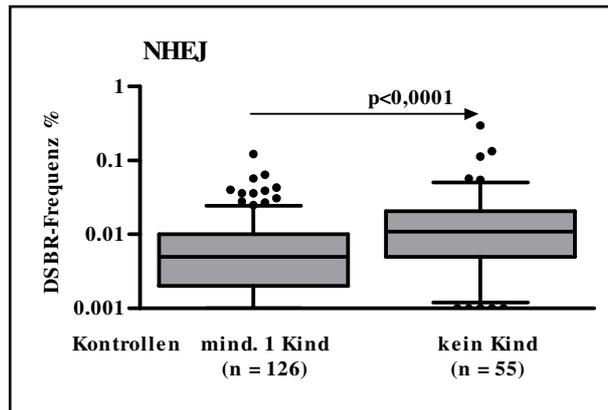


Abb. 51 Einfluss von Kinderlosigkeit auf die NHEJ-Aktivitäten der primären Lymphozyten der Kontrollprobandinnen

Die absoluten NHEJ-Frequenzen der primären Lymphozyten wurden im Box-Plot-Diagramm logarithmisch dargestellt. Die Box verkörpert 50 % der inneren Werte. Der Median wird durch eine horizontale Gerade in der Box dargestellt. Die Whisker umfassen die äußeren Werte von der 10-90sten Perzentile, Ausreißer werden als Punkte dargestellt. Die primären Lymphozyten wurden isoliert, 72 h kultiviert und mit 10 μ g DNA-Plasmid-Mix, bestehend aus 1/3 pBS, 1/3 pCMV-I-SceI, 1/3 pEJ-EGFP, transfiziert. Die Quantifizierung der grün fluoreszierenden Zellen erfolgte am Durchflusszytometer. Die absoluten NHEJ-Frequenzen in den Kontrollprobandinnen wurden in Abhängigkeit von Kinderlosigkeit versus eigene Kinder zusammengefasst. Die Signifikanzen wurden mit dem ungepaarten Mann-Whitney-Test ermittelt und signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) im Diagramm verzeichnet.

4.3.2.6 Einfluss von ionisierender Strahlenexposition auf die NHEJ-Aktivität von Kontrollprobandinnen und Brustkrebspatientinnen

In Abb. 52 wurde der Einfluss ionisierender Strahlung auf die mutagene NHEJ-DSBR untersucht. Bei dem Aufklärungsgespräch wurden die Kontrollprobandinnen am Tag der Blutentnahme explizit nach Röntgenmaßnahmen innerhalb der vorgelagerten drei Monate befragt. Die Informationen über Röntgenaufnahmen bei Brustkrebspatientinnen konnten aus einer medizinischen Datenbank entnommen werden. Während die Kontrollprobandinnen eine signifikante Erhöhung der NHEJ-Frequenzen von 0,005 % auf 0,008 % nach Strahlenexposition aufzeigten, konnte für die Brustkrebspatientinnen kein Einfluss auf das NHEJ nachgewiesen werden. Unabhängig von der Strahlenexposition beliefen sich die NHEJ-Frequenzen in den Brustkrebspatientinnen mit 0,025 % ohne vorherige Bestrahlung bzw. 0,02 % mit vorheriger Bestrahlung auf einem hohen Niveau. Dieses Ergebnis verdeutlicht

auch, dass das *EGFP*-basierte DSB-R-Testsystem möglicherweise eine höhere Aussagekraft besitzt, wenn die Probandinnen im Vorfeld nicht bestrahlt wurden. Mit 0,025 % wiesen die Brustkrebspatientinnen ohne Bestrahlung eine 5-fache Erhöhung an NHEJ im Vergleich zu den unbestrahlten Kontrollprobandinnen mit 0,005 % auf. Demgegenüber wurde beim Vergleich aller Kontrollprobandinnen und Brustkrebspatientinnen lediglich ein 2- bis 2,5-facher Unterschied detektiert (siehe Abschnitt 4.3.2.1). Demzufolge könnte in einem zukünftigen Test die Analyse von Probandinnen ohne vorherige Behandlung mit ionisierender Strahlung zu einer maximalen Diskriminierung zwischen Kontrollprobandinnen und Brustkrebspatientinnen führen.

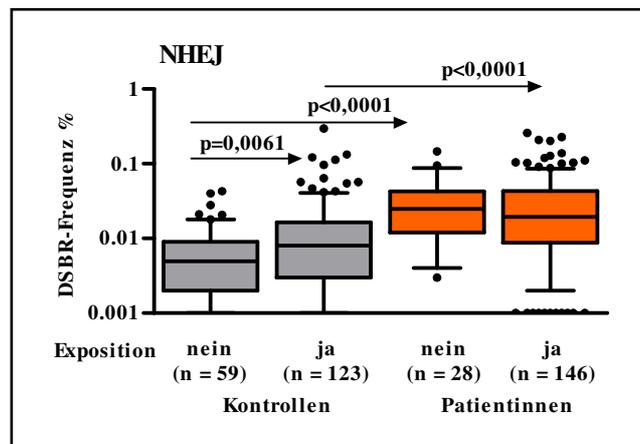


Abb. 52 Einfluss ionisierender Strahlenexposition auf die NHEJ-Aktivitäten der primären Lymphozyten von Brustkrebspatientinnen und Kontrollprobandinnen

Die absoluten NHEJ-Frequenzen der primären Lymphozyten wurden im Box-Plot-Diagramm logarithmisch dargestellt. Die Box verkörpert 50 % der inneren Werte. Der Median wird durch eine horizontale Gerade in der Box dargestellt. Die *Whisker* umfassen die äußeren Werte von der 10-90sten Perzentile, Ausreißer werden als Punkte dargestellt. Die Kontrollprobandinnen sind grau, die Brustkrebspatientinnen orange unterlegt. Die primären Lymphozyten wurden isoliert, 72 h kultiviert und mit 10 µg DNA-Plasmid-Mix, bestehend aus 1/3 pBS, 1/3 pCMV-I-SceI, 1/3 pEJ-EGFP transfiziert. Die Quantifizierung der grün fluoreszierenden Zellen erfolgte am Durchflusszytometer. Die absoluten NHEJ-Frequenzen wurden in Abhängigkeit von der Strahlenexposition zusammengefasst. Als Einteilungskriterium diente ein Expositionszeitraum von drei Monaten vor dem Datum der Blutentnahme. Die Signifikanzen wurden mit dem ungepaarten Mann-Whitney-Test ermittelt und signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) im Diagramm verzeichnet.

4.3.2.7 Einfluss des Differenzierungsgrades der Brusttumorzellen auf die DSB-R in primären Lymphozyten

Genauere Informationen über den Differenzierungsgrad der Zellen im Brusttumor ermöglichte die Überprüfung inwiefern der Differenzierungsgrad der Zellen im Brusttumor mit der DSB-R-Frequenz in den primären Lymphozyten aus dem Blut der Brustkrebspatientinnen korreliert. Bei dem Differenzierungsgrad wurde zwischen gut differenziertem, bösartigem Gewebe in hoher Übereinstimmung mit dem Ursprungsgewebe (G1), mäßig differenziertem (G2) und schlecht differenziertem bösartigem Gewebe (G3) unterschieden. Als Einteilungskriterien wurden Form und Größe der Zellkerne und Zellen, die Teilungsaktivität

und Ähnlichkeit mit dem Ursprungsgewebe herangezogen, wobei gut differenzierte Tumore (G1) eine vergleichsweise gute Prognose bedeuten (Yehiely *et al.*, 2006).

Wie in Abb. 53 gezeigt, wurden die absoluten NHEJ-Frequenzen der Brustkrebspatientinnen den drei unterschiedlichen Differenzierungsgraden zugeordnet und in einem Box-Plot-Diagramm gegenübergestellt. Interessanterweise konnten signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen mit mäßig (G2) und schlecht differenziertem bösartigem Gewebe (G3) detektiert werden. Abhängig vom Differenzierungsgrad der Brusttumorzellen stieg NHEJ in den primären Lymphozyten von 0,018 % (G2) auf 0,03 % (G3) an, womit ein möglicher Zusammenhang zwischen dem Differenzierungsgrad des primären Tumorgewebes und der DSBR-Aktivitäten in primären Lymphozyten bestehen könnte. Dies ist vor allem interessant, da Frauen mit *BRCA1*-Defekt und NHEJ-Fehlregulation häufig Tumore mit schlecht differenzierten Zellen aufweisen (Turner and Reis-Filho, 2006).

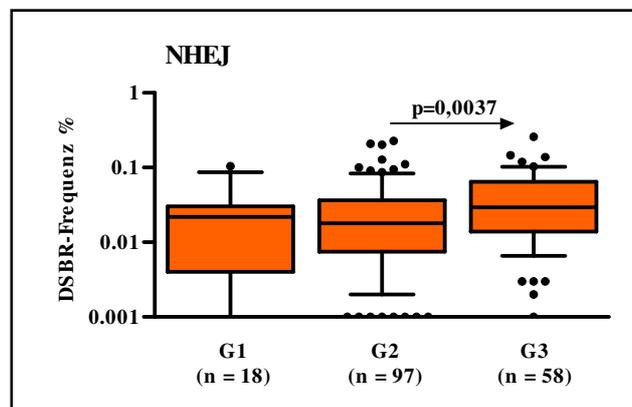


Abb. 53 Einfluss des Differenzierungsgrades der Zellen im Brusttumor auf die NHEJ-Aktivitäten der primären Lymphozyten aus denselben Patientinnen

Die absoluten NHEJ-Frequenzen der primären Lymphozyten wurden im Box-Plot-Diagramm logarithmisch dargestellt. Die Box verkörpert 50 % der inneren Werte. Der Median wird durch eine horizontale Gerade in der Box dargestellt. Die *Whisker* umfassen die äußeren Werte von der 10-90sten Perzentile, Ausreißer werden als Punkte dargestellt. Die primären Lymphozyten wurden isoliert, 72 h kultiviert und mit 10 µg DNA-Plasmid-Mix, bestehend aus 1/3 pBS, 1/3 pCMV-I-SceI, 1/3 pEJ-EGFP, transfiziert. Die Quantifizierung der grün fluoreszierenden Zellen erfolgte am Durchflusszytometer. Die absoluten NHEJ-Frequenzen der primären Lymphozyten wurden in Abhängigkeit vom Differenzierungsgrad der Brusttumorzellen gegenübergestellt. Als Einteilungskriterium diente der Differenzierungsgrad G1 (gut), G2 (mäßig), G3 (schlecht differenziertes bösartiges Gewebe). Die Signifikanzen wurden mit dem ungepaarten Mann-Whitney-Test ermittelt und signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) im Diagramm verzeichnet.

4.3.2.8 Einfluss des Rezeptorstatus im Tumor auf die DSBR-Aktivität der primären Lymphozyten

Infolge intensiver Studien konnten für Brusttumore unterschiedliche Expressionsprofile klassifiziert werden (Brenton *et al.*, 2005; Nielsen *et al.*, 2004; Perou *et al.*, 2000). Das *Basal-like*-Brustkarzinom ist durch einen Mangel an Östrogen-, Progesteron- sowie HER2neu-Rezeptoren charakterisiert. Des Weiteren wurden *TP53*-Mutationen sowie hohe Expressionsniveaus an Proliferation-stimulierenden Genen nachgewiesen (Sorlie *et al.*, 2001).

Der morphologische Befund sowie die immunhistochemischen Färbungen der *Basal-like*-Brustkarzinome weisen, wie in Tab. 14 verdeutlicht große Ähnlichkeiten zu Brusttumoren von *BRCA1*-Mutationsträgern auf (Turner and Reis-Filho, 2006). Weiterhin weisen diese Tumore meist schlecht differenziertes Gewebe (G3) auf (siehe Abschnitt 4.3.2.7).

Tumor-Eigenschaften	Sporadisches <i>Basal-like</i> -Mammakarzinom	Hereditäres <i>BRCA1</i> -Mammakarzinom
ER/PR-Status	negativ	negativ
HER2neu-Status	negativ	negativ
p53-Status	mutiert	mutiert
BRCA1-Status	verminderte Expression	Inaktivierung durch Mutation
X-Chromosomen-Abnormalitäten	X-Chromosom-Inaktivierung	X-Chromosom-Inaktivierung
Genexpressionsmuster	Basal-Epithelzell-artig	Basal-Epithelzell-artig
Tumorhistologie	schlecht differenziert	schlecht differenziert
Prognose	schlecht	schlecht
Chemotherapie-Sensitivität	unbekannt	hochsensitiv gegenüber DNA schädigenden Agentien

Tab. 14 Vergleich zwischen sporadischen *Basal-like*-Brusttumoren und Tumoren von *BRCA1*-Mutationsträgerinnen auf der Grundlage der Literatur (Turner and Reis-Filho, 2006)

Die in Abb. 54 gegenübergestellten absoluten DSBR-Frequenzen in den primären Lymphozyten für SSA/HR mit langer Homologie zeigten trotz der geringen Anzahl an Östrogen-/Progesteron-/HER2neu-Rezeptor negativen Tumore (n=4) signifikante, 4-fach höhere Frequenzen für diese so klassifizierte *Basal-like*-Brusttumore auf. Dabei konnten für die Östrogen-/Progesteron-/HER2neu-Rezeptor negativen Tumore 0,464 %, für die Östrogen-/Progesteron-/HER2neu-Rezeptor positiven Tumore 0,113 % SSA/HR-Frequenzen detektiert werden. Infolge der morphologischen/immunhistochemischen Vergleichbarkeit von *Basal-like* und der aus *BRCA1*-Mutation resultierenden Tumore könnten auch Rückschlüsse auf die DSBR-Frequenzen geschlossen werden, da *BRCA1*-Mutationen zu erhöhter SSA-Reparatur führten.

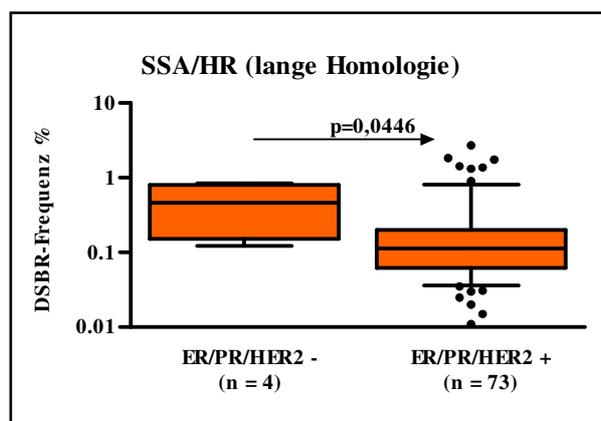


Abb. 54 Einfluss der Hormonrezeptorexpression für Östrogen, Progesteron und Her2neu in den Brusttumoren auf die DSBR-Frequenzen in den primären Lymphozyten

Die absoluten DSBR-Frequenzen der primären Lymphozyten wurden im Boxp-Plot-Diagramm logarithmisch dargestellt. Die Box verkörpert 50 % der inneren Werte. Der Median wird durch eine horizontale Gerade in der Box dargestellt. Die Whisker umfassen die äußeren Werte von der 10-90sten Percentile, Ausreißer werden als

Punkte dargestellt. Die primären Lymphozyten wurden isoliert, 72 h kultiviert und mit 10 µg DNA-Plasmid-Mix, bestehend aus 1/3 pBS, 1/3 pCMV-I-SceI, 1/3 pHR-EGFP/3'-EGFP transfiziert. Die Quantifizierung der grün fluoreszierenden Zellen erfolgte am Durchflusszytometer. Als Einteilungskriterium diente der Hormonrezeptorstatus in den Brusttumoren für Östrogen (ER)-, Progesteron (PR)- und Her2neu (HER2)-Rezeptor. Die Signifikanzen wurden mit dem ungepaarten Mann-Whitney-Test ermittelt und signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) im Diagramm verzeichnet.

5 DISKUSSION

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen eine Perspektive auf, Brustkrebsrisikoerkennung mit einem funktionellen, auf DSBR-basierendem Testsystem durchzuführen. Die Etablierung spezifischer DSBR-Defektmuster von einem Großteil der bisher bekannten Brustkrebsprädisponierenden Gene nämlich *BRCA1*, *BRCA2*, *ATM*, *CHK2*, *TP53*, *NBN* sowie *RAD50* geben einerseits einen genaueren Einblick in die Funktionsweise, Hierarchie und das Wechselspiel innerhalb der DSBR-Mechanismen (Abb. 55) und ermöglichen andererseits die Übertragung dieser Muster auf verschiedene Zellsysteme.

Folglich wären Aussagen über ein mögliches Brustkrebsrisiko nicht weiter an aufwendige, derzeit noch sehr teure Gen-*Screening*-Verfahren geknüpft, sondern könnten zukünftig über einen funktionellen DSBR-Test, unabhängig von der Kenntnis über die genaue Mutation, ermittelt werden.

Eine Vielzahl von Studien belegen, dass Defekte in der DSBR zu Chromosomeninstabilität und Brustkrebsentstehung führen. Erste Hinweise lieferten die hereditär auftretenden Brustkrebs-suszeptibilitäts-Syndrome, die nach Mutationen in Genen wie *BRCA1*, *BRCA2*, *TP53* oder *ATM* auftreten und mit Defekten oder Unterdrückung der DSBR einhergehen (Gatz and Wiesmüller, 2006; Stark *et al.*, 2004; Thompson and Schild, 2002). Im ersten Teil dieser Arbeit wurden daher Zelllinien mit bekannten Brustkrebs-assoziierten Mutationen auf mögliche DSBR-Defektmuster untersucht.

5.1 Der *BRCA1*-DSBR-Defekttyp

Für die Detektion des *BRCA1*-DSBR-Defekttyps wurden in dieser Arbeit die lymphoblastoiden Zelllinien HA166 (C61G/wt) und HCC1937BL (5382insC/wt) mit jeweils heterozygoten *BRCA1*-Mutationen verwendet. Im Vergleich zu den Kontrollzelllinien wurden für diese *BRCA1*-Defektlinien drastisch erhöhte Frequenzen an Mikrohomologie-gerichtetem NHEJ sowie Erhöhungen der SSA-Frequenzen detektiert, wobei die Effekte für SSA im Vergleich zum NHEJ geringer ausfielen. Für die HR hingegen konnten keine signifikanten Einflüsse detektiert werden. Diese Resultate weisen damit auf eine hierarchische Regulation der DSBR in *BRCA1*-positiven Zellen hin, wobei Mikrohomologie-gerichtetes NHEJ am stärksten und SSA schwächer inhibiert wird (Keimling *et al.*, 2008).

In diesem Zusammenhang konnte auch von anderen Arbeitsgruppen gezeigt werden, dass *Brcal* die Homologie-gerichtete DSBR möglicherweise durch die Interaktion mit *Brca2*, einem Bindungspartner von *Rad51*, unterstützt (Chen *et al.*, 1998; Chen *et al.*, 1999; Gudmundsdottir and Ashworth, 2006). Des Weiteren kann *Brcal* als Bestandteil der *Fanconi*

anemia-Protein-Ubiquitinierungskaskade die Proteininteraktionen und/oder die Zugänglichkeit von Reparaturfaktoren an DNA-Schäden regulieren (Huang and D'Andrea, 2006). *Brcal* ist ebenfalls für die Rekrutierung von CtIP an DSBe verantwortlich, ein Protein, dass mit dem MRN-Komplex interagiert, die Prozessierung der DNA-Enden unterstützt, sowie RPA rekrutiert und aktiviert. Damit ist die *Brcal*-abhängige CtIP-Rekrutierung vor allem für HR und SSA essentiell (Huertas and Jackson, 2009; Sartori *et al.*, 2007; Yun and Hiom, 2009).

Weiterhin konnte detektiert werden, dass *Brcal* das NHEJ beeinflusst. *Brcal* fördert einerseits das fehlerfreie NHEJ, unterdrückt aber andererseits das fehlerhafte, mutagene, Mikrohomologie-gerichtete NHEJ sowie SSA möglicherweise durch die Inhibierung der MRN-vermittelten Prozessierung der DNA-Enden (Durant and Nickoloff, 2005; Gudmundsdottir and Ashworth, 2006). Dabei bindet *Brcal* an die DNA und unterdrückt die nukleolytische Funktion des MRN-Komplexes (Paull *et al.*, 2001). Möglicherweise unterstützt Chk2 durch Phosphorylierung von *Brcal* an Ser988 die *Brcal*-vermittelte Genauigkeitskontrolle durch Förderung der fehlerfreien HR und Unterdrückung des mutagenen Mikrohomologie-gerichteten NHEJ (Zhang *et al.*, 2004; Zhuang *et al.*, 2006).

Die im Western-Blot nur sehr schwach detektierbaren *Brcal*-Proteine der Zelllinien HA166 und HCC1937BL weisen möglicherweise darauf hin, dass die Mutation in einem Allel ausreicht, um das Expressionsniveau oder die Stabilität von *Brcal* in den Zellen drastisch zu senken. *Brcal* wird zwar Zellzyklus-abhängig exprimiert, aber da die Zelllinien sehr ähnliche Zellzyklusverteilungen wie die Kontrollen aufwiesen, konnte dies nicht erklären, weshalb die Mutation in einem Allel des *BRCA1*-Genes zu einer fast vollständigen Inhibierung der *Brcal*-Proteinexpression führte. Baldeyron *et al.* 2002 hatten jedoch ebenfalls beobachtet, dass unterschiedliche heterozygote *BRCA1*-Mutationen zu einer mehr als 50 %igen Abnahme der *Brcal*-Proteinniveaus führten. Somit ist ein wt*BRCA1*-Allel nicht in der Lage die komplette Funktion in der DSBR zu übernehmen (Baldeyron *et al.*, 2002).

Die Zelllinie HA166 weist eine heterozygote Mutation in der Ringdomäne von *BRCA1* auf, womit die *Brcal*-Bard1-Interaktion unterbrochen wird (Rosen *et al.*, 2003). Durch diese Interaktion wird das nukleäre Exportsignal von *Brcal* maskiert und die nukleäre Lokalisation von *Brcal* aufrechterhalten. Weiterhin erhöht die *Brcal*-Bard1-Interaktion auch die DNA-Bindeaktivität von *Brcal* (Simons *et al.*, 2006). Folglich würde die Mutation in der *BRCA1*-Ringdomäne die DNA-Bindeaktivität inhibieren.

In HCC1937BL führt die Insertion eines Nukleotides an 5382 zu fehlerhafter Translation ab Codon 1755 und zum Stopp ab Codon 1829, während wtBrca1 aus 1863 Aminosäuren aufgebaut ist (Tomlinson *et al.*, 1998).

Während HA166 eine N-terminale Mutation aufweist, exprimiert HCC1937BL ein C-terminal trankiertes Brca1-Protein, dem die TAD (Transkriptionale Aktivierungsdomäne) und BRCT-Domäne fehlt. C-terminal trankiertes Brca1-Protein weist ebenso eine verminderte Bindefähigkeit an DNA-Enden auf, wie *BRCA1*-Genprodukte mit N-terminaler *BRCA1*-Mutation (Simons *et al.*, 2006). Damit führen die Mutationen in beiden Zelllinien zu einer deutlichen Reduktion der DNA-Bindeaktivität von Brca1. Die damit verbundene, reduzierte Brca1-abhängige Unterdrückung der nukleolytischen Funktion des MRN-Komplexes (Durant and Nickoloff, 2005; Gudmundsdottir and Ashworth, 2006) könnte die drastische Erhöhung der fehlerhaften, MRN-abhängigen DSB-R-Aktivitäten erklären.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Brca1-CtIP-Interaktion die Verschiebung von vorwiegend fehlerhafter zu akkurater Reparatur (HR) fördert (Yun and Hiom, 2009). CtIP interagiert nach Phosphorylierung an Ser 327 mit Brca1 über die BRCT-Domäne von Brca1. Klinisch relevante Mutationen in der BRCT-Domäne von Brca1 heben diese Interaktion auf (Chen *et al.*, 2008). Diesbezüglich konnte auch gezeigt werden, dass das C-terminal trankierte Brca1-Protein in HCC1937BL nicht mit CtIP interagieren kann (Yu *et al.*, 2006). Somit könnte zumindest für HCC1937BL die Erhöhung der fehlerhaften DSB-R auf die gestörte Brca1-CtIP-Interaktion zurückgeführt werden.

Des Weiteren könnten die N- und C-terminal trankierten Brca1-Proteine in HA166 und HCC1937BL infolge eines dominant negativen Effektes die Funktion des noch vorhandenen wtBrca1-Proteins inhibieren. Diesbezüglich würde das mutierte Brca1-Protein über intakte Bereiche mit anderen DSB-R-Faktoren interagieren. Diese sequestrierten DSB-R-Faktoren stünden dann nicht mehr für das vom zweiten Allel produzierte wtBrca1 zu Verfügung. So könnte das C-Terminal trankierte Brca1-Protein in HCC1937BL beispielhaft mit dem noch vorhandenen N-Terminus an Bard1 binden (Simons *et al.*, 2006), das N-terminal trankierte Brca1-Protein in HA166 über den C-Terminus mit CtIP interagieren (Chen *et al.*, 2008) und diese Faktoren jeweils für die Interaktion mit dem noch vorhandenen wtBrca1-Protein blockieren. Da sowohl CtIP als auch Bard1 aktiv an der durch Brca1-geförderten Homologiegerichteten DSB-R beteiligen sind (Westermarck *et al.*, 2003; Yun and Hiom, 2009), könnte der dominant negative Effekt der mutierten Brca1-Proteine zu einer Erhöhung des Mikrohomologiegerichteten NHEJ beitragen. Mit dem dominant negativen Effekt kann jedoch die in beiden Linien detektierte, drastische Abnahme an wtBrca1-Protein nicht erklärt

werden. Möglicherweise kann ein starker Selektionsdruck im Laufe der Etablierung und anschließenden Passagierung der Zellen einen Heterozygotie-Verlust (LOH) verursachen. Beim Vergleich der DSB-R-Aktivitäten zwischen beiden *BRCA1*-Defektlinien konnten für NHEJ, SSA und HR höhere Frequenzen für die Linie HA166 als für HCC1937BL ermittelt werden. In diesem Zusammenhang spielt möglicherweise auch die verminderte Nibrin-Expression von HCC1937BL eine wichtige Rolle, da Nibrin, als ein Bestandteil des MRN-Komplexes, essentiell für HR, SSA und für Mikrohomologie-gerichtetes NHEJ ist. Des Weiteren konnte speziell für den Komplexpartner Mre11 eine Beteiligung am Mikrohomologie-gerichteten NHEJ gezeigt werden (Bennardo *et al.*, 2008; Howlett *et al.*, 2006; Nussenzweig and Nussenzweig, 2007; Sakamoto *et al.*, 2007; Tauchi *et al.*, 2002; Xie *et al.*, 2009; Yang *et al.*, 2006; Zhuang *et al.*, 2009).

5.2 Der *BRCA2*-DSB-R-Defekttyp

Wie bereits für *BRCA1*-Mutationen detektiert, konnte auch für den *BRCA2*-DSB-R-Defekttyp eine signifikante Steigerung der mutagenen SSA-Frequenzen in den *BRCA2*-/*FANCD1*-Defektlinien HA238 und GM13023A nachgewiesen werden. Des Weiteren wies die *FANCD1*-Defektlinie GM13023A eine statistisch signifikante Erhöhung der Mikrohomologie-gerichteten NHEJ-Frequenz auf. Weiterhin indikativ für den *BRCA2*-DSB-R-Defekttyp war die Reduktion der HR. In diesem Zusammenhang führte die heterozygote *BRCA2*-Mutation (5946delCT/wt) der Zelllinie HA238 sogar zu einer Reduktion der HR bis unter die Nachweisgrenze unseres Testsystems. Mit der Zelllinie GM13023A (genaue *FANCD1*-Mutation ist nicht bekannt) konnte eine Senkung der HR um mindestens eine Zehnerpotenz im Vergleich zu den Kontrollzelllinien detektiert werden.

Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit bereits veröffentlichten Daten. In vorangegangenen Studien konnte gezeigt werden, dass Zelllinien mit *BRCA2*-Mutationen drastische Reduktionen in der HR aufweisen, wobei SSA leicht erhöht, NHEJ jedoch nicht beeinflusst wurde (Stark *et al.*, 2004; Tutt *et al.*, 2001). *Brca2* stimuliert dabei die HR durch Rekrutierung von Rad51 an den DSB und kontrolliert den Rad51-abhängigen Aufbau der Nukleoprotein-Filamente, die DNA-Strangpaarung und den DNA-Strangaustausch (Pellegrini *et al.*, 2002). Wie bereits für *BRCA1*-Mutationen beschrieben, führen auch genetische Veränderungen im *BRCA2*-Gen zu erhöhten Chromosomenaberrationen und verstärktem Schwesterchromatid-austausch. Diese Zellen weisen eine hohe Sensitivität gegen DNA-schädigende Agenzien auf und zeigen erhöhte Mutationsraten (Jasin, 2002; Kim *et al.*, 2004). Die Mutation im *BRCA2*-Gen führt demzufolge zu einer verstärkten Anwendung fehlerhafter DSB-R-Mechanismen,

wodurch die erhöhte Chromosomeninstabilität von *BRCA2*- Defektlinien erklärt werden kann (Gudmundsdottir and Ashworth, 2006; Nakanishi *et al.*, 2005).

Das durch die Mutation eines Allels trunkierte Brca2-Protein in HA238-Zellen (5946delCT/wt), verursacht mit hoher Wahrscheinlichkeit die Senkung der HR. Die durch die Mutation verursachte Trunkierung des Brca2-Proteins am C-Terminus führt zum Verlust des NLS (*Nuclear localization signal*), der DNA-Bindedomäne sowie der C-terminalen Rad51-Bindedomäne, die ebenfalls in die Regulation der DSBR involviert ist. Die für die Rad51-Bindung notwendigen BRC-Wiederholungssequenzen sind noch vorhanden und könnten an Rad51 binden und nach dem Prinzip der kompetitiven oder dominant negativen Hemmung die Wirkung des verbliebenen wtBrca2 bezüglich der Rad51-Komplexbildung inhibieren und somit HR reduzieren (Powell and Kachnic, 2003). Diesbezüglich ist bekannt, dass trunkierte Brca2-Proteine ohne NLS zusammen mit dem gebundenen Rad51-Protein im Cytoplasma verbleiben, da Brca2 die NLS benötigt, um Rad51 in den Nukleus zu transportieren (Spain *et al.*, 1999). Damit führen trunkierte Brca2-Proteine zu einer Senkung der verfügbaren, funktionell aktiven Rad51-Moleküle und folglich zu einer Reduktion der HR (Spain *et al.*, 1999).

5.3 Der *NBN/RAD50*-DSBR-Defekttyp

Neben Brca1 und Brca2, spielt auch Nibrin eine wichtige Rolle in der DSBR. Als Bestandteil des MRN-Komplexes ist Nibrin für die Lokalisation von Mre11 und Rad50 im Nukleus verantwortlich und Mutationen, die mit einem Funktionsverlust dieser Komponenten einhergehen, sind mit früher embryonaler Letalität assoziiert (Luo *et al.*, 1999; Xiao and Weaver, 1997; Zhu *et al.*, 2001). Die für *NBN*- und *ATM*-Defektzellen beschriebenen Symptome wie erhöhte Sensitivität gegenüber ionisierender Strahlung, genomische Instabilität, Defekte in der Zellzykluskontrolle weisen auf ein Zusammenspiel beider Gene im gleichen DSBR-Mechanismus hin, wobei Nibrin als Substrat von ATM phosphoryliert wird, andererseits aber für die optimale Funktion von ATM notwendig ist (Lee and Lim, 2006). Die Zelllinie HA226 weist die in *Nijmegen breakage syndrom*-Patienten am häufigsten detektierte homozygote *NBN*-Mutation 657del5/657del5 auf, die zur geringen Expression eines N-terminal trunkierten Proteins führt (Difilippantonio and Nussenzweig, 2007). Dem entsprechend wurde im Western-Blot eine geringe Menge an verkürztem Nibrin-Protein detektiert (Daten nicht gezeigt). Diesem Protein fehlt die N-terminal lokalisierte FHA- und BRCT-Domäne, während die C-terminalen Mre11-Binde- und ATM-Interaktionsdomänen vorhanden sind (Demuth and Digweed, 2007). Entsprechend der Hypothese, dass der N-

Terminus von Nibrin wichtig für die Stimulation von Proteinen ist, die in Zellzykluskontrolle und DNA-Reparatur involviert sind (Difilippantonio and Nussenzweig, 2007), wurden drastische Senkungen der DSBR in HA226-Zellen detektiert. Im Vergleich zu den Kontrollzelllinien konnte für die Zelllinie mit *NBN*-Mutation eine markante Reduktion von SSA ermittelt werden, während NHEJ und HR partiell inhibiert wurden. Dabei scheinen die N-terminalen FHA- und BRCT-Domänen von Nibrin für die Lokalisation vom MRN-Komplex im Nukleus unwichtig zu sein. Die Domänen sind jedoch essentiell für die Akkumulation des MRN-Komplexes in strahleninduzierten Foci, was die DSBR-Defizienz nach künstlicher Induktion von DSBen in dieser Patientenzelllinie erklären könnte (Sakamoto *et al.*, 2007). Die Erkenntnis, dass der N-Terminus für die DSBR entscheidend ist, zeigt sich vor allem darin, dass in C-terminal trunkierten *NBN*-Defektzellen ATM weiterhin mit dem MRN-Komplex interagiert und auch in Abwesenheit vom Nibrin C-Terminus an DSBe binden kann. (Difilippantonio and Nussenzweig, 2007). Interessanterweise konnte in dieser Arbeit die Reduktion der HR und des Mikrohomologie-gerichteten NHEJ nur partiell, im Vergleich zur Kontrollzelllinie 416MI ermittelt werden. Das steht im Widerspruch zu publizierten Daten, bei denen *NBN*-defiziente Zellen Beeinträchtigungen in HR und NHEJ aufweisen (Howlett *et al.*, 2006; Sakamoto *et al.*, 2007; Tauchi *et al.*, 2002; Yang *et al.*, 2006).

Neben Nibrin wurde ein moderat erhöhtes Brustkrebsrisiko auch für Mutationen in seinem Komplexpartner Rad50 nachgewiesen (Walsh and King, 2007). Die in dieser Arbeit verwendete Zelllinie HA239 weist eine hypomorphe *RAD50*-Mutation (R1099X/X1313Y) auf, wobei von Dörk und Mitarbeitern nur sehr geringe Rad50-Proteinmengen detektiert wurden (Walters *et al.*, 2009). Weiterhin sind nur geringe Proteinmengen der Komplexpartner Mre11 und Nibrin in HA239 detektiert worden (Kozlov *et al.*, 2006; Walters *et al.*, 2009). In diesem Zusammenhang konnte auch in dieser Arbeit nur eine geringe Nibrin-Expression ermittelt werden. Entsprechend der Verknüpfung von Nibrin und Rad50 im MRN-Komplex (Assenmacher and Hopfner, 2004; van der Linden *et al.*, 2009) konnte in beiden Defektlinien eine drastische Senkungen von SSA um bis zu einer Zehnerpotenz im Vergleich zu den Kontrollzelllinien ermittelt werden, wobei HR und Mikrohomologie-gerichtetes NHEJ interessanterweise nicht beeinflusst wurden. Gemäß der Literatur ist der hoch konservierte DSBR-Faktor Rad50 für die Bindung des MRN-Komplexes an die lineare DNA verantwortlich und hält die DNA-Moleküle zusammen. Komplexe bestehend aus Nibrin-Rad50 und Mre11-Rad50 können ebenso an DNA-Enden binden und diese zusammenhalten.

Entsprechend dieser Erkenntnisse führen Rad50-Mutationen wahrscheinlich durch die beeinträchtigte DNA-Assoziation des MRN-Komplexes zu verminderter DSBR, genomischer Instabilität und Krebsentstehung (Heikkinen *et al.*, 2006; van der Linden *et al.*, 2009).

5.4 Der TP53-DSBR-Defekttyp

Während Brca1 und Brca2 die mutagenen DSBR-Mechanismen von Mikrohomologie-gerichtetem NHEJ und SSA inhibieren, unterdrückt p53 entsprechend der Hierarchie der DSBR unterhalb von Brca1 und Brca2 die exzessive, fehlerhafte HR (Gatz and Wiesmüller, 2006; Stark *et al.*, 2004). Entsprechend dieser Aussage weisen die von mir in dieser Arbeit untersuchten Brustepithelzellen mit wtp53 eine um ein bis drei Zehnerpotenzen verringerte Frequenz an HR beim Vergleich mit der Brustkrebszelllinie MDA-MB-436 ohne detektierbares p53-Protein auf. Weiterhin wurde gezeigt, dass p53 das Mikrohomologie-gerichtete NHEJ (Dahm-Daphi *et al.*, 2005) sowie das SSA (Yun *et al.*, 2004) beeinflusst. Entsprechend dieser Feststellungen konnten für MDA-MB-436 erhöhte NHEJ- und SSA-Frequenzen im Vergleich zu wtTP53-Zelllinien detektiert werden, wobei der Effekt geringer ausfiel im Vergleich zur HR. Die Zelllinie MDA-MB-436 weist wtBRCA1 auf (Saal *et al.*, 2008), womit der starke Anstieg von NHEJ also nicht erklärt werden kann. Demgegenüber war berichtet worden, dass der extreme C-Terminus von p53 an DNA-Enden bindet (Okorokov *et al.*, 2002) und damit NHEJ entgegenwirkt. Da MDA-MB-436 kein p53-Protein exprimiert, fehlt dieser Zelllinie möglicherweise aufgrund des p53-Defekts die Fähigkeit Mikrohomologie-gerichtetes NHEJ zu unterdrücken. Die Zelllinie MDA-MB-436 kann die ungenaue HR nicht unterdrücken, was durch Verwendung von HR-Substraten mit verminderter versus ausreichender Homologie gezeigt werden konnte. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit der Erkenntnis, dass wtp53 die HR zwischen unvollständig homologen Sequenzen unterdrückt (Gatz and Wiesmüller, 2006; Sengupta and Harris, 2005). Die nicht-transformierten Epithelzellen MCF10a und MCF12a wiesen wesentlich geringere DSBR-Frequenzen auf, als die ebenso wtp53-positive Brustkrebszelllinie MCF7. Somit scheint MCF7 zusätzliche Mutationen mit Bezug zur DSBR erworben zu haben. In diesem Zusammenhang ist interessant, dass die reduzierte Expression von wtBrca1 in MCF7-Zellen nach Verlust eines BRCA1-Allels publiziert wurde (Kachhap *et al.*, 2001), womit die erhöhten NHEJ- und SSA-Frequenzen erklärt werden könnten. Die verstärkte Anhäufung der MCF7-Zellen in der S-/G2-Zellzyklusphase und das vermutlich daraus resultierende erhöhte Expressionsniveau von Rad51 könnte die Stimulierung der HR begründen.

Im Vergleich dazu wurden MDA-MB-134VI-Zellen mit heterozygoter *TP53*-Mutation getestet, die lediglich ein wt*TP53*-Allel aufwiesen. Diese Zellen unterdrückten nach wie vor die DSBR, wobei die Frequenzen im Bereich von MCF12a und MCF7 lagen. Es wurden jedoch keine signifikanten Unterschiede in der HR bei Verwendung verkürzter versus ausreichender Homologielängen detektiert, womit ein partieller Ausfall von p53 vorzuliegen scheint.

Die Zelllinien MDA-MB-453 und UACC-893 exprimieren C-terminal mutierte bzw. trunkierte Proteine. MDA-MB-453 weist eine 30 bp Deletion in der C-terminal kodierenden Sequenz auf und zeigte ein gegenteiliges DSBR-Muster im Vergleich zu MDA-MB-436 ohne p53-Protein und UACC-893 mit p53, das nach Aminosäure 342 trunkiert ist. Anstatt eines Anstieges von HR im Vergleich zu wt*TP53*-Zellen und eines zehnfach geringeren Effektes auf NHEJ und SSA (MDA-MB-436, UACC-893) wurde NHEJ in MDA-MB-453 am stärksten stimuliert, gefolgt von SSA und letztendlich HR. Es wurde jedoch berichtet, dass p53 nach Verlust der letzten 30 Aminosäuren die HR nach wie vor herunterreguliert (Akyüz *et al.*, 2002; Dudenhöffer *et al.*, 1999), was erklären könnte weshalb die 368del30bp-Mutation von *TP53* in MDA-MB-453 Zellen eine vergleichbar geringe Störung der HR-Regulation nach sich zog. Die letzten 30 Aminosäuren des C-Terminus scheinen auch Fehlpaarungen in den Intermediaten der DNA-Rekombination zu erkennen (Dudenhöffer *et al.*, 1999). Damit ist die verminderte Diskriminierungsfähigkeit der *TP53*-Mutanten zwischen HR-Substraten mit kurzer und langer Homologie in dieser Arbeit erklärbar. Das von den UACC-893-Zellen exprimierte p53 weist den Verlust des regulatorischen C-Terminus und eines Teils der Oligomerisierungsdomäne auf (Atz *et al.*, 2000) und zeigte wie die p53-negative Zelllinie MDA-MB-436 einen Defekt in der Unterdrückung der HR. Dies stimmt mit früheren Analysen dieser Arbeitsgruppe überein, bei denen der Verlust der letzten 60 Aminosäuren von p53 zu einer Beeinträchtigung der HR-Regulation führte. Diesbezüglich scheint die Oligomerisierungsdomäne für die Regulation der HR essentiell zu sein (Dudenhöffer *et al.*, 1999).

In dieser Arbeit wurden keine markanten Unterschiede in der HR zwischen MCF7-Zellen mit wtp53 und MDA-MB-468-Zellen mit der Hotspot-Mutante p53-R273H detektiert.

In Übereinstimmung mit der Beobachtung, dass *TP53*-Mutationen dazu führen, dass HR-Substrate mit unterschiedlicher Homologielänge nicht mehr diskriminiert werden können, hatte jedoch auch MDA-MB-468 diese Eigenschaft verloren. Weiter zeigten sich beim Vergleich von MDA-MB-468 mit MDA-MB-134VI, einer Zelllinie mit noch einem funktionsfähigen wt*TP53*-Allel, 4-5-fach erhöhte HR-Frequenzen in MDA-MB-468. MDA-

MB-468 hat demnach ein Defekt in der p53-vermittelten HR-Regulation. Eine mögliche Ursache für die detektierte Restfunktion von p53-R273H in der HR ist, dass 75 % der p53-Moleküle in MDA-MB-468 die wtp53-Konformation aufweisen (Muller *et al.*, 2008).

Eine verbleibende Kontrollfunktion in der HR nach *TP53*-Mutation dient auch als Erklärungsansatz für die verminderte DSBR-Aktivität in BT-20 (p53-K132Q), T47D (p53-L194F) und MDA-MB-231 (p53-R280K) Zellen. Diese Zelllinien wiesen extrem hohe p53-Proteingehalte auf, während die Expressionniveaus von Rad51 und p21 oder der Anteil der Zellen in der G1-Zellzyklusphase sich im Verhältnis zu anderen Zelllinien mit mutiertem p53-Protein nicht so stark unterschieden. Funktionelle Defekte durch die jeweilige Mutation können möglicherweise durch die große Menge an mutiertem und stabilisiertem p53-Protein ausgeglichen werden. Zusätzlich weist das mutierte p53-Protein der Zelllinien T47-D und MDA-MB-231 zum Großteil wtp53-Konformation auf, was insbesondere in diesen Zelllinien Restfunktionen der mutierten p53-Proteine vermuten lässt (Muller *et al.*, 2008).

Diese Analysen zeigten, dass endogen exprimiertes wtp53 in Brustepithelzellen die HR unterdrückt, wobei in geringerem Ausmaß auch senkende Effekte für NHEJ und SSA detektiert wurden. Weiterhin scheint die Unterdrückung von Mikrohomologie-gerichtetem NHEJ und SSA den äußeren C-Terminus von p53 zu benötigen. Dieser kann DNA-Enden binden, vor Degradation schützen und die DNA-Ligation katalysieren (Bakalkin *et al.*, 1994; Oberosler *et al.*, 1993; Okorokov *et al.*, 2002). Die Oligomerisierungs- sowie die zentrale DNA-Bindedomäne von p53 sind an der Regulation der HR beteiligt. Dies steht im Einklang mit der Aussage, dass diese p53-Regionen mit Rad51 interagieren und für die Bildung der Rekombinationsintermediate benötigt werden (Buchhop *et al.*, 1997; Süsse *et al.*, 2000). Zellen mit entsprechend mutierten p53-Proteinen und einem Expressionsniveau im wtp53-Bereich deuteten auf einen partiellen Funktionsverlust mit DSBR-Aktivitäten zwischen wtp53 und p53^{-/-} hin. Demgegenüber war für hohe Proteinniveaus an mutiertem p53 eine HR-Senkung festzustellen, was auf eine Restaktivität der Mutantenproteine schließen ließ.

Die Herunterregulierung des wtp53-Proteinniveaus in p53-positiven Zellen durch RNA-Interferenz führte zur Erhöhung der HR, nicht jedoch in p53-negativen Zellen. Des Weiteren beeinflusste der *knockdown* von p53 die HR stärker, als NHEJ oder SSA. Damit wiesen die Ergebnisse auf eine hierarchische Regulation der DSBR in p53-positiven Epithelzellen hin, wobei die HR am stärksten, NHEJ und SSA schwächer beeinflusst sind (Keimling and Wiesmüller, 2009).

MDA-MB-468 Zellen wiesen nach *p53-knockdown* einen Anstieg der HR auf. In früheren Experimenten unserer Arbeitsgruppe wies die *p53-R273H*-Mutation, nach Expression des Mutantenproteins, Defekte in der Unterdrückung der HR auf (Akyüz *et al.*, 2002; Dudenhöffer *et al.*, 1999; Restle *et al.*, 2008) und verlor die Fähigkeit die Rad51-Polymerisation zu inhibieren (Linke *et al.*, 2003). Es war aber bereits früher erkennbar, dass *p53-R273H* noch eine Restfunktion in der Unterdrückung der HR besitzt, die sich im Vergleich zu Zellen ohne jegliches *p53* darstellen ließ (Akyüz *et al.*, 2002; Dudenhöffer *et al.*, 1999; Restle *et al.*, 2008).

Der schwache Einfluss des *p53-knockdowns* in T47-D, MDA-MB231 sowie BT-20 Zellen könnte damit erklärt werden, dass auch geringe Proteinmengen von *p53* ausreichend sind für die DSBR-Funktion (Akyüz *et al.*, 2002). Ein *p53-knockdown* auf 10-40 % in Zellen mit extrem hohen *p53*-Mengen ist möglicherweise nicht ausreichend, da genügend Moleküle mit Restfunktion für eine effektive DSBR-Regulation verbleiben.

Der *knockdown* von *p53* minderte die Repressionsfähigkeit von wt und mutiertem *p53*. Damit diene der *p53-knockdown* zur Detektion des *p53*-Defektes in der DSBR-Regulation, war jedoch nicht geeignet bei hohen *p53*-Expressionsniveaus. Zur Identifizierung partieller Defekte in der Regulation der HR war die Prüfung der Diskriminierung zwischen ausreichender und verkürzter Homologie eine geeignete Methode (Bertrand *et al.*, 2004; Gatz and Wiesmüller, 2006).

5.5 Klassifizierung von *CHEK2*- und *ATM*-Mutationen gemäß der etablierten DSBR-Defektmuster

Mutationen im *CHEK2*-Gen sind ebenso mit erhöhtem Brustkrebsrisiko assoziiert. Als Verstärker der zellulären Antwort auf DSBe, reguliert das *CHEK2*-Genprodukt Chk2 durch Phosphorylierung und Aktivierung einer Vielzahl von Faktoren DNA-Reparatur-Prozesse, Zellzyklusarrest, Seneszenz und Apoptose-Induktion (Antoni *et al.*, 2007).

Die Zelllinien HA464 und HA456 mit der homozygoten *CHEK2*-Mutation I157T/I157T wiesen wie bereits publiziert keine Beeinträchtigung im Chk2-Expressionsniveau und Zellzyklus auf (Kilpivaara *et al.*, 2004). Der Einfluss dieser, in der FHA-Domäne von Chk2 liegenden Mutation auf die Brustkrebs susceptibility wurde sehr widersprüchlich diskutiert. Einerseits wurden klare Zusammenhänge zwischen I157T-Mutation und hereditärer Brustkrebs susceptibility ermittelt (Antoni *et al.*, 2007; Bogdanova *et al.*, 2005; Kilpivaara *et al.*, 2004), andererseits wurde keine markante Assoziation gefunden (Allinen *et al.*, 2001;

Dufault *et al.*, 2004; Schutte *et al.*, 2003). In Übereinstimmung mit der engen Verknüpfung zwischen Brustkrebsentstehung und DSBR-Defekten (Ralhan *et al.*, 2007) konnte dieser Mutation in HA464, durch signifikante Senkung von SSA und HR im Vergleich zu den Kontrollzelllinien 416MI und GM02253F, ein eindeutiger *NBN/RAD50*-DSBR-Defekt zugeordnet werden. Andererseits lieferte die Zelllinie HA456 weniger klare Ergebnisse. Je nach Bezug auf die Kontrollzelllinien konnten für HA456 sowohl reduzierte als auch erhöhte Frequenzen an SSA und HR ermittelt werden. Diesbezüglich ist anzunehmen, dass *CHEK2*-Mutationen durch synergistische Effekte mit anderen Mutationen zur Krebsentstehung beitragen (Antoni *et al.*, 2007). Dafür spricht, dass HA456 aus einer gesunden Kontrollprobandin, HA464 aus einer Brustkrebspatientin isoliert wurden und damit HA464 möglicherweise weitere, bisher nicht bekannte Mutationen mit direktem oder indirektem Einfluss auf die DSBR aufweist.

Die Zelllinie HA455 wurde aus einer Brustkrebspatientin isoliert, weist neben der heterozygoten *CHEK2*-Mutation (del(9,10)/wt) eine weitere heterozygote Mutation im *NBN*-Gen (657del5/wt) und entsprechend reduzierte Chk2- und Nibrin-Proteinmengen auf. Interessanterweise zeigte diese Zelllinie eine drastische Steigerung aller DSBR-Aktivitäten. Für SSA, HR und Mikrohomologie-gerichtetes NHEJ wurden im Vergleich zu den Kontrollzelllinien Anstiege von bis zu einer Zehnerpotenz ermittelt, wohingegen die Zelllinien HA464, HA456 und HA226 mit homozygot veränderten Allelen in *CHEK2* bzw. *NBN* eher mit einer Senkung der DSBR assoziiert wurden.

Ein Grund für dieses Phänomen könnte sein, dass die verminderte Chk2-Proteinexpression gemäß Zhuang und Mitarbeitern die Chk2-abhängige Brca1-Phosphorylierung beeinträchtigt, womit die Erhöhung von NHEJ und SSA durch die gesenkte Brca1-abhängige Unterdrückung von fehlerhaften DSBR-Aktivitäten nachvollziehbar wäre (Zhuang *et al.*, 2006). Des Weiteren konnte mit der Zellzyklusanalyse ein signifikant erhöhter G1-Anteil von 74 % ermittelt werden, womit ein Anstieg der vorwiegend in G1 ablaufenden DSBR-Aktivitäten wie NHEJ und SSA auch durch die Zellzyklusverschiebung erklärbar wäre. Die drastische Erhöhung der HR in HA455 Zellen ist durch die Mutation im *NBN*- und *CHEK2*-Gen nicht erklärbar, denn *NBN*-Mutationen sind mit Senkung von HR assoziiert (Sakamoto *et al.*, 2007) und Chk2 beeinflusst durch Phosphorylierung der C-terminalen Domäne von Brca2 die Brca2-Rad51-Interaktion und katalysiert damit die Lokalisation von Rad51 an einzelsträngige DNA (Bahassi *et al.*, 2008). Demzufolge müssten Mutationen im *NBN*- und *CHEK2*-Gen zu einer Senkung der HR führen. Möglicherweise sind die residualen wt-Proteinmengen von Chk2 und Nibrin bei heterozygoter Mutation für die DSBR-Aktivität ausreichend. Vermutlich

hat die Zelllinie HA455 weitere Mutationen in Genen mit direktem oder indirektem Einfluss auf die DSBR erworben, die mit einer starken Erhöhung der HR assoziiert sind. Durch die Erhöhung des G1-Anteils in der zellulären Verteilung kann eine *TP53*-Mutation jedoch ausgeschlossen werden, da *wtp53* G1-Arrest initiiert (Brown *et al.*, 2007).

Den bisher untersuchten brustkrebsrelevanten Mutationen in *BRCA1*, *BRCA2*, *TP53*, *NBN* und *RAD50* konnten eindeutige Effekte in der DSBR zugeordnet werden. Des Weiteren stimmen die detektierten DSBR-Defektmuster mit den Aussagen in der Literatur überein. Für das multifunktionelle Protein ATM ist bekannt, dass es mit einer Vielzahl von Faktoren, die in DSBR, *Checkpoint*-Kontrolle, Apoptose und Seneszenz involviert sind, interagiert (Valerie and Povirk, 2003). Verglichen mit den bereits diskutierten Genmutationen wurden bereits vor meiner Arbeit für *ATM*-Mutationen widersprüchliche Ergebnisse publiziert.

Einerseits wurde gezeigt, dass *ATM*-Inhibierung zu einer signifikanten Senkung der HR führt, *NHEJ* jedoch nicht beeinflusst wird (Golding *et al.*, 2004; Morrison *et al.*, 2000). Andererseits wurden statistisch relevante Erhöhungen von intra- und extrachromosomaler Rekombination in *ATM*-defizienten Zellen detektiert (Bishop *et al.*, 2000; Drexler *et al.*, 2004). Die in dieser Arbeit untersuchten *ATM*-Defektzelllinien HA204, GM01526E, HA101, HA56, HA201, HA388, HA187, HA202, HA306, HA126, HA433 zeigten deutlich, dass *ATM*-Mutationen kein einheitliches DSBR-Defektmuster hervorrufen. Im Folgenden werden die Mutationen im Einzelnen diskutiert.

Die *ATM*-Mutation 7636del9/7636del9 der *ATM*-Defektlinie HA204 führt zum Verlust der Aminosäuren 2546 bis 2548 in der HEAT (*huntingtin, elongation factor 3, A subunit of protein phosphatase 2A and TOR1*) -Wiederholungssequenz am C-Terminus der FAT- (*FRAP/ATM/TRRAP*)-Domäne (siehe Schematische Darstellung des *ATM*-Proteins, Anhang 9.4, Abb. 56), was mit einer Destabilisierung vom *ATM*-Protein verbunden ist. Entsprechend der Aussage, dass Trunkierungen und *Missense*-Mutationen von *ATM* zu instabilen *ATM*-Proteinen führen (Lavin *et al.*, 2004), konnte das *ATM*-Protein im Western-Blot nur nach langer Exposition nachgewiesen werden.

Infolge dieser *ATM*-Mutation ist die *p53*-Interaktion gestört und die *ATM*-abhängige 53-Phosphorylierung komplett aufgehoben (Khanna *et al.*, 1998; Watters *et al.*, 1997). In diesem Zusammenhang ist ebenfalls interessant, dass für HA204 ein deutlich vermindertes *p53*-Expressionsniveau detektiert wurde, was möglicherweise den geringen Anteil der HA204-Zellen in der G1-Zellzyklusphase erklären könnte, da *wtp53* nach DNA-Schädigung G1-Arrest initiiert (Brown *et al.*, 2007). Des Weiteren konnte mir bereits von Frau Prof. Dr. Wiesmüller

mitgeteilt werden, dass das mutierte ATM-Protein der Zelllinie HA204 nicht mehr befähigt ist Chk2 zu phosphorylieren. Es wurde ebenfalls publiziert, dass die *ATM*-Mutation 7636del9/7636del9 die Interaktion zwischen ATM und Nibrin nicht beeinträchtigt (Gatei *et al.*, 2000), so dass Nibrin effizient ATM-abhängig an Ser278 und Ser343 phosphoryliert und aktiviert wird (Difilippantonio and Nussenzweig, 2007; Gatei *et al.*, 2000; Lim *et al.*, 2000; Wu *et al.*, 2000; Zhao *et al.*, 2000). Demzufolge ist die Funktionalität des MRN-Komplexes durch diese *ATM*-Mutation nicht gestört. Dies spiegelt sich auch in den DSBR-Frequenzen wieder, da Beeinträchtigungen der ATM-Nibrin-Interaktion eher mit einer drastischen Senkung (Difilippantonio and Nussenzweig, 2007; Kurz and Lees-Miller, 2004), jedoch nicht mit einer Erhöhung der DSBR-Aktivität von Zellen assoziiert wurden.

Die Zelllinie GM01526E mit der homozygoten *ATM*-Mutation M1T/M1T weist kein ATM-Protein auf.

Beide Linien (HA204 und GM01526E) demonstrierten mit den markanten Erhöhungen im Mikrohomologie-gerichteten NHEJ- und SSA-Reparaturweg ähnliche DSBR-Aktivitäten wie die *BRCA1*-Defektlinien HA166 und HCC1937BL. Weiterhin fiel auf, dass HA204 deutlich höhere NHEJ- und SSA-Frequenzen im Vergleich zu GM01526E aufwies.

Interessanterweise konnten beide *ATM*-Mutationen bereits in Brustkrebspatientinnen detektiert werden und stehen damit im direkten Zusammenhang mit erhöhtem Brustkrebsrisiko (Cavaciuti *et al.*, 2005; Spring *et al.*, 2002). Möglicherweise führt der Verlust des ATM-Proteins bzw. die *ATM*-Mutation 7636del9/7636del9 zu verminderter Brca1-Phosphorylierung und somit zur Inhibierung der Brca1-abhängigen Unterdrückung der fehlerhaften DSBR-Aktivitäten. Andererseits konnte kein direkter Einfluss der ATM-abhängigen Phosphorylierung von Brca1 an Serin 1423 und 1524 auf die DSBR nachgewiesen werden (Zhang *et al.*, 2004). ATM kann jedoch über die Chk2-vermittelte Brca1-Phosphorylierung an Ser988 und c-Abl-vermittelte Phosphorylierung an Tyrosinresten die DSBR-Aktivität von Brca1 regulieren (Kurz and Lees-Miller, 2004). Da für das mutierte ATM-Protein (7636del9/7636del9) von HA204 bereits gezeigt werden konnte, dass Chk2 nicht mehr phosphoryliert werden kann und GM01526E kein ATM-Protein aufweist und somit ebenfalls keine ATM-abhängige Chk2-Phosphorylierung erfolgen kann, ist für die Erhöhung der fehlerhaften DSBR-Aktivitäten die beeinträchtigte ATM-abhängige Chk2-Phosphorylierung am wahrscheinlichsten.

Die Messung von HR führte in diesen aber insgesamt in der Mehrheit der ATM-Defektzelllinien nicht zu markanten Veränderungen. Möglicherweise ist der Einfluss von ATM auf die HR marginal (Sakamoto *et al.*, 2007), obwohl ATM eine Vielzahl von Faktoren

phosphoryliert, die direkt oder indirekt in die HR involviert sind (Shrivastav *et al.*, 2008). Andererseits könnte der Verlust von ATM durch überlappende Funktionen der DNA-PKcs ausgeglichen werden (Callen *et al.*, 2009), da Faktoren wie H2AX, p53, WRN, RPA, SMC1 und c-Abl von ATM und DNA-PKcs phosphoryliert und aktiviert werden können (Shrivastav *et al.*, 2008). Umgekehrt scheint Brca1 für die Lokalisation von bereits aktiviertem ATM an DSBe und für optimale Gehalte an ATM-abhängig phosphoryliertem p53, Nibrin, Chk2, CtIP und c-Jun notwendig zu sein (Kitagawa *et al.*, 2004; Lee and Paull, 2007). Infolge dieser wechselseitigen Interaktion von Brca1 und ATM in der DSBR könnten Mutationen im *BRCA1*- und *ATM*-Gen gleichartige DSBR-Defektmuster ergeben.

Da *TP53*-Mutationen bzw. drastische Reduktionen des p53-Expressionsniveaus vor allem mit einer Steigerung der HR und einer eher moderaten Erhöhung von NHEJ und SSA einhergehen, könnte das für die *ATM*-Defektlinien HA204 und GM01526 generierte DSBR-Defektmuster kaum durch eine mögliche Beeinflussung der ATM-p53-Interaktion erklärt werden. Da wie bereits erwähnt, die Regulation von Brca1 durch ATM indirekt über Chk2 vermittelt wird, könnte natürlich auch eine Chk2-Mutation das für HA204 und GM01526E zugeordnete DSBR-Defektmuster erzeugen. Diesbezüglich weisen jedoch bereits publizierte Daten mit *CHEK2*-Mutationen vorrangig auf Senkungen der DSBR hin (Bahassi *et al.*, 2008). Des Weiteren wurden auch durch Untersuchungen in dieser Arbeit *CHEK2*-Defektlinien eher mit einer Senkung der DSBR-Frequenzen assoziiert oder keine klaren DSBR-Änderungen detektiert. Diesbezüglich könnte das für HA204 und GM01526E zugeordnete *BRCA1*-DSBR-Defektmuster nicht durch andere Faktoren wie p53 oder Chk2 allein generiert werden, sondern ist vorrangig auf eine möglicherweise beeinträchtigte Interaktion zwischen ATM und Brca1 zurückzuführen.

Des Weiteren ist interessant, dass GM01526E als einzige *ATM*-Defektlinie ohne *ATM*-Proteinexpression zum *BRCA1*-DSBR-Defekttyp zugeordnet wurde, wobei andere *ATM*-Defektlinien ohne *ATM*-Protein anders bzw. nicht klassifizierbar waren. Möglicherweise weist GM01526E eine weitere Mutation im Brca1-DSBR-Signalweg auf. Dabei könnte es sich um eine milde/heterozygote Mutation handeln, die nur in Kombination mit einer *ATM*-Mutation wirksam ist.

Die *ATM*-Defektzelllinien HA101, HA56 und HA201 wurden infolge ihrer moderat erhöhten SSA-Frequenzen dem *BRCA2*-DSBR-Defektmuster zugeordnet. Eine direkte Assoziation zwischen ATM und Brca2 ist bisher nicht bekannt, funktionelle Interaktionen über mehrere Zwischenfaktoren wie Chk2 und FoxM1 (*Forkhead box M1*) wären jedoch möglich. Dabei

begünstigt die ATM-abhängige Aktivierung von Chk2 an T68 die Phosphorylierung und Stabilisierung des Transkriptionsfaktors FoxM1, der die Expression von Brca2 unterstützt (Antoni *et al.*, 2007; Tan *et al.*, 2007). Weiterhin kann Chk2 durch Phosphorylierung der C-terminalen Domäne von Brca2 die Brca2-Rad51-Interaktion und damit die Assoziation von Rad51 an einzelsträngige DNA beeinflussen (Bahassi *et al.*, 2008).

Die für die ATM-Defektlinien HA101 und HA56 detektierte drastische Reduktion der HR wäre durch das Zusammenspiel zwischen ATM und Brca2 in dem gleichem DSBR-Mechanismen erklärbar, da moderate Erhöhungen von SSA in Kombination mit einer Senkung der HR sowohl für BRCA2- wie auch ATM-Mutationen ermittelt wurden (Gudmundsdottir and Ashworth, 2006; Luo *et al.*, 1996; Morrison *et al.*, 2000).

Die ATM-Defektlinie HA101 (IVS7+G5>A/D2625E-A2626P) weist im ATM-Gen neben einer *Splicing*-Mutation eine zweifache *Missense*-Mutation zwischen FAT- und Kinase-Domäne (siehe Abb. 56) auf (Lavin *et al.*, 2004; Lee and Paull, 2007). In der Western-Blot-Analyse der ATM-Defektlinien konnte das ATM-Protein der Zelllinie HA101 erst nach langer Exposition nachgewiesen werden. In Übereinstimmung mit diesen Daten konnte auch in Dörk *et al.* 2004 eine geringe Menge an ATM-Protein in HA101 nachgewiesen werden. Weiterhin wurde in Dörk *et al.* 2004 eine Restkinaseaktivität gegenüber p53 detektiert. Die Kinaseaktivität von ATM gegenüber Nibrin war sehr gering (Dörk *et al.*, 2004).

Die Zelllinie HA201 mit den heterozygoten *Splicing*-Mutationen im ATM- (IVS10-6T/wt) und CHEK2-Gen (IVS2+1G>A/wt) wies im Western-Blot reduzierte Mengen an ATM- und Chk2-Protein auf. Infolge der unveränderten NHEJ- und HR-Frequenzen unterstützen die DSBR-Daten zu dieser Zelllinie die These, dass bereits geringe ATM-Proteinmengen ausreichen um DSBR-Prozesse weitestgehend zu regulieren. Möglicherweise spielen auch überlappende Funktionen von ATR und DNA-PKcs eine Rolle (Kim *et al.*, 1999; Shrivastav *et al.*, 2008). Das durch die *Splicing*-Mutation ab Exon 11 trunkierte ATM-Protein mit 371 Aminosäuren war im Western-Blot nicht nachweisbar, führt jedoch gemäß Literatur durch Beeinflussung des wtATM-Proteins zu einem dominant negativem Effekt (Broeks *et al.*, 2003; Chenevix-Trench *et al.*, 2002; Lavin *et al.*, 2004), indem p53Ser15-Phosphorylierung drastisch und Brca1-Protein- und Brca1pSer1524-Gehalte moderat reduziert sind (Chenevix-Trench *et al.*, 2002). Die verminderte Aktivierung des Brca1-Reaktionsweges durch diese ATM-Mutation in Kombination mit verminderter Nibrin-Aktivierung führt vermutlich zur moderaten Erhöhung des fehlerhaften SSA, was möglicherweise ein Grund für das erhöhte Brustkrebsrisiko ist, mit dem diese Mutation in Verbindung gebracht wird (Broeks *et al.*, 2003; Broeks *et al.*, 2000).

Die *ATM*-Mutation 3085insA/3880insA in der *ATM*-Defektlinie HA56 führt durch zwei Insertionen zu C-terminal trunkierten, instabilen und im Western-Blot nicht nachweisbaren *ATM*-Proteinen mit einer Größe von 1028 bzw. 1293 Aminosäuren (Sandoval *et al.*, 1999), denen die FAT-, Kinase- und FATC-Domäne (siehe Abb. 56) fehlen (Lavin *et al.*, 2004; Lee and Paull, 2007).

Da keine direkte Assoziation zwischen *ATM* und *Brca2* beschrieben ist, könnte das DSBR-Defektmuster, das den *ATM*-Defektlinien HA101, HA56 und HA201 zugeordnet wurde natürlich auch durch Fehlregulationen anderer DSBR-Faktoren initiiert werden. Da p53-Fehlregulationen jedoch mit drastischer Steigerung der HR und moderater Erhöhung von SSA und NHEJ einhergehen, kann eine p53-Dysfunktion ausgeschlossen werden (Keimling and Wiesmüller, 2009). *Chk2* reguliert die *Brca2*-*Rad51*-Interaktion (Bahassi *et al.*, 2008) wobei Mutationen im *CHEK2*-Gen demzufolge mit einer Verminderung der HR assoziiert sind und moderate Erhöhungen von SSA möglicherweise alternativ die drastische Senkung der HR kompensieren. Da in den *ATM*-Defektzelllinien mit Ausnahme von HA201 jedoch keine *CHEK2*-Mutationen detektiert wurden und in den Western-Blot-Analysen auch keine Veränderungen der *Chk2*-Proteinexpressionen in HA101, HA56 und HA201 ermittelt wurden, kann diese Assoziation vernachlässigt werden. Interessanterweise konnte in HA201 mit zusätzlicher *CHEK2*-Mutation keine Senkung der HR beobachtet werden.

Des Weiteren wurden *NBN*- und *RAD50*-Mutationen mit Senkungen der DSBR-Aktivitäten und *BRCA1*-Mutationen mit drastischen Erhöhungen vor allem für NHEJ in Verbindung gebracht. Zusätzlich konnten speziell für diese Faktoren keine Mutationen bzw. Veränderungen im Expressionsprofil im Vergleich zu den Kontrollzelllinien ermittelt werden. Damit ist das DSBR-Defektmuster von HA101, HA56 und HA201 am ehesten auf die durch *ATM*-Mutationen reduzierte *Chk2*-abhängige Phosphorylierung von *Brca2* zurückzuführen.

Alternativ könnten die für diese *ATM*-Defektlinien beschriebenen reduzierten *ATM*-*Brca1*-Interaktionen in Kombination mit geschwächten *ATM*-*Nibrin*-Interaktionen infolge der zum Teil gegenläufigen Effekte vom *BRCA1*- und *NBN*-DSBR-Defekttyp zu einem pseudo-*BRCA2*-DSBR-Defekttyp führen. Diesbezüglich würde die für den *BRCA1*-DSBR-Defekt detektierte Steigerung von NHEJ und SSA kompensatorisch mit der für den *NBN*-DSBR-Defekt beschriebenen Senkung von NHEJ, SSA und HR eventuell zu einer moderaten Erhöhung von SSA, einer Senkung von HR und einer geringen Aussagekraft von NHEJ führen und somit einen *BRCA2*-DSBR-Defekttyp imitieren.

Die *ATM*-Defektzelllinien HA388, HA187 und HA202 wurden infolge der Senkung der SSA-Frequenzen dem *NBN/RAD50*-Defektmuster zugewiesen, wobei im Folgenden kurz auf die einzelnen Zelllinien und deren Mutationen eingegangen wird.

Die *ATM*-Mutationen in der Zelllinie HA388 (9021insA/V2716A) umfassen einerseits eine Insertionsmutation, die durch Leserasterverschiebung ab Aminosäure 307 zu einem veränderten C-Terminus führt. Damit fehlen die C-terminalen Aminosäuren der Kinase- und FATC-Domäne, womit die Nibrin- und Tip60-Interaktion beeinträchtigt ist (siehe Anhang 9.4, Abb. 56). Weiterhin wurde bei dieser Mutation keine *ATM*-Phosphorylierung an Ser1981 sowie eine insgesamt verminderte *ATM*-Kinaseaktivität nachgewiesen (Gatei *et al.*, 2000; Jiang *et al.*, 2006). V2716A ist eine Mutation in der ATP-Bindestelle von *ATM*, die jedoch die Kinaseaktivität von *ATM* nicht beeinflusst (Lavin *et al.*, 2004). Der schwache *ATM*-Proteinnachweis lässt auf instabile Genprodukte schließen. Insgesamt lässt sich die Senkung von SSA theoretisch auf die fehlende *ATM*-abhängige Aktivierung von Nibrin zurückzuführen. Interessanterweise korreliert die geringe Rad51-Proteinexpression von HA388 nur im Vergleich zu 416MI mit einer Senkung der HR.

In der *ATM*-Defektlinie HA101 wurde ebenfalls eine sehr geringe *ATM*-Proteinexpression nachgewiesen, wobei diese Linie gesteigerte SSA-Frequenzen auswies und demzufolge dem *BRCA2*-DSBR-Defektmuster zugeordnet wurde. Demnach ist die Proteinmenge an *ATM* für die Regulation der DSBR nicht allein entscheidend, sondern vielmehr die durch Mutationen beeinträchtigten Interaktionen mit DSBR-Faktoren. So könnte in HA388 eine beeinträchtigte *ATM*-Nibrin-Interaktion zu einer spezifischen Senkung von SSA beitragen. Andererseits war die *ATM*-Nibrin-Interaktion der Zelllinie HA101 ebenfalls beeinträchtigt. Bei HA101 könnte eine zusätzliche Störung der *ATM*-abhängigen Aktivierung von Brca1 zu einem Pseudo-*BRCA2*-DSBR-Defektmuster führen. Möglicherweise führen aber auch weitere bisher nicht identifizierte Faktoren bzw. Dysfunktionen mit bisher unbekanntem DSBR-Interaktionspartnern zu Verschiebungen der DSBR-Aktivität. Interessant bleibt jedoch, dass HA101 und HA388 unter den untersuchten *ATM*-Defektlinien die beiden AT-variant-Zelllinien darstellen, da diese aus AT-Patienten mit mildem Krankheitsverlauf, d.h. aus Patienten die ein hohes Alter erreicht haben, isoliert wurden (HA101: 60jähriger Patient, HA388: 67jähriger Patient) (Dörk *et al.*, 2004).

Die *ATM*-Defektzelllinie HA187 mit den Mutationen E1978X/R250X exprimiert trunkierte *ATM*-Proteine, denen die FAT-, Kinase- und FATC (*FAT carboxy-terminal*)-Domäne fehlen. Damit geht die Nibrin-Interaktion verloren (Sandoval *et al.*, 1999). Neben der moderaten Senkung von SSA konnte in dieser Zelllinie zusätzlich eine Reduktion des Mikrohomologie-

gerichteten NHEJ detektiert werden. Die Senkung der NHEJ-Frequenzen kann mit der beeinträchtigten Aktivierung von Nibrin und Artemis, als wichtigste ATM-abhängige Faktoren des Mikrohomologie-gerichteten NHEJ einhergehen (Kurz and Lees-Miller, 2004; Riballo *et al.*, 2004). HA187 wies wie bereits für HA388 gezeigt, keine Beeinträchtigung der fehlerfreien HR im Vergleich zu den Kontrollzelllinien auf.

Die lymphoblastoide Zelllinie HA202 weist mit IVS10-6T/wt die gleiche heterozygote *ATM-Splicing*-Mutation auf wie HA201, wobei das trunkierte ATM-Protein durch einen dominant negativen Effekt (Broeks *et al.*, 2003; Chenevix-Trench *et al.*, 2002; Lavin *et al.*, 2004) zur drastischen Reduktion von p53Ser15-Phosphorylierung und moderaten Senkung der Brca1-Protein- und Brca1pSer1524-Gehalte führt (Chenevix-Trench *et al.*, 2002).

Interessanterweise wurde die Linie HA201 mit zusätzlicher heterozygoter *CHEK2*-Mutation durch die detektierte Steigerung der SSA-Frequenzen dem *BRCA2*-DSBR-Defekttyp zugeordnet, während die Linie HA202 infolge der gesenkten SSA-Frequenzen dem *NBN/RAD50*-DSBR-Defekttyp zugewiesen wurde. Wie HA201 weist auch HA202 eine weitere Mutation in einem anderen Gen auf. Hierbei konnte eine zusätzliche heterozygote Mutation in *53BP1* (1531del6/wt) detektiert werden, die zum Verlust von zwei Aminosäuren in der repetitiven Region führt. Da 53BP1 nachweislich für die Aktivierung von ATM notwendig ist (Mochan *et al.*, 2003) und reduzierte 53BP1-Expressionsniveaus mit verminderter ATM-Autophosphorylierung und ATM-Substratphosphorylierung in Verbindung gebracht werden (Lee and Paull, 2007), könnte diese Mutation zusätzlich zu einer Inhibierung der ATM-Nibrin-Interaktion und somit zu einer Senkung der SSA-Frequenzen beitragen. Andererseits konnte bereits gezeigt werden, dass 53BP1 vorwiegend im fehlerfreien NHEJ-Weg interagiert (Xie *et al.*, 2007) und somit möglicherweise keinen Einfluss auf Homologie-gerichtete DSBR hat. Interessanterweise zeigen sich jedoch ATM-Signaltransduktionsdefizienzen besonders deutlich in NBS-Zellen, in denen 53BP1 durch si-RNA herabreguliert wurde (Lee and Paull, 2007). Dies bedeutet, dass 53BP1 tatsächlich im Nibrin-Signalweg eine kompensierende Rolle spielt und wie hier in Kombination mit heterozygoter *ATM*-Mutation einen Pseudo-*NBN*-DSBR-Defekttyp ergibt.

Interaktionen zwischen ATM und Nibrin in der DSBR und Zellzykluskontrolle sind eindeutig nachgewiesen. Mehrere Studien konnten zeigen, dass Nibrin von ATM an Ser278 und Ser343 phosphoryliert wird (Difilippantonio and Nussenzweig, 2007; Gatei *et al.*, 2000; Lim *et al.*, 2000; Wu *et al.*, 2000; Zhao *et al.*, 2000). Weiterhin konnte nachgewiesen werden, dass Nibrin nicht nur ein Phosphorylierungssubstrat von ATM ist, sondern auch für die Dissoziation inaktiver ATM-Dimere benötigt wird, die Kinaseaktivität von ATM reguliert, C-

terminal mit ATM interagiert und für die Rekrutierung von ATM an DSBe verantwortlich ist (Difilippantonio *et al.*, 2005; Falck *et al.*, 2005; Lee and Paull, 2004; Lee and Paull, 2005). Die Autophosphorylierung von ATM an Ser1981 sowie die Phosphorylierung von ATM-Interaktionspartnern ist stark reduziert in *NBN*-defizienten Zellen (Carson *et al.*, 2003; Uziel *et al.*, 2003). Weiterhin weisen Zelllinien aus AT- und NBS-Patienten phänotypische Ähnlichkeiten wie Chromosomeninstabilität, Strahlensensitivität und Defekte in der Zellzykluskontrolle auf (Lee and Paull, 2007), die unter anderem mit drastischer Reduktion von Homologie-gerichteter DSBR assoziiert sind (Difilippantonio and Nussenzweig, 2007; Kurz and Lees-Miller, 2004). Entsprechend dieser wechselseitigen Interaktionen zwischen ATM und Nibrin in der DSBR konnten für die Zelllinien HA388, HA187 und HA202 mit *ATM*-Mutation infolge der Senkung von SSA eindeutige Übereinstimmungen mit dem *NBN*-Defektmuster nachgewiesen werden.

Einer Reihe von lymphoblastoiden Linien mit *ATM*-Mutation konnte nicht eindeutig ein etabliertes DSBR-Defekt-Muster zugeordnet werden. Die *ATM*-Mutation 1561delAG/R1875X der Zelllinie HA306 führte zu trunkierten, instabilen ATM-Proteinen (Sandoval *et al.*, 1999), denen die FAT-, Kinase- und FATC-Domäne fehlen (Lavin *et al.*, 2004). In der DSBR-Analyse konnte im Vergleich zu den Kontrollzelllinien ein dramatischer Anstieg von NHEJ und SSA/HR nachgewiesen werden, der eine Einteilung in den *BRCA1*- und *BRCA2*-DSBR-Defekttyp ermöglicht. Da ATM sowohl Brca1 als auch Brca2 über die nachgeschaltete Kinase Chk2 phosphoryliert und Brca1 und Brca2 beide fehlerhafte DSBR-Aktivitäten unterdrücken, sind Überschneidungen der Defektmuster möglich (Bahassi *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2004; Zhuang *et al.*, 2006). Zur konkreten Einteilung der *ATM*-Mutation in den *BRCA1*- oder *BRCA2*-DSBR-Defekttyp fehlt die Messung der fehlerfreien HR. Dies war aufgrund einer zu geringen Zellausbeute jedoch nicht möglich.

Die homozygote *ATM*-Mutation Y171X/Y171X der lymphoblastoiden Zelllinie HA126 und die homozygote *ATM*-Mutation 8068delT/8086delT der *ATM*-Defektlinie HA433 führten zur Expression von trunkierten, instabilen, im Western-Blot nicht nachweisbaren ATM-Proteinen. Die Einteilung in ein spezifisches DSBR-Defektmuster war aufgrund der widersprüchlichen Ergebnisse bezogen auf die Kontrollzelllinien nicht möglich. Während diese *ATM*-Defektlinien im Vergleich zu den Kontrollzelllinien 416MI und GM02253F durch signifikant verminderte SSA-Frequenzen dem *NBN/RAD50*-Defekttyp zugeordnet wurden, führte der Bezug auf HA169 infolge einer moderaten Erhöhung von SSA zur Einteilung in den *BRCA2*-Defekttyp.

Auffällig war, dass vor allem für *ATM*-Defektlinien, die durch Trunkierungsmutationen keinerlei *ATM*-Expression zeigten, die Einteilung in spezifische DSBR-Defektmuster erschwert war. Möglicherweise führt der Verlust des *ATM*-Proteins zu einer Neutralisierung der *ATM*-abhängigen gegenläufigen Prozesse, die NHEJ und SSA beim *BRCA1*- und *BRCA2*-DSBR-Defekttyp herauf-, oder beim *NBN*-DSBR-Defekttyp herabregulieren.

Interessanterweise konnten *ATM*-Mutationen, die ähnliche Trunkierungen hervorriefen, kein einheitliches Defektmuster zugeordnet werden. Die *ATM*-Defektlinien HA187 und HA306, die entsprechend ihrer Mutation *ATM*-Proteine ohne FAT-, Kinase- und FATC-Domäne aufwiesen wurden einerseits in den *NBN*- andererseits in den *BRCA1/2*-Defekttyp eingruppiert. Diesen Unterschieden in der DSBR-Aktivität liegen möglicherweise noch nicht identifizierte Mutationen in weiteren Reparatur-Faktoren zugrunde. Dies steht im Einklang mit der Erkenntnis, dass bisher ca. 70 % der Brustkrebs susceptibility gene mit geringer Penetranz noch nicht identifiziert sind (Szpirer and Szpirer, 2007). Diesbezüglich müssen weitere DSBR-Defektmuster mit der Kenntnis über neue Mutationen und Kombinationen aus Mutationen erstellt werden.

Des Weiteren sind die überlappenden Funktionen, Interaktionen und Abhängigkeiten von *ATM*, *ATR* und *DNA-PKcs* im Hinblick auf DSBR-Mechanismen und Zellzykluskontrolle vielfältig und stark diskutiert (Callen *et al.*, 2009; Stucki and Jackson, 2006; Yang *et al.*, 2003). Somit kann *DNA-PKcs* in Abwesenheit von *ATM* *H2AX* phosphorylieren, in Anwesenheit von *ATM* jedoch nicht, so dass *ATM* offensichtlich die Funktion von *DNA-PKcs* teilweise physikalisch blockiert (Stucki and Jackson, 2006). Des Weiteren wurde gezeigt, dass lediglich 25 % der DSBe die *ATM*-Signalkaskade für die Reparatur benötigen, wobei *ATM* lediglich für die DSBR im Heterochromatin notwendig ist, während die Reparatur im Euchromatin unabhängig von *ATM* abläuft (Goodarzi *et al.*, 2008). Aufgrund dieser Erkenntnisse ist es von großer Bedeutung im nächsten Schritt die genauen Funktionen der Reparaturkomplexe im Chromatinkontext und somit unter Berücksichtigung der Zugänglichkeit der DSBe zu untersuchen.

Da die Untersuchung der Mutationen auf DSBR-Aktivitäten beruht und diese zum Teil Zellzyklus-abhängig ablaufen, wurde in dieser Arbeit zusätzlich die Zellzyklusverteilung der Defekt- und Kontrollzelllinien bestimmt, um mögliche Zellzyklus-relevanten Einflüsse auf die DSBR zu untersuchen. Während NHEJ und SSA nicht vom Zellzyklus reguliert werden, läuft die HR nur in der späten S-/G2-Phase ab (Mao *et al.*, 2008; Valerie and Povirk, 2003).

Demzufolge ist die Verteilung zwischen G1- versus S-/G2-Phase für die DSBR-Aktivitäten von großer Bedeutung. Die lymphoblastoiden Kontrollzelllinien 416MI, GM02253F und HA169 wiesen im Mittel einen G1-Anteil von 60 % sowie einen S-/G2-Anteil von 40 % auf. Interessanterweise konnte weder der G1-Anteil von 76 % in der *RAD50*-Defektlinie HA239, noch der G1-Anteil von 74 % in der *CHEK2*-Defektlinie HA455 mit einer Verminderung der HR in Verbindung gebracht werden. HA455 wies sogar eine drastische Erhöhung der HR auf. Die geringen G1-Anteile in HA204, HA101 und HA56 von 48-52 % führten wiederum nicht zu einer Erhöhung der HR-Frequenzen. Entsprechend dieser Erkenntnisse hat gemäß dieser Arbeit die Verschiebung von Zellpopulationen innerhalb des Zellzyklus keinen nennenswerten Einfluss auf die DSBR-Aktivität der Zellen.

Während für die Mutationen in *BRCA1*, *BRCA2*, *TP53*, *NBN* und *RAD50*, die direkt in die DSBR involviert sind, eindeutige Defektmuster erstellt werden konnten, wurden für Mutationen in den übergeordneten Faktoren *ATM* und *CHEK2* keine spezifischen Muster an DSBR-Aktivitäten detektiert. Dennoch konnten 9 von insgesamt 14 Zelllinien aus Patienten mit *ATM*- und/oder *CHEK2*-Mutationen vollständig oder über Teileffekte den etablierten Mustern zugeordnet werden. Somit ist es mit diesem *EGFP*-basierten DSBR-Testsystem möglich, Mutationen in bisher untersuchten sieben von zehn Brustkrebs susceptibilitäts genen über DSBR-Aktivitäten zu erfassen. Aus all diesen Beobachtungen lässt sich ein vereinfachtes Schema zur Hierarchie der Genauigkeitskontrolle in der DSBR ableiten (siehe Abb. 55), in dem die Wechselwirkungen der in dieser Arbeit untersuchten Brustkrebs susceptibilitäts gene zusammengefasst werden.

Um die in dieser Arbeit postulierten Signalwege und deren Auswirkungen auf die DSBR zu überprüfen, müssten in weiterführenden Analysen die *ATM*-Substratphosphorylierungsmuster untersucht werden. Des Weiteren müsste überprüft werden, ob das beobachtete DSBR-Defektmuster in den *ATM*-Defektlinien allein auf die *ATM*-Dysfunktion oder auf Fehlfunktionen weiterer Faktoren zurückzuführen ist. Diesbezüglich könnte durch Rekonstituierung von wtATM in den untersuchten *ATM*-Defektzelllinien die Aktivität von *ATM* auf die DSBR untersucht werden. Geht der beobachtete DSBR-Defekt dabei verloren, wäre dieser somit *ATM*-abhängig.

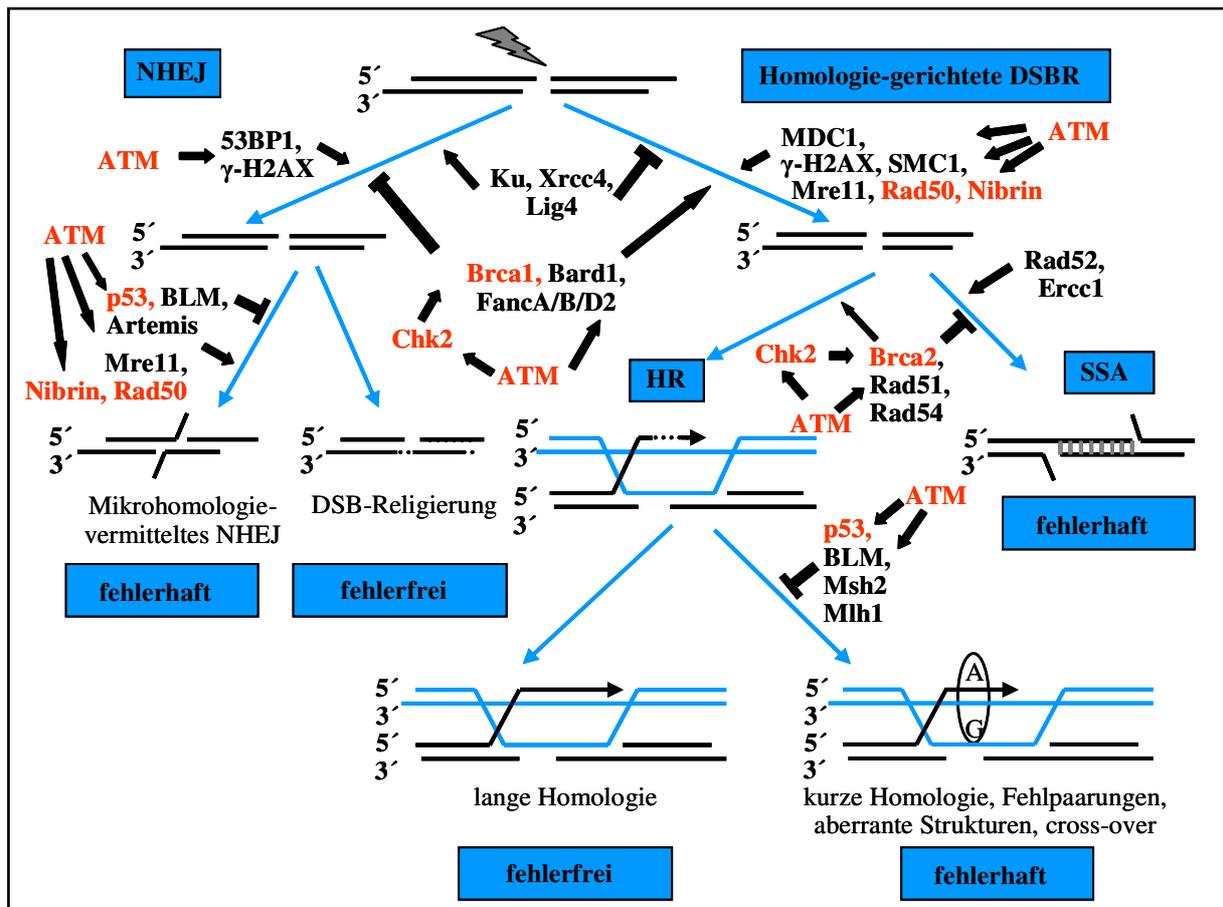


Abb. 55 Hierarchie der Genauigkeitskontrolle in der DSBR

Nach der Entstehung eines DSBes im Genom wird der DSBR-Weg durch die Kaskade von Überwachungs-faktoren bestimmt. Auf der ersten Stufe kanalisiert Brca1 mit Unterstützung der Fanc-Proteine die DSBR in Richtung Homologie-gerichtete Reparatur, wodurch Mutationen durch NHEJ vermieden werden. Auf der zweiten Stufe fördert Brca2 die konservative HR versus nicht-konservatives SSA. P53 diskriminiert ähnlich wie MSH2 und MLH1 zwischen divergierenden Sequenzen und wirkt NHEJ entgegen. ATM reguliert direkt und indirekt Überwachungs- und DSBR-Faktoren auf verschiedenen Ebenen.

5.6 Anwendung der etablierten DSBR-Defektmuster auf primäre Zellen aus Brusttumorgewebe und Lymphozyten aus denselben Brustkrebspatientinnen

In einem weiteren Teil der Arbeit wurden DSBR-Aktivitäten von primären Zellen aus Brusttumorgewebe und Lymphozyten aus denselben Brustkrebspatientinnen detektiert. Über ein vielschichtiges Verfahren konnten primäre Epithel-, EMT-Zellen und Fibroblasten aus Brusttumorgewebe isoliert und durch morphologische Eigenschaften und immunhistochemische Analysen charakterisiert werden (Keimling *et al.*, 2008). Die Epithelzellen wurden durch die Expression von EMA und Cytokeratin 8/18 identifiziert, während die Fibroblasten durch den mesenchymalen Marker Vimentin bei Abwesenheit von EMA und Cytokeratin 8/18 nachgewiesen wurden. Zellen, die neben der epithelialen Ausprägung zusätzlich den mesenchymalen Marker Vimentin exprimierten, wurden infolge

ihrer epithelialen-mesenchymalen Transition als EMT-Zellen deklariert (Kang and Massague, 2004; Rodriguez-Pinilla *et al.*, 2007; Vincent-Salomon and Thiery, 2003). Aus 47 Brusttumoren wurden insgesamt 16 Epithel-, 16 EMT- und 30 Fibroblastenkulturen isoliert und kultiviert. Für 27 der betroffenen Brustkrebspatientinnen konnten zusätzlich primäre Lymphozyten aus dem Blut isoliert und jeweils die DSBR-Aktivität der Zellen ermittelt werden. Für diese Analyse wurden die DSBR-Substrate zur Detektion von NHEJ, SSA/HR sowie HR und das pCMV-I-SceI-Expressionsplasmid durch Nukleofektion in die Zellen eingeführt. Die Rekonstitution von *wtEGFP* ermöglichte die Untersuchung der unterschiedlichen DSBR-Mechanismen (Akyüz *et al.*, 2002). Um die Vergleichbarkeit der Messungen zwischen verschiedenen Messtagen sicherzustellen, wurden die Kontrollzelllinien MCF12a und MDA-MB-157 mitgeführt.

Zusätzlich wurden die Folgen der DNA-Schadwirkung nach Bleomycininkubation in den primären Epithel- und EMT-Zellen des Tumormaterials durch Immunfluoreszenzanalysen mit dem Antikörper gegen das phosphorylierte Histon H2AX, γ H2AX, untersucht. Das phosphorylierte H2AX dient dabei als Schadensmarker, da nach verschiedenen DSB-auslösenden Behandlungen eine Phosphorylierung von H2AX an Orten des DNA-Schadens beobachtet wurde (Rogakou *et al.*, 1999). Verschiedene Untersuchungen konnten aufzeigen, dass γ H2AX innerhalb von wenigen Minuten in distinkten Foci im Kern, am Ort des DSBes, akkumuliert (Downs *et al.*, 2000; Furuta *et al.*, 2003; Rogakou *et al.*, 1999; Rogakou *et al.*, 1998).

Um die Vergleichbarkeit der γ H2AX-Focianalysen sicherzustellen, wurden an jedem Messtag die Kontrollzelllinien MCF12a und MCF7 mitgeführt. In diesen Zellen ließen sich nach Bleomycinbehandlung intensiv gefärbte, große, punktförmige γ H2AX-immunreaktive Foci im Kern detektieren. Aus der Akkumulation der γ H2AX-Foci nach Bleomycininkubation lässt sich das Ausmaß der durch Bleomycin induzierten DSBe ableiten (Dutta *et al.*, 2005; Sikic, 1986). Die Ergebnisse der quantitativen Bildanalyse demonstrierten, dass diese Kontrollzelllinien Bleomycin-induzierte DSBe nach einer Regenerationszeit effizient reparieren konnten. H2AX wird dabei unter anderem von ATM phosphoryliert, wobei ATM an phosphoryliertem γ H2AX-markierten DSBen verbleibt um weitere H2AX-Moleküle zu phosphorylieren. Phosphoryliertes H2AX ist essentiell für die fortwährende Akkumulation von MDC1 und RNF8 an DSBen, die wiederum für die Rekrutierung vom Brca1-Rap80-Komplex, 53BP1 und von anderen *Checkpoint*-Proteinen notwendig sind (Huen *et al.*, 2007). Die Erhöhung der γ H2AX-Focianzahl in MCF7-Zellen während der Reinkubationszeit in unbehandelten Kontrollproben deutet auf eine Akkumulation von endogenen DNA-Schäden

hin. Die starke Zunahme könnte auf hohen Replikationsstress in diesen Zellen hinweisen. Diesbezüglich konnte bereits gezeigt werden, dass humane Tumorzellen erhöhte Gehalte an endogenen DNA-Schäden aufweisen, die vorwiegend durch Replikations- und Transkriptionsfehler generiert werden (Chanoux *et al.*, 2009). Weiterhin könnte die Zunahme der Brüche in der Regenerationsphase durch die Umwandlung von Einzelstrangbrüchen in DSBe an der Replikationsgabel in proliferierenden Zellen erklärt werden (Kuefner *et al.*, 2009; Yin and Bassing, 2008; Ying *et al.*, 2009).

Beim Vergleich der DSBR-Frequenzen in primären Zellen aus Brusttumorgewebe und den Lymphozyten aus dem Blut der jeweiligen Brustkrebspatientin konnten die primären Zellen von 14 Tumormaterialien dem *BRCA1*-DSBR-Defektmuster zugeordnet werden. Beispielhaft wurde die Charakterisierung der primären Zellen aus dem Tumormaterial B1926/08 und Blut derselben Patientin erläutert, bei denen sowohl in EMT-Zellen, Fibroblasten als auch Lymphozyten moderat erhöhte NHEJ-Aktivitäten detektiert wurden. Für SSA/HR-Aktivitäten an kurzen Homologien wurden in Fibroblasten und in Lymphozyten ebenfalls Erhöhungen detektiert und auch für SSA/HR an langen Homologien in Lymphozyten. Hierbei ist von Bedeutung, dass mit den SSA/HR-Konstrukten nach transienter Transfektion überwiegend SSA nachgewiesen wird (Akyüz *et al.*, 2002). Beim Vergleich der DSBR-Frequenzen mit den bereits etablierten DSBR-Defektmustern in den humanen immortalisierten Lymphozytenzelllinien konnte in HA166 und HCC1937BL, also bei den Zelllinien mit *BRCA1*-Mutation, nach Verwendung der gleichen *EGFP*-basierten DNA-Substrate ebenfalls ein Anstieg an NHEJ- und SSA-Aktivitäten detektiert werden. Infolge dieser Übereinstimmung wurden die primären Zellen aus dem Tumormaterial B1926/08 und die primären Lymphozyten der gleichen Patientin dem *BRCA1*-Defekttyp zugeordnet. Die Erhöhung von Mikrohomologie-gerichtetem NHEJ und mutagenem SSA in den primären Zellen des Tumors und den primären Lymphozyten der Brustkrebspatientin deuteten auf eine *BRCA1*-Mutationsträgerin hin, da sich die Defekte in der DSBR auch in den peripheren Lymphozyten widerspiegeln (Jasin, 2002; Keimling *et al.*, 2008; Parshad and Sanford, 2001; Stark *et al.*, 2004). Alternativ könnten Mutationen auch in anderen Genen des *Brc1*-Reaktionsweges existieren und so den gleichen Phänotyp hervorrufen. Tatsächlich wurde in einer erblich, mit erhöhtem Risiko vorbelasteten Brustkrebspatientin in unserem Labor eine charakteristische Erhöhung von NHEJ und SSA nachgewiesen, obwohl trotz Totalsequenzierung der Gene *BRCA1* und *BRCA2* keine Mutationen in diesen Genen vorlag (Keimling *et al.*, 2008).

Die Folgen der DNA-Schadwirkung nach Bleomycinbehandlung wurden in den EMT-Zellen aus dem Tumormaterial B1926/08 mit dem Antikörper gegen das phosphorylierte Histon H2AX, γ H2AX, untersucht. Nach Behandlung der EMT-Zellen mit Bleomycin konnte direkt nach der Schadeinwirkung eine Akkumulation der γ H2AX-Foci im Kern detektiert werden, die nach einer Regenerationsphase weiter anstieg. Aus diesen Beobachtungen kann abgeleitet werden, dass die Bleomycin-induzierten DSBe in den primären EMT-Zellen nicht effizient repariert werden können und ein DSBR-Defekt vorliegt. Dieser scheinbare Widerspruch zur Zunahme des Mikrohomologie-gerichteten NHEJ und SSA im *EGFP*-basierten DSBR-Testsystem erklärt sich damit, dass Bleomycin als radiomimetrisches Agens DSBe ins Genom einführt, welche zum größten Teil über fehlerfreies NHEJ repariert werden. Damit konnte für die EMT-Zellen aus dem Tumormaterial B1926/08 sowohl mit der DSBR-Messung wie mit der γ H2AX-Auswertung ein DSBR-Defekt klassifiziert werden, der mit der Rolle von Brca1 als Aktivator von fehlerfreiem und Antagonist von fehlerhaftem NHEJ einhergeht (Durant and Nickoloff, 2005; Gudmundsdottir and Ashworth, 2006). Während die γ H2AX-Immunfluoreszenzanalyse jedoch nur die Akkumulation von DSBen detektiert (Downs *et al.*, 2000; Furuta *et al.*, 2003; Rogakou *et al.*, 1999; Rogakou *et al.*, 1998), kann mit dem *EGFP*-basierten DSBR-Testsystem die genaue DSBR-Dysfunktion in den jeweiligen Zellen klassifiziert werden (Akyüz *et al.*, 2002; Keimling *et al.*, 2008) und so eine Aussage über die zugrundeliegenden genetischen Veränderungen von DSBR-Faktoren getroffen werden.

Die Analyse der DSBR-Aktivität in Zellen aus dem Tumormaterial G1676/06 zeigte in Epithelzellen eine moderate Erhöhung der fehlerhaften NHEJ-Frequenzen auf, während weder für die Fibroblasten noch für die Lymphozyten der Brustkrebspatientin Abweichungen für NHEJ und SSA im Vergleich zu den ermittelten Medianwerten detektiert wurden. Bei der Etablierung der DSBR-Defekttypen konnten in allen *BRCA1*-mutierten Zelllinien Erhöhungen von NHEJ beobachtet werden (Keimling *et al.*, 2008). Für eine genaue Einteilung dieses Tumors fehlt zwar die Messung der HR, trotzdem ist aufgrund des NHEJ-Anstieges ein *BRCA1*-DSBR-Defektmuster am wahrscheinlichsten. Hierzu kommt, dass infolge zu geringer Zellzahl nicht für alle primären Zellen aus Tumormaterial HR-Aktivitäten analysiert werden konnten. Da die Steigerung der mutagenen NHEJ-Frequenzen nur in den Epithelzellen, nicht aber in den Fibroblasten oder Lymphozyten detektiert wurde, könnte der Defekt demzufolge auf eine erst in den Epithelzellen des Tumors G1676/06 entstandene *BRCA1*-Mutation oder eine Brca1-Expressionssenkung zurückzuführen sein. In diesem Zusammenhang ist interessant, dass 30-40 % aller sporadischen Brusttumore verminderte Brca1 mRNA- und

Proteingehalte im Vergleich zu normalem Brustgewebe exprimieren. In diesen Fällen korrelieren die Tumore nicht mit einer Mutation im *BRCA1*-Gen, sondern sind mit Hypermethylierung des *BRCA1*-Promotors assoziiert (Rosen *et al.*, 2003).

Beim Beispiel der primären Epithelzellen aus dem Tumormaterial B1905/08 und der Lymphozyten aus derselben Brustkrebspatientin wurden moderate Erhöhung der SSA/HR-Aktivitäten ohne Erhöhung des NHEJ detektiert, die im Einklang mit den Erhöhungen von SSA in den lymphoblastoiden Zelllinien HA238 und GM13023A mit *BRCA2/FANCD1*-Mutation standen (Jasin, 2002; Keimling *et al.*, 2008; Tutt *et al.*, 2001). Für die HR wurde in den Epithelzellen keine Senkung nachgewiesen. Da für die HR in den primären Zellen sehr große Schwankungen vorlagen, die Werte nahe der Nachweisgrenze lagen und in diesem Bereich eine Abnahme nicht mehr zu detektieren war, wurde die DSBR-Frequenz der HR für die Einteilung der primären Zellen des Tumormaterials B1905/08 in ein DSBR-Defektmuster nicht als Kriterium verwendet. Anhand der Erkenntnisse, dass die DSBR-Muster in den primären Zellen des Tumors und in den Lymphozyten übereinstimmten, wurden die DSBR-Aktivitäten der primären Zellen dem hereditären *BRCA2*-Defektmuster zugeordnet, d.h. es ist von einer genetischen Veränderung im *Brca2*-Reaktionsweg auszugehen. Insgesamt ermöglichte die Anwendung des *EGFP*-basierten DSBR-Testsystems auf die primären Zellen aus Brusttumorgewebe und Lymphozyten aus dem Blut der jeweiligen Brustkrebspatientin die Zuordnung von drei Brusttumoren zum *BRCA2*-DSBR-Defektmuster.

Die Immunfluoreszenzanalyse der Epithelzellen aus dem Tumormaterial B1905/08 nach Bleomycininkubation zeigte eine zeitlich verzögerte Akkumulation von γ H2AX-Foci auf. Erst nach der Regenerationsphase von 24 h wurde eine Anhäufung von distinkten γ H2AX-Foci im Kern der Epithelzellen detektiert. Da ein Defekt in der H2AX-Phosphorylierung selbst unwahrscheinlich ist, da mehrere Faktoren (ATM, ATR, DNA-PKcs) H2AX phosphorylieren (Yang *et al.*, 2003), kann daraus abgeleitet werden, dass Bleomycin-induzierte DNA-Strangbrüche und weitere Schäden und/oder zum Anhalten der Replikationsgabeln führten. Die Überbrückung der durch DNA-Schäden angehaltenen Replikationsgabeln benötigt die HR-Maschinerie, so dass diese Beobachtung mit der zentralen Rolle von *Brca2* in der HR konsistent ist (Ying *et al.*, 2009). Damit konnte für die Epithelzellen des Tumormaterials B1905/08 durch die Immunfluoreszenzanalyse und DSBR-Messung ein DSBR-Defekt detektiert werden.

Die DSBR-Frequenzen in den Fibroblasten aus dem Tumormaterial B4841/08 und den primären Lymphozyten der Brustkrebspatientin wiesen moderate Senkungen für NHEJ und SSA auf. Die Senkungen von SSA und partiell auch von NHEJ stehen im Einklang mit den DSBR-Ergebnissen zu den lymphoblastoiden, immortalisierten *NBN*- und *RAD50*-Defektlinien HA226 und HA239. Entsprechend dieser Übereinstimmung wurde der Tumor B4841/08 dem *NBN/RAD50*-DSBR-Defekttyp zugeordnet. Die Tatsache, dass die Senkungen der DSBR-Aktivitäten sowohl im Tumorgewebe wie auch in den Lymphozyten der Brustkrebspatientin detektiert wurden, lässt die Vermutung zu, dass es sich in diesem Fall um eine vererbte *NBN/RAD50*-Mutation oder eine andere Mutation in diesem Signalweg handelt. Insgesamt konnten durch die Anwendung des *EGFP*-basierten DSBR-Testsystems sieben Brusttumoren zum *NBN/RAD50*-DSBR-Defektmuster zugeordnet werden. Interessanterweise wurde in den primären Epithelzellen des Tumors B4841/08 eine Erhöhung der DSBR vor allem für HR und SSA festgestellt. Insbesondere die Erhöhung der HR könnte auf eine nachträglich im Tumor erworbene *TP53*-Mutation in den Epithelzellen hinweisen (Akyüz *et al.*, 2002; Gatz and Wiesmüller, 2006).

Die aus der Immunfluoreszenzanalyse gewonnenen Daten zeigten für die Epithelzellen des Tumors B4841/08 nach Bleomycininkubation zunächst einen Anstieg der γ H2AX-Focianzahl. Die nach der Regenerationsphase detektierte Senkung der γ H2AX-Focianzahlen lassen auf eine Reduktion von DSBen schließen. Folglich waren diese Epithelzellen befähigt künstlich generierte DSBe effizient zu reparieren. Interessanterweise wird per γ H2AX-Analyse vorwiegend fehlerfreies NHEJ nachgewiesen (Riballo *et al.*, 2004), während in unserem Testsystem Mikrohomologie-gerichtetes NHEJ und Homologie-gerichtete DSBR-Formen detektiert werden (Akyüz *et al.*, 2002). Die Diskrepanz zwischen der Senkung der NHEJ-Frequenzen mit dem *EGFP*-basierten DSBR-Testsystem und der Reparatur-profizienten Aussage der γ H2AX-Analyse beruht daher möglicherweise auf der Detektion verschiedener DSBR-Wege. Andererseits wird der MRN-Komplex sowohl für fehlerfreies wie auch fehlerhaftes NHEJ benötigt (Dinkelmann *et al.*, 2009), womit die unterschiedliche Aussage in Bezug auf NHEJ nicht eindeutig erklärt werden kann. Da die Reduktion von Homologie-gerichteter Reparatur mit der γ H2AX-Analyse kaum nachweisbar ist, scheint das *EGFP*-basierte Testsystem für die Detektion dieses DSBR-Defekttypes besser geeignet zu sein.

Andererseits wurde in den Epithelzellen, die für die γ H2AX-Analyse verwendet wurden, eine Steigerung von SSA und HR detektiert, die möglicherweise auf eine im Tumor zusätzlich erworbene *TP53*-Mutation hindeuten. In diesem Zusammenhang konnte für *TP53*-Mutationen

eine DSBR-steigernde Wirkung publiziert werden (Akyüz *et al.*, 2002; Keimling and Wiesmüller, 2009), die möglicherweise die Reduktion der γ H2AX-Focianzahlen bewirkt.

In den Epithelzellen des Tumormaterials B12666/07 konnten für NHEJ und SSA keine Veränderungen der DSBR-Frequenzen im Vergleich zu den Kontrollwerten ermittelt werden. Die moderate Erhöhung der HR deutete jedoch auf eine *TP53*-Mutation in diesen Zellen hin (Akyüz *et al.*, 2002; Gatz and Wiesmüller, 2006; Keimling and Wiesmüller, 2009). Denn gemäß der publizierten Daten wurden in 20-40 % aller sporadischen Brustkarzinome genetische Veränderungen in *TP53*-Gen detektiert (Borresen-Dale, 2003). Die Anwendung des *EGFP*-basierten DSBR-Testsystems ermöglichte insgesamt die Zuordnung von drei Brusttumoren zum *TP53*-DSBR-Defektmuster. Das Mikrohomologie-gerichtete NHEJ in den primären Lymphozyten der Brustkrebspatientin mit Tumor B12666/07 zeigte eine deutliche Reduktion. Eine derartige Senkung der NHEJ-Frequenzen wurde partiell für *NBN*-Mutationen analysiert (Howlett *et al.*, 2006; Sakamoto *et al.*, 2007; Tauchi *et al.*, 2002; Yang *et al.*, 2006). Die für eine eindeutige Charakterisierung notwendige Detektion von SSA war infolge einer zu geringer Zellausbeute für die Lymphozyten dieser Brustkrebspatientin jedoch nicht möglich. Insgesamt könnten die Reparaturdefekte in der Brustkrebspatientin mit Tumor B12666/07 durch eine Mutation im *NBN*-Signalweg und einer im Tumor nachträglich erworbenen Mutation im *TP53*-Gen oder -Signalweg erklärt werden.

Die Immunfluoreszenzanalyse der primären Epithelzellen des Tumors B12666/07 deutete infolge der nach Bleomycininkubation nachhaltig, also auch nach 24 h Reinkubation, erhöhten γ H2AX-Focianzahl auf einen DSBR-Defekt hin. Interessanterweise wurde auch für unbehandelte Zellen nach der Regenerationszeit eine dramatische Erhöhung der γ H2AX-Focianzahl detektiert. Wie bereits erwähnt könnte die erhöhte γ H2AX-Focianzahl vor allem auf verstärkten Replikationsstress in diesen Zellen hinweisen. In diesem Zusammenhang wurde bereits gezeigt, dass humane Tumorzellen erhöhte Gehalte an endogenen DNA-Schäden aufweisen, die vorwiegend durch Replikations- und Transkriptionsfehler generiert werden (Bartkova *et al.*, 2005; Chanoux *et al.*, 2009; Gorgoulis *et al.*, 2005).

Die γ H2AX-Focianalysen der Epithelzellen der Tumore B12666/07 und B4841/08 zeigten interessanterweise keine einheitlichen γ H2AX-Focireparaturdaten. Diesbezüglich könnte der veränderte Replikationsstress der Zellen, als eine mögliche Fehlerquelle der γ H2AX-Focianalyse, das γ H2AX-Muster beeinflussen.

Die Einteilung der primären Zellen in die *BRCA1*-, *BRCA2*-, *TP53*- und *NBN/RAD50*-DSBR-Defekttypen basierte auf den zuvor an Zelllinien mit definiertem Genotyp etablierten DSBR-Defektmustern. Zur Überprüfung dieser Klassifizierung fehlen jedoch derzeit die DNA-Sequenzierungen der untersuchten Gene und Analysen der Protein- bzw. RNA-Gehalte, um die spezifischen Mutationen bzw. Veränderungen im Expressionsniveaus zu analysieren. Für einen Großteil der untersuchten Tumormaterialien und Lymphozyten der Brustkrebspatientinnen konnten DNA-Proben gewonnen werden, die somit für weiterführende Untersuchungen zur Verfügung stehen.

Die DSBR-Messungen der primären Zellen aus Brusttumorgewebe und Lymphozyten der entsprechenden Brustkrebspatientinnen verdeutlichten auch, dass die DSBR-Ergebnisse der primären Epithel- und EMT-Zellen am besten für die Einteilung in die entsprechenden DSBR-Defekttypen geeignet waren. Die Untersuchungen der DSBR-Aktivitäten der tumorbildenden Epithelzellen bzw. EMT-Zellen allein ermöglichte jedoch keine Aussagen über putativ hereditäre DSBR-Defektmuster, da diese sowohl auf erbliche als auch auf epigenetische Faktoren zurückzuführen wären. Interessanterweise konnten auch für Fibroblasten und Lymphozyten der Brustkrebspatientinnen eindeutige Effekte in den DSBR-Aktivitäten detektiert werden, womit die zusätzliche Messung dieser Zellen die Einteilung in putativ hereditäre DSBR-Defektmuster ermöglichte. Weiterhin konnten mit dem *EFGP*-basierten DSBR-Testsystem über 50 % der Brustkrebspatientinnen, für welche die DSBR-Aktivitäten von Epithel- bzw. EMT-Zellen und Fibroblasten bzw. Lymphozyten detektiert wurden (11 von 20), putativ hereditäre DSBR-Defektmuster zugewiesen werden. Im Gegensatz dazu sind laut Literatur lediglich 10-25 % der Brustkrebserkrankungen hereditär bedingt (Ralhan *et al.*, 2007; Szpirer and Szpirer, 2007). Demzufolge ist für weiterführende Studien die Messung der DSBR-Aktivitäten von Epithel- bzw. EMT-Zellen als auch von Fibroblasten bzw. Lymphozyten aus dem Blut der Patientinnen notwendig, um zwischen putativ erblichen und epigenetischen Risikofaktoren unterscheiden zu können.

Die vergleichende Untersuchung der DSBR-Aktivitäten und der durch die γ H2AX-Analyse ermittelten Reparaturkapazität der Zellen nach Bleomycinschadwirkung deutete auf eine große Übereinstimmung beider Methoden hin. Für die Epithelzellen konnte für NHEJ, SSA mit langer Homologie und HR eine 70 %ige Übereinstimmung, für die EMT-Zellen zumindest für NHEJ und HR eine 70-80 %ige Übereinstimmung der DSBR-Frequenzen mit der Reparaturkapazität der Zellen nach Bleomycinschadwirkung ermittelt werden.

Bei der Kombination aller DSBR-Formen (oder auch nur NHEJ und HR) lagen für 90 % der Epithelzellen und 100 % der EMT-Zellen Korrelationen von zumindest einem Reaktionsweg der DSBR mit der Reparaturkapazität nach Bleomycinschadwirkung vor. Somit konnten die mit dem *EGFP*-basierten DSBR-Testsystem detektierten DSBR-Defektmuster in Epithel- und EMT-Zellen mit der γ H2AX-Analyse größtenteils bestätigt werden. Diskrepante Aussagen, die zum Teil mit dem *EGFP*-basierten DSBR-Testsystem und der γ H2AX-Analyse gemacht wurden, könnten unter anderem auf der Messung unterschiedlicher DSBR-Wege beruhen. Während mit dem *EGFP*-basierten DSBR-Testsystem Mikrohomologie-gerichtetes NHEJ nachgewiesen wurde (Akyüz *et al.*, 2002), wird über die γ H2AX-Analyse zu 80-90 % fehlerfreies NHEJ detektiert (Riballo *et al.*, 2004). Infolge dessen könnte die γ H2AX-Analyse jedoch nützlich sein, um Informationen über das, mit unserem Testsystem nicht detektierbare fehlerfreie NHEJ zu liefern. Mit der Kombination beider DSBR-Nachweisverfahren könnten folglich alle DSBR-Wege detektiert werden. Die γ H2AX-Analyse liefert die Aussagen zu fehlerfreiem NHEJ (Riballo *et al.*, 2004), während mit dem *EGFP*-basierten DSBR-Testsystem das Spektrum an Mikrohomologie-gerichtetem NHEJ, SSA und HR analysiert wird (Akyüz *et al.*, 2002).

Die Ermittlung der DSBR-Aktivitäten in den primären Zellen aus Mammakarzinomen und Lymphozyten aus dem Blut der Brustkrebspatientinnen und verbunden damit die Charakterisierung spezifischer DSBR-Defekte ermöglicht einerseits die Identifizierung von Brustkrebsrisiko über die Verwendung dieses *EGFP*-basierten DSBR-Testsystems. Andererseits könnte durch die Ermittlung von DSBR-Defekten die Anwendbarkeit spezifischer Therapieformen für die Eliminierung der Brusttumorzellen geprüft werden. In diesem Zusammenhang ist bekannt, dass zum Beispiel *BRCA2*-defiziente Tumorzellen durch die Verwendung von PARP-Inhibitoren gezielt abgetötet werden können (Bryant *et al.*, 2005; Farmer *et al.*, 2005; O'Connor *et al.*, 2007). Die Abwesenheit von PARP1 verursacht Basenexzisions-Reparatur-Defekte. Diese führen zu Einzelstrangbrüchen in der DNA und schließlich zum Kollaps der Replikationsmaschinerie beim Auftreffen auf die Einzelstrangbrüche in der DNA-Matrize, was wiederum mit einem erhöhten Aufkommen von DSBen einhergeht. Da *BRCA2*-defiziente Zellen Defekte in der HR aufweisen, können die durch PARP-Inhibitoren induzierten DSBe an der Replikationsgabel nicht repariert werden und die Zelle stirbt. Diesbezüglich ist die Verwendung von PARP-Inhibitoren tumorspezifisch, da nur Tumore mit *BRCA2*-DSBR-Defekt adäquat behandelbar sind (Bryant *et al.*, 2005). Durch die Analyse der DSBR-Defekte von primären Zellen aus Tumorgewebe

bzw. von Lymphozyten aus dem Blut von Brustkrebspatientinnen mit dem *EGFP*-basierten DSBR-Testsystem könnte somit im Vorfeld die Ansprechbarkeit bestimmter Therapieformen vorhergesagt werden.

5.7 Anwendung des *EGFP*-basierten DSBR-Testsystems als diagnostischer Marker zur Brustkrebsrisikobewertung

Im folgenden Teil der Arbeit wurde die Anwendbarkeit des *EGFP*-basierten DSBR-Testsystems als diagnostisches Markersystem zur Detektion von erhöhtem Brustkrebsrisiko geprüft. Die Eignung des *EGFP*-basierten DSBR-Testsystems basiert auf der Erkenntnis, dass fehlerhafte DSBR-Aktivitäten die Brustkrebs susceptibility dramatisch erhöht und dass dieser Effekt in primären Lymphozyten von genetisch prädisponierten Frauen detektierbar ist (Rothfuss *et al.*, 2000; Speit and Trenz, 2004). Die Brustkrebsprädisposition von Frauen wurde bestimmt, indem die DSBR-Aktivitäten von primären Lymphozyten aus dem Blut von Familienmitgliedern mit hoher Brust- und Eierstockkrebswahrscheinlichkeit, von Brustkrebspatientinnen und Kontrollprobandinnen überprüft und analysiert wurde. Erste Hinweise für die Verwendbarkeit von peripheren Lymphozyten zur Detektion von Brustkrebs susceptibility konnte durch die Induktion von Mikronuklei in Lymphozyten von *BRCA1*-Mutationsträgern nach γ -Bestrahlung gezeigt werden (Rothfuss *et al.*, 2000). Eine weitere Studie verwies auf die abnormal hohen Frequenzen von Chromosomenbrüchen in bestrahlten G2-Phase-Zellen von Brustkrebspatientinnen im Vergleich zur Kontrollpopulation. Dabei wurden die veränderten DSBR-Aktivitäten in Lymphozyten von Frauen mit hereditären sowie sporadischen Mammakarzinomen detektiert (Parshad and Sanford, 2001). Entsprechend dieser Erkenntnisse wurden im Rahmen dieser Studie die DSBR-Aktivitäten der primären Lymphozyten von insgesamt 174 Brustkrebspatientinnen, 246 Kontrollprobandinnen sowie 35 Frauen aus Hochrisikofamilien mit dem *EGFP*-basierten DSBR-Testsystem überprüft. Interessanterweise konnte bereits ohne Beachtung der Altersspektren eine signifikante Erhöhung des Mikrohomologie-gerichteten NHEJ zwischen Kontrollprobandinnen und Brustkrebspatientinnen sowie zwischen Kontrollen und Frauen aus Hochrisikofamilien detektiert werden. Die wesentlich höheren NHEJ-Frequenzen in Frauen mit familiärer Prädisposition zeigten deutlich die Verbindung zwischen fehlerhafter DSBR-Aktivität und Brustkrebs susceptibility auf, womit DSBR-Aktivitäten in Lymphozyten als Indikator für Brustkrebsprädisposition geeignet sind. Da die Brustkrebsinzidenz stark mit dem Alter korreliert (Batzler *et al.*, 2008), wurden zur besseren Vergleichbarkeit der zu untersuchenden Gruppen ein Altersbereich der 30 bis 59jährigen ausgewählt, in dem eine

repräsentative Anzahl von Individuen aus Hochrisikofamilien, Brustkrebspatientinnen und Kontrollprobandinnen enthalten waren. Dieser Altersbereich ist für die Bestimmung der Brustkrebsprädisposition sehr wichtig, da dieser sehr junge Patientinnen umfasst, bei denen das Mammakarzinom bereits vor dem mittleren Erkrankungsjahr von 63 Jahren aufgetreten ist und bei denen die sehr frühe Entstehung von Brustkrebs mit Defekten in der DSBR assoziiert ist (Jasin, 2002; Keimling *et al.*, 2008). In diesem Altersspektrum konnten ebenfalls signifikante Unterschiede des Mikrohomologie-gerichteten NHEJ zwischen Kontrollprobandinnen und Frauen mit Brustkrebs bzw. Mitgliedern aus Hochrisikofamilien ermittelt werden, womit hohe Frequenzen an fehlerhaftem NHEJ als Marker für Brustkrebsprädisposition vor allem auch für jüngere Frauen geeignet ist.

Als mögliche Vorstufen der Brustkarzinogenese stehen benigne Brustveränderungen wie Mikroverkalkung, Mastopathie, benignes Fibroadenom oder blutige Mamillensekretion unter genauerer ärztlicher Beobachtung und werden auf Malignität geprüft (Beckmann, 2005). In dieser Arbeit konnten primäre Lymphozyten von zehn Frauen mit benignen Brustläsionen gewonnen und die DSBR-Aktivitäten bestimmt werden. Für die relativen, auf 416MI bezogenen DSBR-Frequenzen in den primären Lymphozyten konnten für Mikrohomologie-gerichtetes NHEJ und SSA/HR mit ausreichender und verkürzter Homologielänge deutliche Erhöhungen bei Frauen mit benigner Brustläsion, Brustkarzinom und Frauen aus Hochrisikofamilien im Vergleich zur Kontrollpopulation detektiert werden, womit durch die Bestimmung der fehlerhaften DSBR-Aktivitäten auch Frühstadien der Brustkarzinogenese erfasst werden können. Interessanterweise konnten mit anderen Nachweisverfahren keine einheitlichen Resultate publiziert werden. In diesem Zusammenhang wurden weder für γ H2AX-Fociverteilung, Mikronukleustest noch Comet-Assay signifikante Unterschiede zwischen *BRCA1*-Mutationsträgerinnen und Kontrollprobandinnen ermittelt (Kotsopoulos *et al.*, 2007; Speit and Trenz, 2004). Infolge der Diskriminierung zwischen Brustkrebspatientinnen, Patientinnen mit benignen Brustkrebsläsionen, Familienmitgliedern aus Hochrisikofamilien und den Kontrollprobandinnen hat das *EGFP*-basierte DSBR-Testsystem aufgrund der quantitativen und qualitativen Bewertung von DSBR-Aktivitäten ein hohes Potential zur Abschätzung von Brustkrebserkrankungsrisiken durch prädisponierende Faktoren.

Da mit Zunahme des Alters die Akkumulation von DNA-Schäden (Morley *et al.*, 1982) und verbunden damit die Brustkrebsinzidenz ansteigt (Batzler *et al.*, 2008) wurden für die Brustkrebspatientinnen und Kontrollprobandinnen für jede Dekade soweit möglich eine

vergleichbare Anzahl an Personen rekrutiert und die DSBR-Aktivitäten der primären Lymphozyten gegenübergestellt. Für das Mikrohomologie-gerichtete NHEJ konnte sowohl für die Brustkrebspatientinnen wie für die Kontrollprobanden altersabhängig eine Senkung der DSBR-Aktivität ermittelt werden. Dies entspricht der Erkenntnis, dass NHEJ in alternden Zellen weniger effektiv abläuft (Gorbunova *et al.*, 2007; Seluanov *et al.*, 2004). Interessanterweise konnten bereits in verschiedenen Gewebearten altersabhängig drastische Senkungen der Ku70- und Ku80-Proteinmengen detektiert werden, die für den Rückgang der NHEJ-Frequenzen verantwortlich sind (Ju *et al.*, 2006; Seluanov *et al.*, 2007; Um *et al.*, 2003). Weiterhin wird diskutiert, dass auch die Verwendung der DSBR-Mechanismen altersabhängig reguliert wird, wobei eine Verschiebung von einfachen NHEJ-Prozessen in jungen Organismen hin zu Homologie-gerichteten DSBR-Mechanismen in älteren Individuen beobachtet wurde (Engels *et al.*, 2007; Preston *et al.*, 2006), wobei die HR in seneszenten Zellen nicht stattfindet (Gorbunova *et al.*, 2007). Die verminderte Effizienz von NHEJ und HR in alternden Zellen führt möglicherweise zu intensiver Nutzung von mutagenem SSA und damit zur altersabhängigen Akkumulation von genomischer Instabilität (Gorbunova *et al.*, 2007). Entgegen dieser Behauptung, wurde in Brustkrebspatientinnen und Kontrollprobandinnen für die Homologie-gerichtete Reparatur, hier überwiegend SSA, mit langer Homologielänge altersabhängig eine Senkung detektiert, wobei wie bereits bei NHEJ beobachtet, die Brustkrebspatientinnen höhere Frequenzen der mutagenen DSBR aufwiesen. Interessanterweise konnte jedoch bei der Verwendung der Homologie-gerichteten Reparatur mit kurzer Homologielänge ein leichter altersabhängiger Anstieg bei der Kontrollpopulation beobachtet werden. Möglicherweise werden im Alter kürzere Homologielängen für DSBR-Mechanismen bevorzugt. Aufgrund meiner Befunde und da die altersabhängige Verlagerung der DSBR-Mechanismen von NHEJ in Richtung Homologie-gerichtete DSBR bisher nur in *Drosophila* und nicht in Säugetieren untersucht wurden, sind jedoch weitere Analysen notwendig (Gorbunova *et al.*, 2007).

Neben dem Alter spielen weitere Risikofaktoren für die Entwicklung von Brustkrebs eine wichtige Rolle. Einige Faktoren sind stark mit der hormonellen Östrogen-Exposition einer Frau im Laufe ihres Lebens assoziiert. Darunter fallen frühe erste Menarche, späte Menopause, langfristige Hormonersatztherapie, hoher *Body-Mass-Index*, Kinderlosigkeit, oder Erstgeburt nach dem 30. Lebensjahr (Brinton *et al.*, 1988; MacMahon *et al.*, 1970; Rossouw *et al.*, 2002; Tretli, 1989; Trichopoulos *et al.*, 1972; Ursin *et al.*, 2002). Für die Östrogen-induzierte Brustkarzinogenese ist die Rezeptor-vermittelte Stimulierung der

Genexpression und Proliferation (Henderson *et al.*, 1982; Li and Li, 1984; Liehr, 2000; Pike *et al.*, 1993) sowie die genotoxische Wirkung notwendig, wobei die Genotoxizität von Östradiol durch metabolische Aktivierung verstärkt wird (Liehr, 1990; Liehr *et al.*, 1986). Dabei können Östrogenmetabolite kovalent an die DNA binden und DNA-Schäden initiieren (Bhat *et al.*, 1994; Liehr, 1990; Liehr *et al.*, 1986). Demnach führt die Östradiol-Exposition in kultivierten humanen Lymphozyten zu erhöhtem Schwesterchromatidaustausch (Djelic and Djelic, 2002; Kayikcioglu *et al.*, 2000). Entsprechend dieser Erkenntnisse zeigt die mit der Menopause einsetzende Senkung des Östrogenspiegels bei den Kontrollprobandinnen eine Senkung der mutagenen NHEJ- und SSA-Frequenzen in den primären Lymphozyten. Interessanterweise konnte in den Lymphozyten der Brustkrebspatientinnen keine Reduktion des Mikrohomologie-gerichteten NHEJ nach Eintritt der Menopause ermittelt werden. Diese Beobachtungen könnten auf Mutationen in DSBR-Genen zurückzuführen sein. Des Weiteren könnte die Reduktion der DSBR-Aktivität nach Eintreten der Menopause, in den Lymphozyten der Kontrollprobandinnen, auch mit der generellen altersabhängigen Senkung der DSBR-Aktivitäten einhergehen (Gorbunova *et al.*, 2007; Seluanov *et al.*, 2004). Andererseits zeigten auch die Brustkrebspatientinnen eine altersabhängige Senkung der DSBR-Aktivitäten, wobei die Menopause keinen Einfluss auf die NHEJ-Frequenzen hatte. Dies verdeutlicht, dass für die Kontrollgruppe eine Senkung der Östrogenniveaus mit einer Reduktion der fehlerhaften DSBR-Aktivitäten einhergeht, während für Brustkrebspatientinnen die Herunterregulierung der mutagenen DSBR-Aktivitäten nicht mehr möglich scheint, bzw. keinem hormonellen Einfluss unterliegt. Der für die Kontrollen wesentlich markantere Einfluss der Menopause auf die SSA-Frequenzen geht einher mit der bereits besprochenen altersabhängigen Reduktion der DSBR-Aktivität, die auch für die Brustkrebspatientinnen diagnostiziert wurde (Gorbunova *et al.*, 2007; Seluanov *et al.*, 2004). Letztendlich führt eine früh einsetzende Menarche bzw. späte Menopause durch Verlängerung der genotoxischen Östrogen-Expositionszeit (Bernstein, 2002) möglicherweise durch die Akkumulation von DNA-Schäden und Mutationen in DSBR-Faktoren, in Kombination mit verstärkt ablaufender, fehlerhafter DSBR zu einer Erhöhung des Brustkrebsrisikos.

Um den Einfluss der Nulliparität auf die DSBR-Aktivität zu untersuchen, wurden die DSBR-Frequenzen von Frauen ohne Kinder versus Frauen mit eigenen Kindern untersucht. Die Ergebnisse zeigten einen deutlichen Anstieg der Frequenzen an Mikrohomologie-gerichtetem NHEJ in den Lymphozyten von Frauen ohne Kinder im Vergleich zu Frauen mit Kindern. Möglicherweise führt die veränderte Ansprechbarkeit von Zellen auf Östrogen nach der

Geburt bzw. die verminderte Zirkulierung von Östrogen im Blut während der Schwangerschaft (Dumitrescu and Cotarla, 2005; Sivaraman and Medina, 2002) zur Senkung seiner genotoxischen Wirkung (Liehr, 2000) und damit verbunden zu einer Reduktion der fehlerhaften, mutagenen DSBR-Aktivität und Karzinogenese.

Neben der hormonellen Östrogen-Exposition spielen weitere im Gail-Modell (Gail *et al.*, 1989) verankerte Risikofaktoren eine wichtige Rolle für die Brustkarzinogenese. Unter anderem konnte eine eindeutige Assoziation zwischen der Exposition mit ionisierender Strahlung und erhöhtem Brustkrebsrisiko ermittelt werden (Clemons *et al.*, 2000; Dumitrescu and Cotarla, 2005; Parshad and Sanford, 2001). Ein Zusammenhang besteht in der genotoxischen Wirkung der ionisierenden Strahlung durch die Akkumulation vielfältiger DNA-Schäden, wie DSBe, wobei die verstärkte fehlerhafte Reparatur der DSBe durch Insertion und Deletion die genomische Instabilität und das Krebsrisiko erhöht (Valerie and Povirk, 2003). Entsprechend dieser Erkenntnisse wurde ein deutlicher Anstieg der mutagenen Mikrohomologie-gerichteten NHEJ-Aktivitäten in den Lymphozyten der Kontrollprobandinnen nach Exposition mit ionisierender Strahlung detektiert. Die Lymphozyten der Brustkrebspatientinnen wiesen bereits ohne Strahlenexposition sehr hohe NHEJ-Aktivitäten auf, wobei interessanterweise nach Exposition mit ionisierender Strahlung kein weiterer Anstieg der mutagenen DSBR-Frequenzen ermittelt wurde. Dies widerspricht der Feststellung, dass Brustepithelzellen, Lymphozyten und Fibroblasten von sporadischen Brustkrebspatientinnen eine höhere Sensitivität gegenüber ionisierender Strahlung aufweisen (Parshad and Sanford, 2001). Möglicherweise ist das Maximum an fehlerhaften NHEJ-Aktivitäten in den Lymphozyten der Brustkrebspatientinnen bereits ohne Strahlenexposition erreicht und eine zusätzliche Schädigung kann die fehlerhaften DSBR-Aktivitäten der Lymphozyten nicht weiter erhöhen. Für die postulierte Sensitivität könnte andererseits auch der fehlerfreie NHEJ-Weg entscheidend sein, welcher im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht wurde.

Die Untersuchung der mutagenen NHEJ-Frequenzen in Abhängigkeit von der Behandlung der Kontrollprobandinnen und Brustkrebspatientinnen mit ionisierender Strahlung zeigte weiterhin, dass die Differenz der NHEJ-Frequenzen zwischen unbehandelten Individuen am größten war. Während beim Vergleich aller Brustkrebspatientinnen und Kontrollprobandinnen lediglich eine 2-fache Differenz detektiert wurde, zeigte die Gegenüberstellung der NHEJ-Frequenzen der unbestrahlten Individuen eine 5-fache Erhöhung der NHEJ-Reparatur für die Brustkrebspatientinnen. Diese Erkenntnis deutet an,

dass die Aussagekraft des *EGFP*-basierten DSBR-Testsystems wesentlich gesteigert werden kann, wenn nur unbestrahlte Probandinnen getestet werden. Demzufolge könnte in einem zukünftigen Test die Analyse von Frauen ohne vorherige Behandlung mit ionisierender Strahlung zu einer maximalen Diskriminierung zwischen Kontrollprobandinnen und Brustkrebspatientinnen führen. Dafür müsste in einer weiteren Studie dieses Ergebnis mit einer höheren Anzahl an unbestrahlten Probandinnen verifiziert werden.

Die intensive Erforschung von Brusttumoren ermöglichte die Klassifizierung unterschiedlicher Expressionsprofile von Östrogen-, Progesteron- sowie HER2neu-Rezeptoren der Brustkrebszellen (Brenton *et al.*, 2005; Nielsen *et al.*, 2004; Perou *et al.*, 2000). Das Expressionsprofil des *Basal-like*-Brustkarzinoms ist charakterisiert durch einen Mangel an Östrogen-, Progesteron- sowie HER2neu-Rezeptoren. Zusätzlich wurden *TP53*-Mutationen sowie hohe Expressionsniveaus an Proliferations-stimulierenden Genen nachgewiesen (Sorlie *et al.*, 2001), wobei der morphologische Befund sowie die immunhistochemischen Färbungen der *Basal-like*-Brustkarzinome große Ähnlichkeiten zu Brusttumoren von *BRCA1*-Mutationsträgern aufweisen (Turner and Reis-Filho, 2006). Weiterhin konnte eindeutig nachgewiesen werden, dass *Basal-like*-Brustkarzinome eine verminderte *Brcal*-Expression aufweisen (Yehiely *et al.*, 2006). Entsprechend dieser Übereinstimmungen zeigen gemäß meiner Daten die Lymphozyten von Brustkrebspatientinnen ohne Östrogen-, Progesteron- sowie HER2-Rezeptoren einen deutlichen Anstieg der, auch für *BRCA1*-Mutationen detektierten, mutagenen SSA-Frequenzen im Vergleich zu den Lymphozyten aus Brustkrebspatientinnen mit detektierbaren Östrogen-, Progesteron- sowie HER2neu-Rezeptoren. Weiterhin wurden für *Basal-like*-Brustkarzinome und Brusttumore von *BRCA1*-Mutationsträgern vorwiegend schlecht differenziertes Tumorgewebe diagnostiziert. Die Überprüfung der DSBR-Aktivitäten in Lymphozyten aus Brustkrebspatientinnen mit unterschiedlichen Differenzierungsgraden der Brusttumorzellen zeigte einen Anstieg an Mikrohomologie-gerichtetem NHEJ in schlecht differenziertem Tumorgewebe (G3) im Vergleich zu mäßig differenzierten Zellen (G2). Da die zunehmende Störung von Zellteilung und Differenzierung der Zellen mit der Akkumulation verschiedener Mutationen einhergeht (Fearon and Vogelstein, 1990), könnten auch Gene mutieren, die zusätzlich einen direkten oder indirekten Einfluss auf die DSBR haben. Zum Beispiel sind Mutationen im *TP53*-Gen an mehr als 50 % aller Krebserkrankungen beteiligt und weisen eine Erhöhung der NHEJ-Frequenzen auf (Dumitrescu and Cotarla, 2005; Keimling and Wiesmüller, 2009). Weiterhin sind schlecht

differenzierte Tumorzellen und hohe Frequenzen an Mikrohomologie-gerichtetem NHEJ zwei Charakteristika von hereditären *BRCA1*-Mammakarzinomen (Keimling *et al.*, 2008; Yehiely *et al.*, 2006). Um genauere Schlussfolgerungen über die Beziehung zwischen dem Differenzierungsgrad von Brusttumorzellen und der DSBR-Aktivität in den primären Lymphozyten desselben Individuums treffen zu können sind jedoch weitere Untersuchungen nötig. Möglicherweise spielen weitere hereditär vererbare, noch nicht identifizierte Mutationen in Genen mit geringer Penetranz eine wichtige Rolle (Szpirer and Szpirer, 2007).

Insgesamt konnten mit dem *EGFP*-basierten DSBR-Testsystem signifikante Unterschiede zwischen Brustkrebspatientinnen, Patientinnen mit benignen Brustläsionen, Familienmitgliedern aus Hochrisikofamilien und den Kontrollprobandinnen detektiert werden. Des Weiteren wurden auch für Strahlenexposition, Kinderlosigkeit oder Eintritt der Frauen in die Menopause zumindest für die Kontrollprobandinnen markante Einflüsse auf die DSBR-Aktivitäten detektiert, womit dieses System ein hohes diagnostisches Potential zur Identifizierung und Abschätzung von Brustkrebserkrankungsrisiken durch exogene und endogene Faktoren aufweist. In einer weiteren Studie müsste jedoch zum Nachweis, dass die detektierten DSBR-Dysfunktionen spezifisch für die Abschätzung des Brustkrebsrisikos sind, die Abgrenzung zu anderen vergleichsweise häufig auftretenden Krebsarten wie zum Beispiel Magen-Darm-Krebs erfolgen.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Das Mammakarzinom stellt weltweit die häufigste Krebserkrankung bei Frauen dar und ist neben altersabhängigen, hormonellen und Lebensstil-betreffenden Einflüssen vorwiegend auf genetische Prädisposition zurückzuführen. In diesem Zusammenhang konnten bisher Brustkrebs-relevante Keimbahnmutationen in zehn Genen detektiert werden. Interessanterweise sind die Genprodukte dieser Brustkrebs-suszeptibilitätsgene direkt oder indirekt in die DNA-Doppelstrangbruch-Reparatur (DSBR) involviert und Mutationen in diesen Genen führen zu DSBR-Defekten und damit zu Chromosomeninstabilität und Krebsentstehung.

DNA-Doppelstrangbrüche (DSBe) stellen die toxischste Art der DNA-Schäden dar und können zum Beispiel durch ionisierende Strahlung, reaktive Sauerstoffspezies, Topoisomerase-Inhibitoren oder den Kollaps der Replikationsmaschinerie beim Auftreffen auf Einzelstrangbrüche in der DNA-Matrize erzeugt werden. Für die Reparatur dieser DSBe stehen der Zelle zwei Mechanismen zur Verfügung, das *Non-homologous End-joining* (NHEJ) sowie die Homologie-gerichtete Reparatur, die in konservative homologe Rekombination (HR) und nicht-konservatives *Single-Strand-Annealing* (SSA) unterteilt wird. Während NHEJ und SSA durch Informationsverlust weitgehend fehlerhaft und damit mutagen sind, gilt die HR als eine Möglichkeit für die fehlerfreie Reparatur.

Interessanterweise konnte bereits gezeigt werden, dass Mutationen in den Brustkrebs-suszeptibilitätsgenen *BRCA1*, *BRCA2*, *TP53* und *ATM* durch die bevorzugte Nutzung von mutagenen Reparaturmechanismen, wie dem Mikrohomologie-gerichteten NHEJ oder SSA zur Brustkrebsentstehung führen.

Entsprechend dieser Erkenntnisse wurden in dieser Arbeit brustkrebsrelevante Mutationen von sieben Brustkrebs-suszeptibilitätsgenen (*BRCA1*, *BRCA2*, *TP53*, *ATM*, *NBN*, *RAD50*, *CHEK2*) mit dem *EGFP*-basierten DSBR-Testsystem auf spezifische DSBR-Defekte hin untersucht. Mit diesem Testsystem war es möglich, zwischen Mikrohomologie-gerichtetem NHEJ, nicht-konservativer (fehlerhaft, SSA) und konservativer (fehlerfrei, HR) Homologie-gerichteter DSBR wie auch zwischen genauem und ungenauem DNA-Austausch (lange bzw. kurze Homologie) zu unterscheiden.

Interessanterweise konnte ich unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Reaktionswege den Mutationen in *BRCA1*, *BRCA2*, *TP53*, *NBN* und *RAD50* spezifische DSBR-Defektmuster zuordnen. In diesem Zusammenhang konnte in *BRCA1*- und *BRCA2*-Defektlinien eine Zunahme der mutagenen DSBR-Wege NHEJ und SSA und in *BRCA2*-Defektlinien eine dramatische Abnahme der fehlerfreien HR im Vergleich zu den Kontrollzellen beobachtet

werden. Für genetische Veränderungen im *TP53*-Gen wurden vor allem die Erhöhung der HR sowie partiell eine Zunahme der Reparaturwege SSA und NHEJ detektiert. Die Erhöhung der HR war insbesondere für kurze Homologielängen festzustellen, was auf eine Abnahme der Genauigkeitskontrolle bei der HR hinweist, welche den Austausch zwischen divergierenden Sequenzen verhindert. Mutationen im *NBN*- bzw. *RAD50*-Gen verursachten eine moderate Senkung des SSA. Für genetische Veränderungen in *ATM* und *CHEK2* wurden keine eindeutigen DSBR-Defektmuster etabliert. Mutationen in diesen Brustkrebs-suszeptibilitätsgenen konnten jedoch vollständig oder über Teileffekte den zuvor etablierten DSBR-Defektmustern zugeordnet werden. Insgesamt konnten den Mutationen in jedem untersuchten Brustkrebs-suszeptibilitätsgen ein Defekt-Muster in der DSBR zugewiesen werden.

Die Anwendung des *EGFP*-basierten DSBR-Testsystems auf primäre Lymphozyten basierte auf der Beobachtung, dass fehlerhafte DSBR-Aktivitäten nicht nur Brustkrebs-suszeptibilität signifikant erhöht, sondern auch in Lymphozyten von genetisch prädisponierten Individuen und Brustkrebspatientinnen detektierbar ist. Aus diesem Grunde wurden die mutagenen DSBR-Wege NHEJ und SSA in Lymphozyten von 174 Brustkrebspatientinnen, 35 Mitgliedern aus Hochrisikofamilien und 246 Kontrollprobandinnen untersucht.

Interessanterweise konnte, bereits ohne Berücksichtigung des Alters der Probandinnen, eine signifikante Erhöhung der mutagenen DSBR-Wege für genetisch prädisponierte Individuen sowie Patientinnen mit benigner bzw. maligner Brustläsion im Vergleich zu den Kontrollprobandinnen detektiert werden. Des Weiteren konnte nachgewiesen werden, dass die DSBR-Aktivitäten sowohl für Kontrollprobandinnen wie Brustkrebspatientinnen einem Alterseinfluss unterliegen, der eine Abnahme der Reparaturkapazität mit dem Alter vermuten lässt. Ferner wurde für Kontrollprobandinnen nach Strahlenexposition oder ohne eigene Kinder eine Zunahme, nach Eintritt in die Menopause eine Abnahme der fehlerhaften DSBR-Aktivitäten detektiert. Für Brustkrebspatientinnen mit schlecht differenziertem Tumorgewebe oder negativem Östrogen-, Progesteron- und Her2neu-Rezeptorstatus deutete sich eine Zunahme der mutagenen DSBR-Aktivitäten an. Insgesamt weist das *EGFP*-basierte DSBR-Testsystem durch die quantitative und qualitative Bewertung von DSBR-Aktivitäten, ein hohes diagnostisches Potential zur Detektion von erhöhtem Brustkrebsrisiko über prädisponierende DSBR-Dysfunktionen auf. Die Anwendung des *EGFP*-basierten DSBR-Testsystems auf primäre Zellen aus Mammakarzinomen sowie auf primäre Lymphozyten derselben Brustkrebspatientinnen ermöglichte die Zuordnung zu hereditären und nicht-hereditären DSBR-Defekttypen.

Interessanterweise konnten in dieser Arbeit für die Zellen aus Brusttumorgewebe und Lymphozyten aus dem Blut der Brustkrebspatientinnen DSBR-Defekttypen festgestellt werden, die auf erbliche Mutationen in *Brca1*-, *Brca2*- und *Nibrin/Rad50*-Signalwegen sowie nachträglich im Tumor erworbene Mutationen in *Brca1*- und *p53*-Signalwegen und die daraus resultierende Brustkrebsentstehung hindeuten.

Durch die Bestimmung von DSBR-Defekten in Zellen aus Tumorgewebe könnte die Anwendbarkeit von spezifischen Therapieformen für die Eliminierung der Brusttumorzellen geprüft werden, da zum Beispiel die Verwendung von PARP-Inhibitoren gezielt *BRCA2*-defiziente Tumorzellen abtötet. Durch die Analyse der DSBR-Defekte in primären Zellen aus Tumorgewebe bzw. Lymphozyten aus dem Blut von Brustkrebspatientinnen mit dem *EGFP*-basierten DSBR-Testsystem könnte somit im Vorfeld die Ansprechbarkeit bestimmter Therapieformen vorhergesagt werden. Zusammengefasst stellt das *EGFP*-basierten DSBR-Testsystem eine Möglichkeit dar, diagnostisch, ohne vorherige Genotypisierung erhöhte Brustkrebs susceptibilität zu identifizieren und könnte als prädikativer Marker Aussagen über die Verwendung von Therapieformen ermöglichen. Des Weiteren ist dieses Testsystem auf eine Vielzahl von Zellen unterschiedlichen Ursprungs übertragbar, reaktionsschnell und für die Automatisierung geeignet und könnte zukünftig auch die Überprüfung einzelner Brustkrebs susceptibilitätsgene ersetzen.

7 SUMMARY

Breast cancer is the most common cancer disease in women and results from interplay between age, hormone exposition, environmental factors and genetic predisposition. In this context ten human susceptibility genes have been identified in the last years. The gene products of all these susceptibility genes are directly or indirectly involved in DNA double-strand break repair (DSBR) and mutations in these genes lead to defects in DSBR and furthermore to chromosomal instability and cancer development.

DSBs are highly toxic lesions and can result from ionising radiation, reactive oxygen species, topoisomerase inhibitors or endogenous sources such as collapsed replication forks. In mammals, two mechanisms of DSBR have been characterized namely, non-homologous end-joining (NHEJ) and homology directed repair which can be further separated into single-strand-annealing (SSA) and homologous recombination (HR). NHEJ and SSA are mostly error-prone, whereas HR is a more accurate DSBR mechanism.

Analysis of the breast cancer susceptibility genes *BRCA1*, *BRCA2*, *TP53* and *ATM* indicated that their products play an important part in DSBR and chromosomal stability. Mutations within these genes are associated with the usage of the more error-prone repair mechanisms NHEJ and SSA.

On the basis of these correlations I applied an EGFP-based repair test system extrachromosomally to detect functional changes in DSBR caused by mutations in seven breast cancer susceptibility genes (*BRCA1*, *BRCA2*, *TP53*, *ATM*, *NBN*, *RAD50*, *CHEK2*). This assay allowed discrimination between different DSBR pathways like NHEJ, SSA, HR with perfect or imperfect homologous sequences and combined usage of SSA and HR.

This analysis allowed to generate specific patterns of DSBR defects in cell lines mutated in *BRCA1*, *BRCA2*, *TP53*, *NBN* or *RAD50*. An increase of NHEJ and SSA was detectable in *BRCA1* and *BRCA2* defective cell lines and a dramatic decrease in HR was additionally measured in *BRCA2* defective cell lines.

Genetic changes in *TP53* led to increases in HR as well as elevated frequencies in SSA and NHEJ. In *TP53* mutated cells the elevation of HR was particularly observed for the HR substrate with imperfect homologous sequences. This indicates that *TP53* defective cells have lost their discriminatory potential to differentiate between perfectly and imperfectly homologous sequences, hence mutation in *TP53* had led to the decline of fidelity control. Mutations in *NBN* and *RAD50* were associated with a moderate decrease in SSA.

For mutations in *ATM* and *CHEK2* no specific DSB repair defect patterns were identified. However, it was possible to correlate these mutations fully or partially with DSB repair defect patterns which were specific for the previously mentioned genes.

Application of the DSB repair test system to primary lymphocytes was based on the observation, that (1) mutagenic DSB repair can elevate breast cancer susceptibility and (2) DSB repair defects were detectable in lymphocytes of genetically predisposed individuals. Therefore, the mutagenic DSB repair pathways NHEJ and SSA were measured in 174 breast cancer patients, 35 members of high risk families and 246 healthy controls.

Without consideration of age, a significant elevation of mutagenic repair was detectable in predisposed individuals as well as in patients with benign or malignant breast cancer lesions in comparison to controls. Further observations indicated an age dependent influence on DSB repair revealing reduced repair capacity with age. Whereas exposure to ionising radiation or nulliparity resulted in an increase, entrance into menopause was associated with a decrease in error-prone DSB repair in controls. For sporadic breast cancer patients with low grade differentiation of tumor cells or negative estrogen receptor, progesterone receptor or her2 status my data suggested an increase in mutagenic DSB repair. In total, the EGFP-based DSB repair test system has a high potential to detect elevated breast cancer risk.

Applying the DSB repair test system to primary cells from breast tumor samples and primary lymphocytes from the same patient allowed to distinguish between hereditary and non-hereditary DSB repair defect types. Interestingly, I was able to detect functional defects indicating hereditary mutations in the *BRCA1*, *BRCA2* or *NBN/RAD50* signal cascade as well as acquired mutations in the *BRCA1* or *TP53* signal cascade.

Since PARP-1 inhibitors can eliminate *BRCA2* deficient cells, an exciting new aspect is the usefulness of functionally testing DNA repair capacities in primary cells to analyse the application of different therapeutic treatment.

In the future it could be possible to predict the responsiveness of special therapeutic treatments by measurement of DSB repair defects in primary cells from breast tumors and lymphocytes from the same patient.

Altogether functional analysis may serve as an additional marker for breast cancer risk assessment and may also predict responsiveness to targeted therapies. In addition, the test system is transferable to different cell types, offers a fast readout and may eliminate the individual analysis of special breast cancer susceptibility genes.

8 LITERATURVERZEICHNIS

Akyüz N, Boehden GS, Süsse S, Rimek A, Preuss U, Scheidtmann KH *et al* (2002). DNA substrate dependence of p53-mediated regulation of double-strand break repair. *Mol Cell Biol* **22**: 6306-17.

Allinen M, Huusko P, Mantyniemi S, Launonen V, Winqvist R (2001). Mutation analysis of the CHK2 gene in families with hereditary breast cancer. *Br J Cancer* **85**: 209-12.

Antoni L, Sodha N, Collins I, Garrett MD (2007). CHK2 kinase: cancer susceptibility and cancer therapy - two sides of the same coin? *Nat Rev Cancer* **7**: 925-36.

Antoniou A, Pharoah PD, Narod S, Risch HA, Eyfjord JE, Hopper JL *et al* (2003). Average risks of breast and ovarian cancer associated with BRCA1 or BRCA2 mutations detected in case Series unselected for family history: a combined analysis of 22 studies. *Am J Hum Genet* **72**: 1117-30.

Antoniou AC, Easton DF (2006). Models of genetic susceptibility to breast cancer. *Oncogene* **25**: 5898-905.

Arias-Lopez C, Lazaro-Trueba I, Kerr P, Lord CJ, Dexter T, Irvani M *et al* (2006). p53 modulates homologous recombination by transcriptional regulation of the RAD51 gene. *EMBO Rep* **7**: 219-24.

Assenmacher N, Hopfner KP (2004). MRE11/RAD50/NBS1: complex activities. *Chromosoma* **113**: 157-66.

Atz J, Wagner P, Roemer K (2000). Function, oligomerization, and conformation of tumor-associated p53 proteins with mutated C-terminus. *J Cell Biochem* **76**: 572-84.

Backe J (2002). Brustkrebs beim Mann. *Dtsch Arzteblatt* **9**: A-1168 / B-970 / C-913.

Bahassi EM, Ovesen JL, Riesenberger AL, Bernstein WZ, Hasty PE, Stambrook PJ (2008). The checkpoint kinases Chk1 and Chk2 regulate the functional associations between hBRCA2 and Rad51 in response to DNA damage. *Oncogene* **27**: 3977-85.

Bakalkin G, Yakovleva T, Selivanova G, Magnusson KP, Szekely L, Kiseleva E *et al* (1994). p53 binds single-stranded DNA ends and catalyzes DNA renaturation and strand transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**: 413-7.

Baldeyron C, Jacquemin E, Smith J, Jacquemont C, De Oliveira I, Gad S *et al* (2002). A single mutated BRCA1 allele leads to impaired fidelity of double strand break end-joining. *Oncogene* **21**: 1401-10.

Balmain A, Gray J, Ponder B (2003). The genetics and genomics of cancer. *Nat Genet* **33** **Suppl**: 238-44.

Barnes DE (2001). Non-homologous end joining as a mechanism of DNA repair. *Curr Biol* **11**: R455-7.

Bartkova J, Horejsi Z, Koed K, Kramer A, Tort F, Zieger K *et al* (2005). DNA damage response as a candidate anti-cancer barrier in early human tumorigenesis. *Nature* **434**: 864-70.

Bassing CH, Swat W, Alt FW (2002). The mechanism and regulation of chromosomal V(D)J recombination. *Cell* **109 Suppl**: S45-55.

Batzler, Giersiepen, Hentschel, Husmann (2008). Krebs in Deutschland 2003 – 2004
Häufigkeiten und Trends, 6. überarbeitete Auflage. *Robert Koch-Institut
Gesellschaft der epidemiologischen
Krebsregister in Deutschland e. V.*: 1-113.

Baumann P, Benson FE, West SC (1996). Human Rad51 protein promotes ATP-dependent homologous pairing and strand transfer reactions in vitro. *Cell* **87**: 757-66.

Beckmann (2005). Brustkrebs - Der blaue Ratgeber 2. *Deutsche Krebshilfe e.V.*

Bell DW, Varley JM, Szydlo TE, Kang DH, Wahrer DC, Shannon KE *et al* (1999). Heterozygous germ line hCHK2 mutations in Li-Fraumeni syndrome. *Science* **286**: 2528-31.

Bennardo N, Cheng A, Huang N, Stark JM (2008). Alternative-NHEJ is a mechanistically distinct pathway of mammalian chromosome break repair. *PLoS Genet* **4**: e1000110.

Bernstein L (2002). Epidemiology of endocrine-related risk factors for breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* **7**: 3-15.

Bertrand P, Saintigny Y, Lopez BS (2004). p53's double life: transactivation-independent repression of homologous recombination. *Trends Genet* **20**: 235-43.

Bhat HK, Han X, Gladek A, Liehr JG (1994). Regulation of the formation of the major diethylstilbestrol-DNA adduct and some evidence of its structure. *Carcinogenesis* **15**: 2137-42.

Bishop AJ, Barlow C, Wynshaw-Boris AJ, Schiestl RH (2000). Atm deficiency causes an increased frequency of intrachromosomal homologous recombination in mice. *Cancer Res* **60**: 395-9.

Bode AM, Dong Z (2004). Post-translational modification of p53 in tumorigenesis. *Nat Rev Cancer* **4**: 793-805.

Bogdanova N, Enssen-Dubrowinskaja N, Feshchenko S, Lazjuk GI, Rogov YI, Dammann O *et al* (2005). Association of two mutations in the CHEK2 gene with breast cancer. *Int J Cancer* **116**: 263-6.

Borresen-Dale AL (2003). TP53 and breast cancer. *Hum Mutat* **21**: 292-300.

Bradbury AR, Olopade OI (2007). Genetic susceptibility to breast cancer. *Rev Endocr Metab Disord* **8**: 255-67.

Brenton JD, Carey LA, Ahmed AA, Caldas C (2005). Molecular classification and molecular forecasting of breast cancer: ready for clinical application? *J Clin Oncol* **23**: 7350-60.

- Brinton LA, Schairer C, Hoover RN, Fraumeni JF, Jr. (1988). Menstrual factors and risk of breast cancer. *Cancer Invest* **6**: 245-54.
- Brody JG, Rudel RA, Michels KB, Moysich KB, Bernstein L, Attfield KR *et al* (2007). Environmental pollutants, diet, physical activity, body size, and breast cancer: where do we stand in research to identify opportunities for prevention? *Cancer* **109**: 2627-34.
- Broeks A, Urbanus JH, de Knijff P, Devilee P, Nicke M, Klopper K *et al* (2003). IVS10-6T>G, an ancient ATM germline mutation linked with breast cancer. *Hum Mutat* **21**: 521-8.
- Broeks A, Urbanus JH, Floore AN, Dahler EC, Klijn JG, Rutgers EJ *et al* (2000). ATM-heterozygous germline mutations contribute to breast cancer-susceptibility. *Am J Hum Genet* **66**: 494-500.
- Brown L, Boswell S, Raj L, Lee SW (2007). Transcriptional targets of p53 that regulate cellular proliferation. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* **17**: 73-85.
- Brozova M, Kleibl Z, Netikova I, Sevcik J, Scholzova E, Brezinova J *et al* (2007). Establishment, growth and in vivo differentiation of a new clonal human cell line, EM-G3, derived from breast cancer progenitors. *Breast Cancer Res Treat* **103**: 247-57.
- Bryant HE, Schultz N, Thomas HD, Parker KM, Flower D, Lopez E *et al* (2005). Specific killing of BRCA2-deficient tumours with inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase. *Nature* **434**: 913-7.
- Buchhop S, Gibson MK, Wang XW, Wagner P, Sturzbecher HW, Harris CC (1997). Interaction of p53 with the human Rad51 protein. *Nucleic Acids Res* **25**: 3868-74.
- Callen E, Jankovic M, Wong N, Zha S, Chen HT, Difilippantonio S *et al* (2009). Essential role for DNA-PKcs in DNA double-strand break repair and apoptosis in ATM-deficient lymphocytes. *Mol Cell* **34**: 285-97.
- Cantor SB, Andreassen PR (2006). Assessing the link between BACH1 and BRCA1 in the FA pathway. *Cell Cycle* **5**: 164-7.
- Carson CT, Schwartz RA, Stracker TH, Lilley CE, Lee DV, Weitzman MD (2003). The Mre11 complex is required for ATM activation and the G2/M checkpoint. *EMBO J* **22**: 6610-20.
- Cavaciuti E, Lauge A, Janin N, Ossian K, Hall J, Stoppa-Lyonnet D *et al* (2005). Cancer risk according to type and location of ATM mutation in ataxia-telangiectasia families. *Genes Chromosomes Cancer* **42**: 1-9.
- Chanoux RA, Yin B, Urtishak KA, Asare A, Bassing CH, Brown EJ (2009). ATR and H2AX cooperate in maintaining genome stability under replication stress. *J Biol Chem* **284**: 5994-6003.
- Chen J, Silver DP, Walpita D, Cantor SB, Gazdar AF, Tomlinson G *et al* (1998). Stable interaction between the products of the BRCA1 and BRCA2 tumor suppressor genes in mitotic and meiotic cells. *Mol Cell* **2**: 317-28.

- Chen JJ, Silver D, Cantor S, Livingston DM, Scully R (1999). BRCA1, BRCA2, and Rad51 operate in a common DNA damage response pathway. *Cancer Res* **59**: 1752s-1756s.
- Chen L, Nievera CJ, Lee AY, Wu X (2008). Cell cycle-dependent complex formation of BRCA1.CtIP.MRN is important for DNA double-strand break repair. *J Biol Chem* **283**: 7713-20.
- Chenevix-Trench G, Spurdle AB, Gatei M, Kelly H, Marsh A, Chen X *et al* (2002). Dominant negative ATM mutations in breast cancer families. *J Natl Cancer Inst* **94**: 205-15.
- Christmann M, Tomicic MT, Roos WP, Kaina B (2003). Mechanisms of human DNA repair: an update. *Toxicology* **193**: 3-34.
- Clemons M, Loijens L, Goss P (2000). Breast cancer risk following irradiation for Hodgkin's disease. *Cancer Treat Rev* **26**: 291-302.
- Couch FJ, Weber BL (1996). Mutations and polymorphisms in the familial early-onset breast cancer (BRCA1) gene. Breast Cancer Information Core. *Hum Mutat* **8**: 8-18.
- Dahm-Daphi J, Hubbe P, Horvath F, El-Awady RA, Bouffard KE, Powell SN *et al* (2005). Nonhomologous end-joining of site-specific but not of radiation-induced DNA double-strand breaks is reduced in the presence of wild-type p53. *Oncogene* **24**: 1663-72.
- de Jager M, Kanaar R (2002). Genome instability and Rad50(S): subtle yet severe. *Genes Dev* **16**: 2173-8.
- De Nicolo A, Tancredi M, Lombardi G, Flemma CC, Barbuti S, Di Cristofano C *et al* (2008). A novel breast cancer-associated BRIP1 (FANCI/BACH1) germ-line mutation impairs protein stability and function. *Clin Cancer Res* **14**: 4672-80.
- Demuth I, Digweed M (2007). The clinical manifestation of a defective response to DNA double-strand breaks as exemplified by Nijmegen breakage syndrome. *Oncogene* **26**: 7792-8.
- Difilippantonio S, Celeste A, Fernandez-Capetillo O, Chen HT, Reina San Martin B, Van Laethem F *et al* (2005). Role of Nbs1 in the activation of the Atm kinase revealed in humanized mouse models. *Nat Cell Biol* **7**: 675-85.
- Difilippantonio S, Celeste A, Kruhlak MJ, Lee Y, Difilippantonio MJ, Feigenbaum L *et al* (2007). Distinct domains in Nbs1 regulate irradiation-induced checkpoints and apoptosis. *J Exp Med* **204**: 1003-11.
- Difilippantonio S, Nussenzweig A (2007). The NBS1-ATM connection revisited. *Cell Cycle* **6**: 2366-70.
- Dinkelmann M, Spehalski E, Stoneham T, Buis J, Wu Y, Sekiguchi JM *et al* (2009). Multiple functions of MRN in end-joining pathways during isotype class switching. *Nat Struct Mol Biol* **16**: 808-13.
- Djelic N, Djelic D (2002). Enhanced sister-chromatid exchange rate in human lymphocytes exposed to 17beta estradiol in vitro. *Arch Med Res* **33**: 148-51.

- Dörk T, Bendix-Waltes R, Wegner RD, Stumm M (2004). Slow progression of ataxia-telangiectasia with double missense and in frame splice mutations. *Am J Med Genet A* **126A**: 272-7.
- Dork T, Bendix R, Bremer M, Rades D, Klopper K, Nicke M *et al* (2001). Spectrum of ATM gene mutations in a hospital-based series of unselected breast cancer patients. *Cancer Res* **61**: 7608-15.
- Downs JA, Lowndes NF, Jackson SP (2000). A role for *Saccharomyces cerevisiae* histone H2A in DNA repair. *Nature* **408**: 1001-4.
- Drexler GA, Wilde S, Beisker W, Ellwart J, Eckardt-Schupp F, Fritz E (2004). The rate of extrachromosomal homologous recombination within a novel reporter plasmid is elevated in cells lacking functional ATM protein. *DNA Repair (Amst)* **3**: 1345-53.
- Dudenhöffer C, Kurth M, Janus F, Deppert W, Wiesmüller L (1999). Dissociation of the recombination control and the sequence-specific transactivation function of P53. *Oncogene* **18**: 5773-84.
- Dufault MR, Betz B, Wappenschmidt B, Hofmann W, Bandick K, Golla A *et al* (2004). Limited relevance of the CHEK2 gene in hereditary breast cancer. *Int J Cancer* **110**: 320-5.
- Dumitrescu RG, Cotarla I (2005). Understanding breast cancer risk -- where do we stand in 2005? *J Cell Mol Med* **9**: 208-21.
- Durant ST, Nickoloff JA (2005). Good timing in the cell cycle for precise DNA repair by BRCA1. *Cell Cycle* **4**: 1216-22.
- Dutta A, Chakraborty A, Saha A, Ray S, Chatterjee A (2005). Interaction of radiation- and bleomycin-induced lesions and influence of glutathione level on the interaction. *Mutagenesis* **20**: 329-35.
- Easton DF, Pooley KA, Dunning AM, Pharoah PD, Thompson D, Ballinger DG *et al* (2007). Genome-wide association study identifies novel breast cancer susceptibility loci. *Nature* **447**: 1087-93.
- Eng C (2003). PTEN: one gene, many syndromes. *Hum Mutat* **22**: 183-98.
- Engels WR, Johnson-Schlitz D, Flores C, White L, Preston CR (2007). A third link connecting aging with double strand break repair. *Cell Cycle* **6**: 131-5.
- Erkko H, Xia B, Nikkila J, Schleutker J, Syrjakoski K, Mannermaa A *et al* (2007). A recurrent mutation in PALB2 in Finnish cancer families. *Nature* **446**: 316-9.
- Falck J, Coates J, Jackson SP (2005). Conserved modes of recruitment of ATM, ATR and DNA-PKcs to sites of DNA damage. *Nature* **434**: 605-11.
- Farmer H, McCabe N, Lord CJ, Tutt AN, Johnson DA, Richardson TB *et al* (2005). Targeting the DNA repair defect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy. *Nature* **434**: 917-21.

- Fearon ER, Vogelstein B (1990). A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* **61**: 759-67.
- Furuta T, Takemura H, Liao ZY, Aune GJ, Redon C, Sedelnikova OA *et al* (2003). Phosphorylation of histone H2AX and activation of Mre11, Rad50, and Nbs1 in response to replication-dependent DNA double-strand breaks induced by mammalian DNA topoisomerase I cleavage complexes. *J Biol Chem* **278**: 20303-12.
- Futreal PA, Liu Q, Shattuck-Eidens D, Cochran C, Harshman K, Tavtigian S *et al* (1994). BRCA1 mutations in primary breast and ovarian carcinomas. *Science* **266**: 120-2.
- Gail MH, Brinton LA, Byar DP, Corle DK, Green SB, Schairer C *et al* (1989). Projecting individualized probabilities of developing breast cancer for white females who are being examined annually. *J Natl Cancer Inst* **81**: 1879-86.
- Gatei M, Young D, Cerosaletti KM, Desai-Mehta A, Spring K, Kozlov S *et al* (2000). ATM-dependent phosphorylation of nibrin in response to radiation exposure. *Nat Genet* **25**: 115-9.
- Gatz SA, Wiesmüller L (2006). p53 in recombination and repair. *Cell Death Differ* **13**: 1003-16.
- Giersiepen K. HC, Janhsen K., Lange C. (2005). Gesundheitsberichterstattung des Bundes, Heft 25
Brustkrebs. *Robert Koch-Institut*.
- Golding SE, Rosenberg E, Khalil A, McEwen A, Holmes M, Neill S *et al* (2004). Double strand break repair by homologous recombination is regulated by cell cycle-independent signaling via ATM in human glioma cells. *J Biol Chem* **279**: 15402-10.
- Goodarzi AA, Noon AT, Deckbar D, Ziv Y, Shiloh Y, Lobrich M *et al* (2008). ATM signaling facilitates repair of DNA double-strand breaks associated with heterochromatin. *Mol Cell* **31**: 167-77.
- Gorbunova V, Seluanov A, Mao Z, Hine C (2007). Changes in DNA repair during aging. *Nucleic Acids Res* **35**: 7466-74.
- Gorgoulis VG, Vassiliou LV, Karakaidos P, Zacharatos P, Kotsinas A, Liloglou T *et al* (2005). Activation of the DNA damage checkpoint and genomic instability in human precancerous lesions. *Nature* **434**: 907-13.
- Gudmundsdottir K, Ashworth A (2006). The roles of BRCA1 and BRCA2 and associated proteins in the maintenance of genomic stability. *Oncogene* **25**: 5864-74.
- Haber JE (2000). Partners and pathways repairing a double-strand break. *Trends Genet* **16**: 259-64.
- Hamroun D, Kato S, Ishioka C, Claustres M, Beroud C, Soussi T (2006). The UMD TP53 database and website: update and revisions. *Hum Mutat* **27**: 14-20.

- Heikkinen K, Rapakko K, Karppinen SM, Erkkö H, Knuutila S, Lundan T *et al* (2006). RAD50 and NBS1 are breast cancer susceptibility genes associated with genomic instability. *Carcinogenesis* **27**: 1593-9.
- Helleday T, Lo J, van Gent DC, Engelward BP (2007). DNA double-strand break repair: from mechanistic understanding to cancer treatment. *DNA Repair (Amst)* **6**: 923-35.
- Hemminki K, Forsti A, Lorenzo Bermejo J (2009). Surveying germline genomic landscape of breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* **113**: 601-3.
- Henderson BE, Ross RK, Pike MC, Casagrande JT (1982). Endogenous hormones as a major factor in human cancer. *Cancer Res* **42**: 3232-9.
- Hopper JL (2001). Genetic epidemiology of female breast cancer. *Semin Cancer Biol* **11**: 367-74.
- Horejsi Z, Falck J, Bakkenist CJ, Kastan MB, Lukas J, Bartek J (2004). Distinct functional domains of Nbs1 modulate the timing and magnitude of ATM activation after low doses of ionizing radiation. *Oncogene* **23**: 3122-7.
- Howlett NG (2007). Fanconi anemia: Fanconi anemia, breast and embryonal cancer risk revisited. *Eur J Hum Genet* **15**: 715-7.
- Howlett NG, Scuric Z, D'Andrea AD, Schiestl RH (2006). Impaired DNA double strand break repair in cells from Nijmegen breakage syndrome patients. *DNA Repair (Amst)* **5**: 251-7.
- Huang TT, D'Andrea AD (2006). Regulation of DNA repair by ubiquitylation. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**: 323-34.
- Huen MS, Grant R, Manke I, Minn K, Yu X, Yaffe MB *et al* (2007). RNF8 transduces the DNA-damage signal via histone ubiquitylation and checkpoint protein assembly. *Cell* **131**: 901-14.
- Huertas P, Jackson SP (2009). Human CtIP mediates cell cycle control of DNA end resection and double strand break repair. *J Biol Chem* **284**: 9558-65.
- Jacquemont C, Taniguchi T (2007). The Fanconi anemia pathway and ubiquitin. *BMC Biochem* **8 Suppl 1**: S10.
- Jasin M (2002). Homologous repair of DNA damage and tumorigenesis: the BRCA connection. *Oncogene* **21**: 8981-93.
- Jiang X, Sun Y, Chen S, Roy K, Price BD (2006). The FATC domains of PIKK proteins are functionally equivalent and participate in the Tip60-dependent activation of DNA-PKcs and ATM. *J Biol Chem* **281**: 15741-6.
- Johnson RD, Jasin M (2000). Sister chromatid gene conversion is a prominent double-strand break repair pathway in mammalian cells. *EMBO J* **19**: 3398-407.
- Johnson RD, Jasin M (2001). Double-strand-break-induced homologous recombination in mammalian cells. *Biochem Soc Trans* **29**: 196-201.

Ju YJ, Lee KH, Park JE, Yi YS, Yun MY, Ham YH *et al* (2006). Decreased expression of DNA repair proteins Ku70 and Mre11 is associated with aging and may contribute to the cellular senescence. *Exp Mol Med* **38**: 686-93.

Kachhap SK, Vetale SP, Dange P, Ghosh SN (2001). Reduced expression of the BRCA1 gene and increased chromosomal instability in MCF-7 cell line. *Cell Biol Int* **25**: 547-51.

Kanaar R, Hoeijmakers JH, van Gent DC (1998). Molecular mechanisms of DNA double strand break repair. *Trends Cell Biol* **8**: 483-9.

Kang Y, Massague J (2004). Epithelial-mesenchymal transitions: twist in development and metastasis. *Cell* **118**: 277-9.

Karagiannis TC, El-Osta A (2004). Double-strand breaks: signaling pathways and repair mechanisms. *Cell Mol Life Sci* **61**: 2137-47.

Kayikcioglu F, Gunes M, Baltaci V, Kocak M, Alpas I, Haberal A (2000). Sister-chromatid exchange frequencies in postmenopausal hormone replacement patients. *Mutat Res* **452**: 37-9.

Keimling M, Kaur J, Bagadi SA, Kreienberg R, Wiesmüller L, Ralhan R (2008). A sensitive test for the detection of specific DSB repair defects in primary cells from breast cancer specimens. *Int J Cancer* **123**: 730-6.

Keimling M, Wiesmüller L (2009). DNA double-strand break repair activities in mammary epithelial cells--influence of endogenous p53 variants. *Carcinogenesis* **30**: 1260-8.

Khanna KK, Keating KE, Kozlov S, Scott S, Gatei M, Hobson K *et al* (1998). ATM associates with and phosphorylates p53: mapping the region of interaction. *Nat Genet* **20**: 398-400.

Kilpivaara O, Vahteristo P, Falck J, Syrjakoski K, Eerola H, Easton D *et al* (2004). CHEK2 variant I157T may be associated with increased breast cancer risk. *Int J Cancer* **111**: 543-7.

Kim MK, Zitzmann S, Westermann F, Arnold K, Brouwers S, Schwab M *et al* (2004). Increased rates of spontaneous sister chromatid exchange in lymphocytes of BRCA2+/- carriers of familial breast cancer clusters. *Cancer Lett* **210**: 85-94.

Kim ST, Lim DS, Canman CE, Kastan MB (1999). Substrate specificities and identification of putative substrates of ATM kinase family members. *J Biol Chem* **274**: 37538-43.

Kitagawa R, Bakkenist CJ, McKinnon PJ, Kastan MB (2004). Phosphorylation of SMC1 is a critical downstream event in the ATM-NBS1-BRCA1 pathway. *Genes Dev* **18**: 1423-38.

Kotsopoulos J, Chen Z, Vallis KA, Poll A, Ainsworth P, Narod SA (2007). DNA repair capacity as a possible biomarker of breast cancer risk in female BRCA1 mutation carriers. *Br J Cancer* **96**: 118-25.

Koubenec (2003). Mammakarzinome. http://www.brustkrebs-berlin.de/patienten-info/brusterkrankungen/carcinoma_in_situ.htm.

- Kozlov SV, Graham ME, Peng C, Chen P, Robinson PJ, Lavin MF (2006). Involvement of novel autophosphorylation sites in ATM activation. *EMBO J* **25**: 3504-14.
- Kuefner MA, Grudzenski S, Schwab SA, Wiederseiner M, Heckmann M, Bautz W *et al* (2009). DNA double-strand breaks and their repair in blood lymphocytes of patients undergoing angiographic procedures. *Invest Radiol* **44**: 440-6.
- Kurz EU, Lees-Miller SP (2004). DNA damage-induced activation of ATM and ATM-dependent signaling pathways. *DNA Repair (Amst)* **3**: 889-900.
- Lane DP (1992). Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature* **358**: 15-6.
- Lavin MF (2007). ATM and the Mre11 complex combine to recognize and signal DNA double-strand breaks. *Oncogene* **26**: 7749-58.
- Lavin MF, Gueven N (2006). The complexity of p53 stabilization and activation. *Cell Death Differ* **13**: 941-50.
- Lavin MF, Scott S, Gueven N, Kozlov S, Peng C, Chen P (2004). Functional consequences of sequence alterations in the ATM gene. *DNA Repair (Amst)* **3**: 1197-205.
- Lee JH, Lim DS (2006). Dual role of Nbs1 in the ataxia telangiectasia mutated-dependent DNA damage response. *FEBS J* **273**: 1630-6.
- Lee JH, Paull TT (2004). Direct activation of the ATM protein kinase by the Mre11/Rad50/Nbs1 complex. *Science* **304**: 93-6.
- Lee JH, Paull TT (2005). ATM activation by DNA double-strand breaks through the Mre11-Rad50-Nbs1 complex. *Science* **308**: 551-4.
- Lee JH, Paull TT (2007). Activation and regulation of ATM kinase activity in response to DNA double-strand breaks. *Oncogene* **26**: 7741-8.
- Lee JM, Dedhar S, Kalluri R, Thompson EW (2006). The epithelial-mesenchymal transition: new insights in signaling, development, and disease. *J Cell Biol* **172**: 973-81.
- Levine AJ (1997). p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* **88**: 323-31.
- Li JJ, Li SA (1984). Estrogen-induced tumorigenesis in hamsters: roles for hormonal and carcinogenic activities. *Arch Toxicol* **55**: 110-8.
- Lieber MR, Ma Y, Pannicke U, Schwarz K (2003). Mechanism and regulation of human non-homologous DNA end-joining. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**: 712-20.
- Liehr JG (1990). Genotoxic effects of estrogens. *Mutat Res* **238**: 269-76.
- Liehr JG (2000). Is estradiol a genotoxic mutagenic carcinogen? *Endocr Rev* **21**: 40-54.
- Liehr JG, Avitts TA, Randerath E, Randerath K (1986). Estrogen-induced endogenous DNA adduction: possible mechanism of hormonal cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**: 5301-5.

- Lim DS, Kim ST, Xu B, Maser RS, Lin J, Petrini JH *et al* (2000). ATM phosphorylates p95/nbs1 in an S-phase checkpoint pathway. *Nature* **404**: 613-7.
- Linke SP, Sengupta S, Khabie N, Jeffries BA, Buchhop S, Miska S *et al* (2003). p53 interacts with hRAD51 and hRAD54, and directly modulates homologous recombination. *Cancer Res* **63**: 2596-605.
- Lins S, Kim R, Kruger L, Chrzanowska KH, Seemanova E, Digweed M (2009). Clinical variability and expression of the NBN c.657del5 allele in Nijmegen Breakage Syndrome. *Gene* **447**: 12-7.
- Litman R, Gupta R, Brosh RM, Jr., Cantor SB (2008). BRCA-FA pathway as a target for anti-tumor drugs. *Anticancer Agents Med Chem* **8**: 426-30.
- Litman R, Peng M, Jin Z, Zhang F, Zhang J, Powell S *et al* (2005). BACH1 is critical for homologous recombination and appears to be the Fanconi anemia gene product FANCF. *Cancer Cell* **8**: 255-65.
- Luo CM, Tang W, Mekeel KL, DeFrank JS, Anne PR, Powell SN (1996). High frequency and error-prone DNA recombination in ataxia telangiectasia cell lines. *J Biol Chem* **271**: 4497-503.
- Luo G, Yao MS, Bender CF, Mills M, Bladl AR, Bradley A *et al* (1999). Disruption of mRad50 causes embryonic stem cell lethality, abnormal embryonic development, and sensitivity to ionizing radiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 7376-81.
- MacMahon B, Cole P, Lin TM, Lowe CR, Mirra AP, Ravnihar B *et al* (1970). Age at first birth and breast cancer risk. *Bull World Health Organ* **43**: 209-21.
- Mao Z, Bozzella M, Seluanov A, Gorbunova V (2008). DNA repair by nonhomologous end joining and homologous recombination during cell cycle in human cells. *Cell Cycle* **7**: 2902-6.
- Martin AM, Weber BL (2000). Genetic and hormonal risk factors in breast cancer. *J Natl Cancer Inst* **92**: 1126-35.
- Meijers-Heijboer H, van den Ouweland A, Klijn J, Wasielewski M, de Snoo A, Oldenburg R *et al* (2002). Low-penetrance susceptibility to breast cancer due to CHEK2(*)1100delC in noncarriers of BRCA1 or BRCA2 mutations. *Nat Genet* **31**: 55-9.
- Michels KB, Mohllajee AP, Roset-Bahmanyar E, Beehler GP, Moysich KB (2007). Diet and breast cancer: a review of the prospective observational studies. *Cancer* **109**: 2712-49.
- Miki Y, Swensen J, Shattuck-Eidens D, Futreal PA, Harshman K, Tavtigian S *et al* (1994). A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science* **266**: 66-71.
- Mirkovic N, Marti-Renom MA, Weber BL, Sali A, Monteiro AN (2004). Structure-based assessment of missense mutations in human BRCA1: implications for breast and ovarian cancer predisposition. *Cancer Res* **64**: 3790-7.

- Mirzoeva OK, Petrini JH (2001). DNA damage-dependent nuclear dynamics of the Mre11 complex. *Mol Cell Biol* **21**: 281-8.
- Mochan TA, Venere M, DiTullio RA, Jr., Halazonetis TD (2003). 53BP1 and NFB1/MDC1-Nbs1 function in parallel interacting pathways activating ataxia-telangiectasia mutated (ATM) in response to DNA damage. *Cancer Res* **63**: 8586-91.
- Morley AA, Cox S, Holliday R (1982). Human lymphocytes resistant to 6-thioguanine increase with age. *Mech Ageing Dev* **19**: 21-6.
- Morrison C, Sonoda E, Takao N, Shinohara A, Yamamoto K, Takeda S (2000). The controlling role of ATM in homologous recombinational repair of DNA damage. *EMBO J* **19**: 463-71.
- Moynahan ME, Pierce AJ, Jasin M (2001). BRCA2 is required for homology-directed repair of chromosomal breaks. *Mol Cell* **7**: 263-72.
- Muller P, Hrstka R, Coomber D, Lane DP, Vojtesek B (2008). Chaperone-dependent stabilization and degradation of p53 mutants. *Oncogene* **27**: 3371-83.
- Nakanishi K, Yang YG, Pierce AJ, Taniguchi T, Digweed M, D'Andrea AD *et al* (2005). Human Fanconi anemia monoubiquitination pathway promotes homologous DNA repair. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 1110-5.
- Narod SA, Foulkes WD (2004). BRCA1 and BRCA2: 1994 and beyond. *Nat Rev Cancer* **4**: 665-76.
- Nielsen TO, Hsu FD, Jensen K, Cheang M, Karaca G, Hu Z *et al* (2004). Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Clin Cancer Res* **10**: 5367-74.
- Norbury CJ, Hickson ID (2001). Cellular responses to DNA damage. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **41**: 367-401.
- Nussenzweig A, Nussenzweig MC (2007). A backup DNA repair pathway moves to the forefront. *Cell* **131**: 223-5.
- O'Connor MJ, Martin NM, Smith GC (2007). Targeted cancer therapies based on the inhibition of DNA strand break repair. *Oncogene* **26**: 7816-24.
- Obersler P, Hloch P, Ramsperger U, Stahl H (1993). p53-catalyzed annealing of complementary single-stranded nucleic acids. *EMBO J* **12**: 2389-96.
- Okorokov AL, Warnock L, Milner J (2002). Effect of wild-type, S15D and R175H p53 proteins on DNA end joining in vitro: potential mechanism of DNA double-strand break repair modulation. *Carcinogenesis* **23**: 549-57.
- Olivier M, Eeles R, Hollstein M, Khan MA, Harris CC, Hainaut P (2002). The IARC TP53 database: new online mutation analysis and recommendations to users. *Hum Mutat* **19**: 607-14.

- Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P (2005). Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* **55**: 74-108.
- Parshad R, Sanford KK (2001). Radiation-induced chromatid breaks and deficient DNA repair in cancer predisposition. *Crit Rev Oncol Hematol* **37**: 87-96.
- Pastwa E, Blasiak J (2003). Non-homologous DNA end joining. *Acta Biochim Pol* **50**: 891-908.
- Paull TT, Cortez D, Bowers B, Elledge SJ, Gellert M (2001). Direct DNA binding by Brca1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 6086-91.
- Pellegrini L, Yu DS, Lo T, Anand S, Lee M, Blundell TL *et al* (2002). Insights into DNA recombination from the structure of a RAD51-BRCA2 complex. *Nature* **420**: 287-93.
- Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA *et al* (2000). Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* **406**: 747-52.
- Pierce AJ, Jasin M (2001). NHEJ deficiency and disease. *Mol Cell* **8**: 1160-1.
- Pike MC, Spicer DV, Dahmouch L, Press MF (1993). Estrogens, progestogens, normal breast cell proliferation, and breast cancer risk. *Epidemiol Rev* **15**: 17-35.
- Planchon SM, Waite KA, Eng C (2008). The nuclear affairs of PTEN. *J Cell Sci* **121**: 249-53.
- Powell SN, Kachnic LA (2003). Roles of BRCA1 and BRCA2 in homologous recombination, DNA replication fidelity and the cellular response to ionizing radiation. *Oncogene* **22**: 5784-91.
- Preston CR, Flores C, Engels WR (2006). Age-dependent usage of double-strand-break repair pathways. *Curr Biol* **16**: 2009-15.
- Rahman N, Seal S, Thompson D, Kelly P, Renwick A, Elliott A *et al* (2007). PALB2, which encodes a BRCA2-interacting protein, is a breast cancer susceptibility gene. *Nat Genet* **39**: 165-7.
- Ralhan R, Kaur J, Kreienberg R, Wiesmüller L (2007). Links between DNA double strand break repair and breast cancer: accumulating evidence from both familial and nonfamilial cases. *Cancer Lett* **248**: 1-17.
- Rass E, Grabarz A, Plo I, Gautier J, Bertrand P, Lopez BS (2009). Role of Mre11 in chromosomal nonhomologous end joining in mammalian cells. *Nat Struct Mol Biol* **16**: 819-24.
- Restle A, Färber M, Baumann C, Böhringer M, Scheidtmann KH, Müller-Tidow C *et al* (2008). Dissecting the role of p53 phosphorylation in homologous recombination provides new clues for gain-of-function mutants. *Nucleic Acids Res* **36**: 5362-75.
- Riballo E, Kuhne M, Rief N, Doherty A, Smith GC, Recio MJ *et al* (2004). A pathway of double-strand break rejoining dependent upon ATM, Artemis, and proteins locating to gamma-H2AX foci. *Mol Cell* **16**: 715-24.

- Rodriguez-Pinilla SM, Sarrío D, Honrado E, Moreno-Bueno G, Hardisson D, Calero F *et al* (2007). Vimentin and laminin expression is associated with basal-like phenotype in both sporadic and BRCA1-associated breast carcinomas. *J Clin Pathol* **60**: 1006-12.
- Rogakou EP, Boon C, Redon C, Bonner WM (1999). Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks in vivo. *J Cell Biol* **146**: 905-16.
- Rogakou EP, Pilch DR, Orr AH, Ivanova VS, Bonner WM (1998). DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J Biol Chem* **273**: 5858-68.
- Rosen EM, Fan S, Pestell RG, Goldberg ID (2003). BRCA1 gene in breast cancer. *J Cell Physiol* **196**: 19-41.
- Rossouw JE, Anderson GL, Prentice RL, LaCroix AZ, Kooperberg C, Stefanick ML *et al* (2002). Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *JAMA* **288**: 321-33.
- Rothfuss A, Schutz P, Bochum S, Volm T, Eberhardt E, Kreienberg R *et al* (2000). Induced micronucleus frequencies in peripheral lymphocytes as a screening test for carriers of a BRCA1 mutation in breast cancer families. *Cancer Res* **60**: 390-4.
- Saal LH, Gruvberger-Saal SK, Persson C, Lovgren K, Jumppanen M, Staaf J *et al* (2008). Recurrent gross mutations of the PTEN tumor suppressor gene in breast cancers with deficient DSB repair. *Nat Genet* **40**: 102-7.
- Saal LH, Holm K, Maurer M, Memeo L, Su T, Wang X *et al* (2005). PIK3CA mutations correlate with hormone receptors, node metastasis, and ERBB2, and are mutually exclusive with PTEN loss in human breast carcinoma. *Cancer Res* **65**: 2554-9.
- Sakamoto S, Iijima K, Mochizuki D, Nakamura K, Teshigawara K, Kobayashi J *et al* (2007). Homologous recombination repair is regulated by domains at the N- and C-terminus of NBS1 and is dissociated with ATM functions. *Oncogene* **26**: 6002-9.
- Sambrook J, Gething MJ (1989). Protein structure. Chaperones, paperones. *Nature* **342**: 224-5.
- Sandoval N, Platzer M, Rosenthal A, Dork T, Bendix R, Skawran B *et al* (1999). Characterization of ATM gene mutations in 66 ataxia telangiectasia families. *Hum Mol Genet* **8**: 69-79.
- Sanford KK, Parshad R, Price FM, Jones GM, Tarone RE, Eierman L *et al* (1990). Enhanced chromatid damage in blood lymphocytes after G2 phase x irradiation, a marker of the ataxia-telangiectasia gene. *J Natl Cancer Inst* **82**: 1050-4.
- Sartori AA, Lukas C, Coates J, Mistrik M, Fu S, Bartek J *et al* (2007). Human CtIP promotes DNA end resection. *Nature* **450**: 509-14.

- Schutte M, Seal S, Barfoot R, Meijers-Heijboer H, Wasielewski M, Evans DG *et al* (2003). Variants in CHEK2 other than 1100delC do not make a major contribution to breast cancer susceptibility. *Am J Hum Genet* **72**: 1023-8.
- Seluanov A, Danek J, Hause N, Gorbunova V (2007). Changes in the level and distribution of Ku proteins during cellular senescence. *DNA Repair (Amst)* **6**: 1740-8.
- Seluanov A, Mittelman D, Pereira-Smith OM, Wilson JH, Gorbunova V (2004). DNA end joining becomes less efficient and more error-prone during cellular senescence. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 7624-9.
- Sengupta S, Harris CC (2005). p53: traffic cop at the crossroads of DNA repair and recombination. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**: 44-55.
- Shen WH, Balajee AS, Wang J, Wu H, Eng C, Pandolfi PP *et al* (2007). Essential role for nuclear PTEN in maintaining chromosomal integrity. *Cell* **128**: 157-70.
- Shim KS, Schmutte C, Tomblin G, Heinen CD, Fishel R (2004). hXRCC2 enhances ADP/ATP processing and strand exchange by hRAD51. *J Biol Chem* **279**: 30385-94.
- Shrivastav M, De Haro LP, Nickoloff JA (2008). Regulation of DNA double-strand break repair pathway choice. *Cell Res* **18**: 134-47.
- Sikic BI (1986). Biochemical and cellular determinants of bleomycin cytotoxicity. *Cancer Surv* **5**: 81-91.
- Simons AM, Horwitz AA, Starita LM, Griffin K, Williams RS, Glover JN *et al* (2006). BRCA1 DNA-binding activity is stimulated by BARD1. *Cancer Res* **66**: 2012-8.
- Sivaraman L, Medina D (2002). Hormone-induced protection against breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* **7**: 77-92.
- Sodha N, Bullock S, Taylor R, Mitchell G, Guertl-Lackner B, Williams RD *et al* (2002). CHEK2 variants in susceptibility to breast cancer and evidence of retention of the wild type allele in tumours. *Br J Cancer* **87**: 1445-8.
- Soe K, Grosse F (2003). p53 stimulates human topoisomerase I activity by modulating its DNA binding. *Nucleic Acids Res* **31**: 6585-92.
- Soe K, Hartmann H, Schlott B, Stevnsner T, Grosse F (2002). The tumor suppressor protein p53 stimulates the formation of the human topoisomerase I double cleavage complex in vitro. *Oncogene* **21**: 6614-23.
- Sommers JA, Rawtani N, Gupta R, Bugreev DV, Mazin AV, Cantor SB *et al* (2009). FANCIJ uses its motor ATPase to destabilize protein-DNA complexes, unwind triplexes, and inhibit RAD51 strand exchange. *J Biol Chem* **284**: 7505-17.
- Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H *et al* (2001). Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 10869-74.

- Spain BH, Larson CJ, Shihabuddin LS, Gage FH, Verma IM (1999). Truncated BRCA2 is cytoplasmic: implications for cancer-linked mutations. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 13920-5.
- Speit G, Trenz K (2004). Chromosomal mutagen sensitivity associated with mutations in BRCA genes. *Cytogenet Genome Res* **104**: 325-32.
- Spring K, Ahangari F, Scott SP, Waring P, Purdie DM, Chen PC *et al* (2002). Mice heterozygous for mutation in *Atm*, the gene involved in ataxia-telangiectasia, have heightened susceptibility to cancer. *Nat Genet* **32**: 185-90.
- Stark JM, Pierce AJ, Oh J, Pastink A, Jasin M (2004). Genetic steps of mammalian homologous repair with distinct mutagenic consequences. *Mol Cell Biol* **24**: 9305-16.
- Stephan H, Grosse F, Soe K (2002). Human topoisomerase I cleavage complexes are repaired by a p53-stimulated recombination-like reaction in vitro. *Nucleic Acids Res* **30**: 5087-93.
- Stracker TH, Theunissen JW, Morales M, Petrini JH (2004). The Mre11 complex and the metabolism of chromosome breaks: the importance of communicating and holding things together. *DNA Repair (Amst)* **3**: 845-54.
- Stucki M, Jackson SP (2006). gammaH2AX and MDC1: anchoring the DNA-damage-response machinery to broken chromosomes. *DNA Repair (Amst)* **5**: 534-43.
- Süsse S, Janz C, Janus F, Deppert W, Wiesmüller L (2000). Role of heteroduplex joints in the functional interactions between human Rad51 and wild-type p53. *Oncogene* **19**: 4500-12.
- Sugiyama T, Kowalczykowski SC (2002). Rad52 protein associates with replication protein A (RPA)-single-stranded DNA to accelerate Rad51-mediated displacement of RPA and presynaptic complex formation. *J Biol Chem* **277**: 31663-72.
- Swift M, Reitnauer PJ, Morrell D, Chase CL (1987). Breast and other cancers in families with ataxia-telangiectasia. *N Engl J Med* **316**: 1289-94.
- Szipirer C, Szipirer J (2007). Mammary cancer susceptibility: human genes and rodent models. *Mamm Genome* **18**: 817-31.
- Tan Y, Raychaudhuri P, Costa RH (2007). Chk2 mediates stabilization of the FoxM1 transcription factor to stimulate expression of DNA repair genes. *Mol Cell Biol* **27**: 1007-16.
- Tanaka T, Huang X, Halicka HD, Zhao H, Traganos F, Albino AP *et al* (2007). Cytometry of ATM activation and histone H2AX phosphorylation to estimate extent of DNA damage induced by exogenous agents. *Cytometry A* **71**: 648-61.
- Tauchi H, Kobayashi J, Morishima K, van Gent DC, Shiraishi T, Verkaik NS *et al* (2002). Nbs1 is essential for DNA repair by homologous recombination in higher vertebrate cells. *Nature* **420**: 93-8.
- Tavtigian SV, Simard J, Rommens J, Couch F, Shattuck-Eidens D, Neuhausen S *et al* (1996). The complete BRCA2 gene and mutations in chromosome 13q-linked kindreds. *Nat Genet* **12**: 333-7.

- Terry PD, Rohan TE (2002). Cigarette smoking and the risk of breast cancer in women: a review of the literature. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **11**: 953-71.
- Thacker J (2005). The RAD51 gene family, genetic instability and cancer. *Cancer Lett* **219**: 125-35.
- Thiery JP (2002). Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer* **2**: 442-54.
- Thompson LH, Schild D (2001). Homologous recombinational repair of DNA ensures mammalian chromosome stability. *Mutat Res* **477**: 131-53.
- Thompson LH, Schild D (2002). Recombinational DNA repair and human disease. *Mutat Res* **509**: 49-78.
- Tomlinson GE, Chen TT, Stastny VA, Virmani AK, Spillman MA, Tonk V *et al* (1998). Characterization of a breast cancer cell line derived from a germ-line BRCA1 mutation carrier. *Cancer Res* **58**: 3237-42.
- Tretli S (1989). Height and weight in relation to breast cancer morbidity and mortality. A prospective study of 570,000 women in Norway. *Int J Cancer* **44**: 23-30.
- Trichopoulos D, MacMahon B, Cole P (1972). Menopause and breast cancer risk. *J Natl Cancer Inst* **48**: 605-13.
- Turner NC, Reis-Filho JS (2006). Basal-like breast cancer and the BRCA1 phenotype. *Oncogene* **25**: 5846-53.
- Tutt A, Bertwistle D, Valentine J, Gabriel A, Swift S, Ross G *et al* (2001). Mutation in Brca2 stimulates error-prone homology-directed repair of DNA double-strand breaks occurring between repeated sequences. *EMBO J* **20**: 4704-16.
- Um JH, Kim SJ, Kim DW, Ha MY, Jang JH, Chung BS *et al* (2003). Tissue-specific changes of DNA repair protein Ku and mtHSP70 in aging rats and their retardation by caloric restriction. *Mech Ageing Dev* **124**: 967-75.
- Ursin G, Tseng CC, Paganini-Hill A, Enger S, Wan PC, Formenti S *et al* (2002). Does menopausal hormone replacement therapy interact with known factors to increase risk of breast cancer? *J Clin Oncol* **20**: 699-706.
- Uziel T, Lerenthal Y, Moyal L, Andegeko Y, Mittelman L, Shiloh Y (2003). Requirement of the MRN complex for ATM activation by DNA damage. *EMBO J* **22**: 5612-21.
- Vahteristo P, Bartkova J, Eerola H, Syrjakoski K, Ojala S, Kilpivaara O *et al* (2002). A CHEK2 genetic variant contributing to a substantial fraction of familial breast cancer. *Am J Hum Genet* **71**: 432-8.
- Valerie K, Povirk LF (2003). Regulation and mechanisms of mammalian double-strand break repair. *Oncogene* **22**: 5792-812.

- van der Linden E, Sanchez H, Kinoshita E, Kanaar R, Wyman C (2009). RAD50 and NBS1 form a stable complex functional in DNA binding and tethering. *Nucleic Acids Res.*
- Van Dyck E, Stasiak AZ, Stasiak A, West SC (2001). Visualization of recombination intermediates produced by RAD52-mediated single-strand annealing. *EMBO Rep* **2**: 905-9.
- van Gent DC, van der Burg M (2007). Non-homologous end-joining, a sticky affair. *Oncogene* **26**: 7731-40.
- Varley J, Haber DA (2003). Familial breast cancer and the hCHK2 1100delC mutation: assessing cancer risk. *Breast Cancer Res* **5**: 123-5.
- Varley JM (2003). Germline TP53 mutations and Li-Fraumeni syndrome. *Hum Mutat* **21**: 313-20.
- Vincent-Salomon A, Thiery JP (2003). Host microenvironment in breast cancer development: epithelial-mesenchymal transition in breast cancer development. *Breast Cancer Res* **5**: 101-6.
- Walsh T, King MC (2007). Ten genes for inherited breast cancer. *Cancer Cell* **11**: 103-5.
- Walters R, Kalb R, Gatei M, Kijas AW, Stumm M, Sobock A *et al* (2009). Human RAD50 deficiency in a Nijmegen breakage syndrome-like disorder. *Am J Hum Genet* **84**: 605-16.
- Wang HC, Chou WC, Shieh SY, Shen CY (2006). Ataxia telangiectasia mutated and checkpoint kinase 2 regulate BRCA1 to promote the fidelity of DNA end-joining. *Cancer Res* **66**: 1391-400.
- Watters D, Khanna KK, Beamish H, Birrell G, Spring K, Kedar P *et al* (1997). Cellular localisation of the ataxia-telangiectasia (ATM) gene product and discrimination between mutated and normal forms. *Oncogene* **14**: 1911-21.
- Westermarck UK, Reyngold M, Olshen AB, Baer R, Jasin M, Moynahan ME (2003). BARD1 participates with BRCA1 in homology-directed repair of chromosome breaks. *Mol Cell Biol* **23**: 7926-36.
- Willipinski-Stapelfeldt B, Riethdorf S, Assmann V, Woelfle U, Rau T, Sauter G *et al* (2005). Changes in cytoskeletal protein composition indicative of an epithelial-mesenchymal transition in human micrometastatic and primary breast carcinoma cells. *Clin Cancer Res* **11**: 8006-14.
- Wu K, Hinson SR, Ohashi A, Farrugia D, Wendt P, Tavtigian SV *et al* (2005). Functional evaluation and cancer risk assessment of BRCA2 unclassified variants. *Cancer Res* **65**: 417-26.
- Wu X, Ranganathan V, Weisman DS, Heine WF, Ciccone DN, O'Neill TB *et al* (2000). ATM phosphorylation of Nijmegen breakage syndrome protein is required in a DNA damage response. *Nature* **405**: 477-82.
- Xia B, Dorsman JC, Ameziane N, de Vries Y, Rooimans MA, Sheng Q *et al* (2007). Fanconi anemia is associated with a defect in the BRCA2 partner PALB2. *Nat Genet* **39**: 159-61.

- Xia B, Sheng Q, Nakanishi K, Ohashi A, Wu J, Christ N *et al* (2006). Control of BRCA2 cellular and clinical functions by a nuclear partner, PALB2. *Mol Cell* **22**: 719-29.
- Xiao Y, Weaver DT (1997). Conditional gene targeted deletion by Cre recombinase demonstrates the requirement for the double-strand break repair Mre11 protein in murine embryonic stem cells. *Nucleic Acids Res* **25**: 2985-91.
- Xie A, Hartlerode A, Stucki M, Odate S, Puget N, Kwok A *et al* (2007). Distinct roles of chromatin-associated proteins MDC1 and 53BP1 in mammalian double-strand break repair. *Mol Cell* **28**: 1045-57.
- Xie A, Kwok A, Scully R (2009). Role of mammalian Mre11 in classical and alternative nonhomologous end joining. *Nat Struct Mol Biol* **16**: 814-8.
- Yamane K, Katayama E, Tsuruo T (2000). The BRCT regions of tumor suppressor BRCA1 and of XRCC1 show DNA end binding activity with a multimerizing feature. *Biochem Biophys Res Commun* **279**: 678-84.
- Yang J, Yu Y, Hamrick HE, Duerksen-Hughes PJ (2003). ATM, ATR and DNA-PK: initiators of the cellular genotoxic stress responses. *Carcinogenesis* **24**: 1571-80.
- Yang YG, Saidi A, Frappart PO, Min W, Barrucand C, Dumon-Jones V *et al* (2006). Conditional deletion of Nbs1 in murine cells reveals its role in branching repair pathways of DNA double-strand breaks. *EMBO J* **25**: 5527-38.
- Yehiely F, Moyano JV, Evans JR, Nielsen TO, Cryns VL (2006). Deconstructing the molecular portrait of basal-like breast cancer. *Trends Mol Med* **12**: 537-44.
- Yin B, Bassing CH (2008). The sticky business of histone H2AX in V(D)J recombination, maintenance of genomic stability, and suppression of lymphoma. *Immunol Res* **42**: 29-40.
- Ying S, Myers K, Bottomley S, Helleday T, Bryant HE (2009). BRCA2-dependent homologous recombination is required for repair of Arsenite-induced replication lesions in mammalian cells. *Nucleic Acids Res* **37**: 5105-13.
- Yu X, Chen J (2004). DNA damage-induced cell cycle checkpoint control requires CtIP, a phosphorylation-dependent binding partner of BRCA1 C-terminal domains. *Mol Cell Biol* **24**: 9478-86.
- Yu X, Fu S, Lai M, Baer R, Chen J (2006). BRCA1 ubiquitinates its phosphorylation-dependent binding partner CtIP. *Genes Dev* **20**: 1721-6.
- Yun MH, Hiom K (2009). CtIP-BRCA1 modulates the choice of DNA double-strand-break repair pathway throughout the cell cycle. *Nature* **459**: 460-3.
- Yun S, Lie ACC, Porter AC (2004). Discriminatory suppression of homologous recombination by p53. *Nucleic Acids Res* **32**: 6479-89.
- Zhang J, Willers H, Feng Z, Ghosh JC, Kim S, Weaver DT *et al* (2004). Chk2 phosphorylation of BRCA1 regulates DNA double-strand break repair. *Mol Cell Biol* **24**: 708-18.

Zhao S, Weng YC, Yuan SS, Lin YT, Hsu HC, Lin SC *et al* (2000). Functional link between ataxia-telangiectasia and Nijmegen breakage syndrome gene products. *Nature* **405**: 473-7.

Zhu J, Petersen S, Tessarollo L, Nussenzweig A (2001). Targeted disruption of the Nijmegen breakage syndrome gene NBS1 leads to early embryonic lethality in mice. *Curr Biol* **11**: 105-9.

Zhuang J, Jiang G, Willers H, Xia F (2009). The exonuclease function of human Mre11 promotes deletional non-homologous end-joining. *J Biol Chem*.

Zhuang J, Zhang J, Willers H, Wang H, Chung JH, van Gent DC *et al* (2006). Checkpoint kinase 2-mediated phosphorylation of BRCA1 regulates the fidelity of nonhomologous end-joining. *Cancer Res* **66**: 1401-8.

9 ANHANG

9.1 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
%	Prozent
μ	mikro
A	Ampere
A	Adenin
Abb.	Abbildung
abs.	absolut
ADP	Adenosindiphosphat
AT	<i>Ataxia telangiectasia</i>
ATM	<i>Ataxia telangiectasia mutated kinase</i>
ATP	Adenosintriphosphat
ATR	<i>Ataxia telangiectasia-mutated and Rad3-related kinase</i>
APS	Ammoniumpersulfat
<i>BARD1</i>	<i>BRCA1 associated RING domain 1</i>
BASC	<i>BRCA1-associated super complex</i>
<i>BLM</i>	<i>Bloom's syndrom protein</i>
bp	Basenpaar
<i>BRCA1</i>	<i>Breast cancer 1</i>
<i>BRCA2</i>	<i>Breast cancer 2</i>
BRCT	<i>Breast cancer carboxy-terminal</i>
BSA	Rinderserumalbumin
C	Cytosin
c-Abl	<i>c-Abelson tyrosin kinase</i>
C-Terminus	Carboxy-Terminus
<i>CHEK1</i>	<i>Checkpoint kinase 1</i>
<i>CHEK2</i>	<i>Checkpoint kinase 2</i>
CLIS	lobuläres Karzinom <i>in situ</i>
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenyl-indol
DCIS	duktales Karzinom <i>in situ</i>
ddH ₂ O	zweifach destilliertes Wasser
del	Deletion

dNTP	desoxy-Nukleotidtriphosphat
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
DNA-PK	<i>dsDNA-protein-kinase</i>
DNA-PKcs	<i>dsDNA-protein-kinase catalytic-subunit</i>
ds	Doppelstrang
DSB	Doppelstrangbruch
DSBR	Doppelstrangbruchreparatur
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamin-tetra-Essigsäure
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>
EGFP	<i>Enhanced green fluorescent protein</i>
EGTA	Ethylenglykoldiamintetraessigsäure
EJ	<i>End-joining</i>
EMA	<i>Epithelial membrane antigen</i>
EMT	<i>Epithelial-mesenchymal transition</i>
Endkonz.	Endkonzentration
ER	Östrogenrezeptor
<i>ERCC1</i>	<i>Excision repair cross complementing group 1</i>
Fa.	Firma
FACS	<i>Fluorescent activated cell sorter</i>
<i>FANCD1</i>	<i>Fanconi anemia complementation group D1</i>
<i>FANCD2</i>	<i>Fanconi anemia complementation group D2</i>
<i>FANCI</i>	<i>Fanconi anemia complementation group J</i>
<i>FANCN</i>	<i>Fanconi anemia complementation group N</i>
FAT	<i>FRAP, ATR, TRRAP</i>
FATC	<i>FAT carboxy-terminal</i>
FBS	fötales Kälberserum
FHA	<i>Fork-head associated</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FoxM1	<i>Forkhead box M1</i>
FSC	<i>Forward scatter</i>

g	Gramm
g	Gravitationskonstante
G	Guanin
h	Stunde
H	Homologie
H2AX	Histon 2AX
HEA	<i>Human epithelial antigen</i>
HEAT	<i>huntingtin, elongation factor 3, A subunit of protein phosphatase 2A and TOR1</i>
Her2neu	<i>Human epidermal growth factor receptor 2</i>
Hepes	[4-(2-Hydroxyethyl)-piperazino]-ethansulfonsäure)
het.	Heterozygot
HMEC	<i>Human Mammary Epithelial Cells</i>
H.M.W.	<i>High molecular weight</i>
HR	homologe Rekombination
IDC	invasives duktales Karzinom
IgG	Immunglobulin G
IHC	Immunhistochemie
ILC	invasives löbuläres Karzinom
ins	Insertion
k	kilo
k	kurze
kDa	Kilodalton
l	lange
L	Liter
LB-Medium	Luri-Bertani-Medium
LDS	Laurylsulfat Natriumsalz
LFS	<i>Li-Fraumeni syndrom</i>
m	milli
m	Meter
M	Molar (mol/L)
min	Minute
MDC1	<i>Mediator of DNA damage checkpoint protein 1</i>
MEFs	<i>Mouse embryonic fibroblasts</i>

<i>MLH1</i>	<i>MutL-Homolog</i>
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
MP	Milchpulver
MRN	Mre11-Rad50-Nibrin
<i>MSH2</i>	<i>MutS-Homolog</i>
<i>MSH6</i>	<i>MutS-Homolog</i>
mut.	mutiert
MW	Molekulargewicht
n	Anzahl
n	nano
N	Nacht
N-Terminus	Amino-Terminus
NBS	<i>Nijmegen breakage syndrom</i>
NHEJ	<i>Non-homologous End-joining</i>
NLS	<i>Nuclear localization signal</i>
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamidgel-Elektrophorese
Palb2	<i>Partner and localizer of BRCA2</i>
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen-Konzentration
PHA	Phytohaemagglutinin
PI	Propidiumiodid
PR	Progesteronrezeptor
pSer	phosphoryliertes Serin
<i>PTEN</i>	<i>Phosphatase and tensin homolog</i>
PVDF	Polyvinylidenfluorid
Rap80	<i>Receptor-associated protein 80</i>
rel.	relativ
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
RNase	Ribonuklease
<i>RNF8</i>	<i>Ring finger 8</i>
<i>RPA</i>	<i>Replication protein A</i>
rpm	<i>rounds per minute</i>

RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
<i>SMC1</i>	<i>Structural maintenance of chromosomes protein 1</i>
ss	Einzelstrang
SSA	<i>Single-Strand-Annealing</i>
SSC	<i>Sideward scatter</i>
T	Thymin
TAE	Tris-Acetat-EDTA
Tab.	Tabelle
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Topo I	Topoisomerase I
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	<i>unit</i>
u.a.	unter anderem
ü.N.	über Nacht
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
<i>WRN</i>	<i>Werner's syndrome protein</i>
wt	Wildtyp
w/v	Gewicht pro Volumen
<i>XPF</i>	<i>Xeroderma pigmentosum complementation group F</i>
<i>XRCC1</i>	<i>X-ray cross complementing 2</i>
<i>XRCC2</i>	<i>X-ray cross complementing 2</i>
<i>XRCC3</i>	<i>X-ray cross complementing 3</i>
<i>XRCC4</i>	<i>X-ray cross complementing 4</i>
<i>53BP1</i>	<i>p53 binding protein 1</i>
ZK	Zellkultur

9.2 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	Inzidenz des Mammakarzinoms in Abhängigkeit vom Alter (Batzler <i>et al.</i> , 2008).....	1
Abb. 2	Schematische Darstellung der Brustkrebsverteilung und Anteil der Brustkrebs- suszeptibilitätsgene auf das genetisch bedingte Brustkrebsrisiko (Szpirer and Szpirer, 2007).....	3
Abb. 3	Schematischer Ablauf der HR.....	6
Abb. 4	Schematischer Ablauf von SSA.....	7
Abb. 5	Schematischer Ablauf von NHEJ.....	9
Abb. 6	Abfolge der Brustkrebsentstehung.....	11
Abb. 7	Prinzip des auf <i>EGFP</i> -Rekonstitution basierenden DSBR-Testsystems.....	19
Abb. 8	Schematische Darstellung der DSBR-Plasmide und Ergebnisse der DSBR nach I- <i>SceI</i> - Restriktion und Rekonstitution des <i>wtEGFP</i>	20
Abb. 9	Darstellung der Akzeptorgene <i>A-</i> , <i>HR-</i> und <i>EJ-EGFP</i>	21
Abb. 10	Isolierung der Lymphozyten.....	42
Abb. 11	<i>Dot-Plot</i> -Diagramm am Durchflusszytometer mit linearer Ausrichtung von FSC/SSC.....	48
Abb. 12	<i>Dot-Plot</i> -Diagramme mit logarithmischer FL1 / FL2-Ausrichtung zur Ermittlung von DSBR- Ereignissen.....	48
Abb. 13	Zellzyklusphasen im DNA-Histogramm.....	50
Abb. 14	Immunfluoreszenzanalyse mit Primärantikörper spezifisch für γ H2AX.....	51
Abb. 15	IHC-Färbung der primären, aus Brusttumoren isolierten Zellen und Kontrollzelllinien MCF12a und MCF7 zur Eingruppierung der Zellkulturen in die Zellarten Epithelzellen, Fibroblasten und EMT-Zellen.....	54
Abb. 16	Bestimmung der DSBR-Unterschiede und Zellzyklusanalyse zwischen <i>BRCA1</i> -Defekt- und Kontrollzelllinien zur Etablierung des DSBR-Defektmusters für Brustkrebs-prädisponierte <i>BRCA1</i> -Genmutationen.....	61
Abb. 17	Bestimmung der DSBR-Unterschiede und Zellzyklusanalyse zwischen <i>BRCA2/FANCD1</i> - Defekt- und Kontrollzelllinien zur Etablierung des DSBR-Defektmusters für Brustkrebs- prädisponierte <i>BRCA2/FANCD1</i> -Genmutationen.....	64
Abb. 18	Bestimmung der DSBR-Unterschiede und Zellzyklusanalyse zwischen <i>NBN/RAD50</i> -Defekt- und Kontrollzelllinien zur Etablierung des DSBR-Defektmusters für die Brustkrebs-prädisponierten <i>NBN/RAD50</i> -Genmutationen.....	67
Abb. 19	Bestimmung der DSBR-Unterschiede und Zellzyklusanalyse zwischen <i>ATM</i> -Defekt- und Kontrollzelllinien zur Etablierung der DSBR-Defektmuster für die <i>ATM</i> -Genmutationen.....	74
Abb. 20	Bestimmung der DSBR-Unterschiede und Zellzyklusanalyse zwischen <i>CHEK2</i> -Defekt- und Kontrollzelllinien zur Etablierung der DSBR-Defektmuster für die <i>CHEK2</i> -Genmutationen.....	77
Abb. 21	Western-Blot-Analyse zu den lymphoblastoiden Zelllinien.....	80
Abb. 22	Hellfeld- und fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der verwendeten nicht-transformierten Brustepithel- sowie der Brustkrebszelllinien.....	82
Abb. 23	Western-Blot-Analyse zu den Brustepithelzelllinien mit <i>wtp53</i> und Mutanten- <i>p53</i>	83
Abb. 24	Bestimmung der DSBR-Unterschiede zwischen Brustepithelzelllinien mit <i>wtp53</i> und Mutanten- <i>p53</i>	86
Abb. 25	Western-Blot- und Zellzyklus-Analyse nach <i>knockdown</i> von <i>p53</i> in Brustepithelzelllinien.....	88

Abb. 26	Bestimmung der DSBR-Unterschiede zwischen Brustepithelzelllinien mit wtp53 und Mutanten-p53 nach <i>knockdown</i> von p53 mittels pSuper-p53-Plasmid und Etablierung des DSBR-Defektmusters für die Brustkrebs-prädisponierten p53-Genmutationen.....	90
Abb. 27	Hellfeldaufnahmen der primären, aus Tumorgewebe isolierten Zellen	92
Abb. 28	Immunfluoreszenzanalysen mit MCF7-Zellen zur Detektion der nukleären Verteilung von γ H2AX nach Bleomycininkubation und quantitativen Auswertung der γ H2AX-Foci	98
Abb. 29	Immunfluoreszenzanalysen mit MCF12a-Zellen zur Detektion der nukleären Verteilung von γ H2AX nach Bleomycininkubation und quantitative Auswertung der γ H2AX-Foci	99
Abb. 30	Hellfeldaufnahme und IHC-Färbung der isolierten EMT- und Fibroblastenkulturen aus dem Tumormaterial B1926/08	102
Abb. 31	Analyse der DSBR-Aktivitäten in primären Zellen aus dem Tumormaterial B1926/08 und in Lymphozyten aus dem Blut derselben Brustkrebspatientin	103
Abb. 32	Immunfluoreszenzanalyse mit EMT-Zellen des Tumormaterials B1926/08 zur Detektion der nukleären Verteilung von γ H2AX nach Bleomycininkubation und quantitative Auswertung der γ H2AX-Foci.....	104
Abb. 33	Hellfeldaufnahme und IHC-Färbung der isolierten Epithel- und EMT-Zellkulturen aus dem Tumormaterial B1905/08	105
Abb. 34	Analyse der DSBR-Aktivitäten in primären Zellen aus Tumormaterial B1905/08 und in Lymphozyten aus dem Blut derselben Brustkrebspatientin	106
Abb. 35	Immunfluoreszenzanalyse mit Epithelzellen des Tumormaterials B1905/08 zur Detektion der nukleären Verteilung von γ H2AX nach Bleomycininkubation und quantitative Auswertung der γ H2AX-Foci.....	107
Abb. 36	Hellfeldaufnahme und IHC-Färbung der isolierten Epithel- und Fibroblastenkulturen aus dem Tumormaterial B4841/08	108
Abb. 37	Analyse der DSBR-Aktivitäten in primären Zellen aus Tumormaterial B4841/08 und in Lymphozyten aus dem Blut derselben Brustkrebspatientin	109
Abb. 38	Immunfluoreszenzanalyse mit Epithelzellen des Tumormaterials B4841/08 zur Detektion der nukleären Verteilung von γ H2AX nach Bleomycininkubation und quantitative Auswertung der γ H2AX-Foci.....	110
Abb. 39	Hellfeldaufnahme und IHC-Färbung der isolierten Epithel- und Fibroblastenkulturen aus dem Tumormaterial G1676/06.....	111
Abb. 40	Analyse der DSBR-Aktivitäten in primären Zellen aus Tumormaterial G1676/06 und in Lymphozyten aus dem Blut derselben Brustkrebspatientin	112
Abb. 41	Hellfeldaufnahme und IHC-Färbung der isolierten Epithelzellen aus dem Tumormaterial B12666/07.....	113
Abb. 42	Analyse der DSBR-Aktivitäten in primären Zellen aus Tumormaterial B12666/07 und in Lymphozyten aus dem Blut derselben Brustkrebspatientin	114
Abb. 43	Immunfluoreszenzanalyse mit Epithelzellen des Tumormaterials B12666/07 zur Detektion der nukleären Verteilung von γ H2AX nach Bleomycininkubation und quantitative Auswertung der γ H2AX-Foci.....	115

Abb. 44	Vergleich zwischen DSBR-Frequenzen und Reparaturkapazität nach Bleomycinschadwirkung für die primären Epithelzellen.....	120
Abb. 45	Vergleich zwischen DSBR-Frequenzen und Reparaturkapazität nach Bleomycinschadwirkung für die primären EMT-Zellen.....	123
Abb. 46	Altersverteilung der Brustkrebspatientinnen, Kontrollprobandinnen und Mitglieder aus Hochrisikofamilien.....	128
Abb. 47	Unterschiede zwischen den absoluten NHEJ-Frequenzen der primären Lymphozyten von Kontrollprobandinnen, Brustkrebspatientinnen und Mitgliedern aus Hochrisikofamilien.....	129
Abb. 48	Unterschiede zwischen den relativen DSBR-Frequenzen der primären Lymphozyten von Kontrollprobandinnen, Frauen mit benigner Brustläsion, Brustkrebspatientinnen und Mitgliedern aus Hochrisikofamilien	130
Abb. 49	Altersabhängigkeit der absoluten DSBR-Frequenzen in primären Lymphozyten von Kontrollprobandinnen und Brustkrebspatientinnen.....	132
Abb. 50	Einfluss der Menopause auf die DSBR-Frequenzen der primären Lymphozyten von Brustkrebspatientinnen und Kontrollprobandinnen	133
Abb. 51	Einfluss von Kinderlosigkeit auf die NHEJ-Aktivitäten der primären Lymphozyten der Kontrollprobandinnen	134
Abb. 52	Einfluss ionisierender Strahlenexposition auf die NHEJ-Aktivitäten der primären Lymphozyten von Brustkrebspatientinnen und Kontrollprobandinnen.....	135
Abb. 53	Einfluss des Differenzierungsgrades der Zellen im Brusttumor auf die NHEJ-Aktivitäten der primären Lymphozyten aus denselben Patientinnen	136
Abb. 54	Einfluss der Hormonrezeptorexpression für Östrogen, Progesteron und Her2neu in den Brusttumoren auf die DSBR-Frequenzen in den primären Lymphozyten	137
Abb. 55	Hierarchie der Genauigkeitskontrolle in der DSBR.....	160
Abb. 56	Schematische Darstellung des ATM-Proteins.....	217

9.3 Tabellenverzeichnis

Tab. 1	Plasmide.....	36
Tab. 2	shRNA.....	36
Tab. 3	Bakterienstämme.....	36
Tab. 4	Humane Zelllinien.....	38
Tab. 5	Charakteristika der IHC-Färbung.....	52
Tab. 6	<i>ATM</i> -Defektzelllinien mit klinischem Phänotyp, zugehörigen Mutationen und Änderungen im <i>ATM</i> -Proteinniveau	69
Tab. 7	<i>CHEK2</i> -Defektzelllinien mit klinischem Phänotyp, zugehörigen Mutationen und Änderungen im <i>Chk2</i> -Proteinniveau.....	75
Tab. 8	Adhärenz Zelllinien der Brust, klinischer Phänotyp, deren <i>TP53</i> -Status und <i>p53</i> -Proteingehalt im Vergleich zur Kontrollzelllinie MCF12a	81
Tab. 9	DSBR-Frequenzen der Brustepithelzelllinien	87

Tab. 10	Medianwerte der DSBR-Frequenzen der primären Zellen aus Brusttumorgewebe und der Lymphozyten aus dem Blut von Brustkrebspatientinnen.....	100
Tab. 11	Relative γ H2AX-Focianzahlen und Reparaturkapazität nach Bleomycinschadwirkung und DSBR-Frequenzen der primären Epithelzellen nach Transfektion mit DSBR-Plasmiden.....	118
Tab. 12	Relative γ H2AX-Focianzahlen und Reparaturkapazität nach Bleomycinschadwirkung und DSBR-Frequenzen der primären EMT-Zellen nach Transfektion mit DSBR-Plasmiden.....	121
Tab. 13	Anzahl, mittleres Alter und Altersspektrum der untersuchten Probandinnen	127
Tab. 14	Vergleich zwischen sporadischen <i>Basal-like</i> -Brusttumoren und Tumoren von <i>BRCA1</i> -Mutationsträgerinnen auf der Grundlage der Literatur (Turner and Reis-Filho, 2006).....	137
Tab. 15	Proteingehalte der lymphoblastoiden Zelllinien bezogen auf die Kontrollzelllinie 416MI.....	209
Tab. 16	DSBR-Frequenzen in primären Zellen aus Brusttumorgewebe sowie Lymphozyten aus Blut entsprechender Patientinnen.....	213
Tab. 17	DSBR-Aktivitäten relativ zu den Medianwerten des jeweiligen Zelltyps und DSBR-Mechanismus	216

9.4 Zusätzliche Tabellen und Abbildungen

Typ	Zelllinie	Mutationen	Relative Proteinexpression bezogen auf die Kontrollzelllinie 416MI						
			ATM	Brca2	Brca1	Nibrin	Rad51	Chk2	p53
Kontrolle	416MI	keine bekannt	1,0	1,0	1,0*	1,0	1,0	1,0	1,0
<i>BRCA1</i> -DSBR-Defekttyp	HA166	<i>BRCA1</i> C61G/wt	1,2	nq.	0,02*°	nq.	nü.	nq.	nq.
	HCC1937BL	<i>BRCA1</i> 5382insC/wt	1,2	nq.	0,03*°	nq.	nü.	nq.	nq.
	HA204	<i>ATM</i> 7636del9/7636del9	0,1°	nq.	nq.	nq.	nü.	nq.	0,3
	GM01526E	<i>ATM</i> M1T/M1T	nd.	nq.	nq.	nq.	nü.	nq.	nq.
<i>BRCA2</i> -DSBR-Defekttyp	HA238	<i>BRCA2</i> 5946delCT/wt	0,7	0,5	nq.	nq.	0,9	nq.	nq.
	HA56	<i>ATM</i> 3085insA/3880insA	nd.	0,9	nq.	nq.	0,7	nq.	nq.
	HA101	<i>ATM</i> 496+5G>A(IVS7)/D2625E, A2626P	0,03°	nq.	nq.	nq.	nq.	nq.	nq.
	HA201	<i>ATM</i> 1066-6T>G(IVS10)/wt <i>CHEK2</i> IVS2+1G/wt	0,5	nq.	nq.	nq.	nq.	nq.	nq.
<i>NBN/RAD50</i> -DSBR-Defekttyp	HA226	<i>NBN</i> 657del5/657del5	0,8	nq.	nq.	nd.	nü.	nq.	nq.
	HA239	<i>RAD50</i> R1099X/X1313Y	0,8	1,0	nq.	0,06	nü..	0,5	0,2
	HA388	<i>ATM</i> 9021insA/V2716A	0,08°	0,8	nq.	nq.	nü..	0,5	0,1
	HA187	<i>ATM</i> E1978X/R250X	nü.	nü.	nü.	nü.	nü.	nü.	nü.
	HA202	<i>ATM</i> 1066-6T>G(IVS10)/wt 53BP1 1531del6/wt	nü.	nü.	nü.	nü.	nü.	nü.	nü.
Nicht klassifiziert	HA126	<i>ATM</i> Y171X/Y171X	nd.	nq.	nq.	nq.	nü.	nq.	nq.
	HA306	<i>ATM</i> 1561del2/R1875X	nü.	nü.	nü.	nü.	nü.	nü.	nü.
	HA433	<i>ATM</i> 8068delT/8068delT	nd.	nq.	nq.	nq.	nq.	nq.	nq.
<i>CHEK2</i>	HA464	<i>CHEK2</i> I157T/I157T	0,6	nq.	nq.	nq.	nq.	nq.	nq.
	HA456	<i>CHEK2</i> I157T/I157T	0,7	nq.	nq.	nq.	nq.	nq.	nq.
	HA455	<i>CHEK2</i> del(9,10)/wt <i>NBN</i> 657del5/wt	1,2	nq.	nq.	0,7	nq.	0,5	nq.

Tab. 15 Proteingehalte der lymphoblastoiden Zelllinien bezogen auf die Kontrollzelllinie 416MI

Die Proteinmenge von 416MI wurde für jeden Faktor als 1 definiert. Die Proteinexpressionsniveaus aller anderen Zelllinien wurde auf 416MI bezogen. Auf jedem Gel wurden die Kontrollzelllinien 416MI und HA169 mit aufgetragen und standen für die Korrelation der Proteinmengen zur Verfügung. *= Für HA166 und HA204 erfolgte der Bezug des Brca1-Proteins auf die Kontrollzelllinie HA169. °= Proteine wurden erst nach langer Exposition der Autoradiographien sichtbar und quantifiziert, nd.= auch nach langer Exposition der Autoradiographien konnte kein Protein detektiert werden, nü.= Proteingehalte wurden nicht geprüft, nq.= Proteingehalte wurde detektiert, jedoch nicht quantifiziert

Tumor	Epithelzellen				EMT-Zellen				Fibroblasten				Lymphozyten						
	NHEJ	SSA/HR (k. H.)	SSA/HR (l. H.)	HR (k. H.)	TE	NHEJ	SSA/HR (k. H.)	SSA/HR (l. H.)	HR (k. H.)	TE	NHEJ	SSA/HR (k. H.)	SSA/HR (l. H.)	HR (k. H.)	TE	NHEJ	SSA/HR (k. H.)	SSA/HR (l. H.)	TE
G2080/ 05					3,6	0,281 (0,000)	1,236 (0,056)	1,208 (0,028)	0,169 (0,112)										
G2182/ 05	0,029 (0,029)	0,145 (0,067)	0,260 (0,025)	0,015 (0,015)	6,8														
G495/ 06					34,7	0,121 (0,059)	0,384 (0,177)	0,293 (0,061)	0,018 (0,009)										
G550/ 06					8,7	0,614 (0,036)	1,040 (0,370)	1,139 (0,284)	0										
G762/ 06											0,063 (0,034)	0,222 (0,034)	0,099 (0,034)	0,027 (0,022)	7,4				
G765/ 06											0,052 (0,020)	0,137 (0,021)	0,114 (0,017)	0,016 (0,012)	20,5				
G777/ 06	0,291 (0,135)	0,267 (0,059)	0,314 (0,114)	0,058 (0,082)	5,7						0,047 (0,013)	0,211 (0,014)	0,169 (0)	0,028 (0,028)	7,1				
G799/ 06											0,043 (0,030)	0,222 (0,037)	0,215 (0,018)	0,036 (0,027)	9,3				
G1000/ 06											0,063 (0,032)	0,123 (0,018)	0,091 (0,015)	0,004 (0,006)	33,6				
G1133/ 06											0,052 (0,009)	0,042 (0,005)	0,221 (0,040)	0,016 (0,009)	20,5	0,095 (0,027)			31,8
G1160/ 06											0,167 (0,026)	0,066 (0,026)	0,470 (0,011)	0,012 (0)	34,3	0,069 (0,011)	0,159 (0,080)	0,099 (0,022)	50,4
G1199/ 06											0,231 (0,041)	0,210 (0,025)	0,507 (0,058)	0,029 (0,013)	34,3	0,085 (0,016)	0,086 (0,008)	0,056 (0,006)	43,5
G1506/ 06											0,085 (0,014)				40,2				
G1523/ 06											0,009 (0,013)	0,130 (0,057)	0,084 (0,023)	0,009 (0,013)	7,2				
G1628/ 06											0,027 (0,022)	0,122 (0,014)	0,081 (0,027)		7,4	0,031 (0,008)	0,114 (0,033)	0,155 (0,012)	55,3
G1646/ 06					3,3	0,092 (0,031)					0,019 (0,018)	0,176 (0,034)	0,109 (0,007)	0,010 (0,007)	14,0	0,021 (0,023)			29,8

Tumor	Epithelzellen				EMT-Zellen				Fibroblasten				Lymphozyten						
	NHEJ	SSA/HR (k. H.)	SSA/HR (l. H.)	HR (k. H.)	TE	NHEJ	SSA/HR (k. H.)	SSA/HR (l. H.)	HR (k. H.)	TE	NHEJ	SSA/HR (k. H.)	SSA/HR (l. H.)	HR (k. H.)	TE	NHEJ	SSA/HR (k. H.)	SSA/HR (l. H.)	TE
G1655/ 06											0,015 (0,009)	0,258 (0,003)	0,117 (0,016)	0,028 (0)	21,7				
G1676/ 06	0,467 (0,096)				0,7						0,021 (0,012)	0,199 (0,026)	0,203 (0,027)	0,013 (0,010)	15,7	0,028 (0,009)			46,2
G1711/ 06						0 (0)	0,051 (0)		7,8		0,030 (0,031)	0,168 (0,060)	0,084 (0,022)	0,030 (0,031)	11,1	0,012 (0,010)	0,085 (0)		32,2
G2074/ 06											0 (0)	0 (0)			2,9	0,020 (0,002)			35,4
G2078/ 06						0 (0)			9,9							0,004 (0,004)			27,3
G295/ 07						0,013 (0,009)			10,1							0,008 (0,008)			16,5
G321/ 07											0 (0)				4,7	0,019 (0,009)	0,127 (0,080)	0,122 (0,052)	47,3
G323/ 07						0,013 (0)			14,9		0 (0)	0,054 (0,026)	0,046 (0,016)	0,004 (0,006)	16,0				
G369/ 07											0,019 (0,009)	0,382 (0,136)	0,419 (0,062)	0,007 (0,010)	28,3	0,007 (0)			15,7
G553/ 07	0,268 (0,097)	0,142 (0,039)	0,094 (0)	0 (0)	4,2														
G636/ 07	0,179 (0,075)			0,037 (0,017)	13,3						0,012 (0,010)	0,050 (0,020)	8,386 (0,686)	0,021 (0,015)	16,2				
G732/ 07	0,092 (0,026)			0,028 (0,028)	3,6						0 (0)	0,036 (0)	0,132 (0,139)	0 (0)	7,9	0,045 (0,018)	0,409 (0,109)	2,729 (0,885)	68,0
G750/ 07											0,025 (0,013)	0,052 (0,028)	0,076 (0,031)	0 (0)	27,1				
G786/ 07	0,137 (0,035)	0,062 (0,018)	0,175 (0,088)	0 (0)	5,3	0,070 (0,028)			14,3							0,041 (0,020)			35,7
G1065/ 07	0,356 (0,251)	3,911 (0,889)	4,978 (0,711)	1,244 (0,356)	1,1														
B8172/ 07	0,134 (0,108)	0,153 (0,071)	0,287 (0,081)	0 (0)	3,5														

Tumor	Epithelzellen				EMT-Zellen				Fibroblasten				Lymphozyten						
	NHEJ	SSA/HR (k. H.)	SSA/HR (l. H.)	HR (k. H.)	TE	NHEJ	SSA/HR (k. H.)	SSA/HR (l. H.)	HR (k. H.)	TE	NHEJ	SSA/HR (k. H.)	SSA/HR (l. H.)	HR (k. H.)	TE	NHEJ	SSA/HR (k. H.)	SSA/HR (l. H.)	TE
B8318/ 07						0 (0)	0,068 (0,024)		0,051 (0,073)	3,9	0,078 (0,028)			0,033 (0,033)	3,4	0,076 (0,012)	0,069 (0,026)	0,083 (0,014)	28,9
B8407/ 07						0,007 (0,005)	0,072 (0,029)	0,623 (0,139)	0,004 (0,005)	18,4	0,016 (0,022)	0,181 (0,029)	0,197 (0,040)	0 (0)	8,5	0,018 (0,006)			25,9
B8565/ 07	0,063 (0,026)			0 (0)	6,4											0 (0)			10,8
B8759/ 07						0,004 (0,006)	0,036 (0,023)	0,357 (0,054)	0 (0)	14,9									
B12666/ 07	0,117 (0,084)	0,317 (0,131)	0,163 (0,023)	0,092 (0,024)	4,1											0,010 (0,002)			26,2
B1004/ 08											0,022 (0,031)	0,137 (0,074)	0,268 (0,020)	0 (0)	3,7	0 (0)	0,105 (0,042)	0,025 (0,009)	29,2
B1154/ 08	0 (0)			0 (0)	2,9	0,091 (0,074)	0,084 (0,018)		0 (0)	6,0									
B1905/ 08	0,063 (0,052)	0,488 (0,021)		0,042 (0,042)	4,7	0 (0)			0,006 (0,006)	9,2	0,049 (0,018)	0,232 (0,078)	0,194 (0,034)	0,003 (0,004)	24,4	0,073 (0,031)	1,932 (0,664)	1,371 (0,702)	29,8
B1926/ 08						0,030 (0,018)				16,9	0,011 (0,003)			0,021 (0)	14,0	0,019 (0)	0,222 (0,027)	0,122 (0,045)	25,2
B4532/ 08											0,015 (0,011)	0,299 (0,024)		0,031 (0,010)	27,1	0,028 (0,017)	0,204 (0,027)		43,2
B4574/ 08																0,010 (0,008)			18,3
B4617/ 08	0,052 (0,010)				4,8														
B4823/ 08	0,038 (0,017)	0,354 (0,099)	0,325 (0,085)	0,067 (0,052)	6,6											0,006 (0,004)	0,074 (0,007)		71,3
B4841/ 08	0,062 (0,088)	0,435 (0,096)	0,472 (0,104)	0,140 (0,076)	2,1						0,005 (0,002)	0,067 (0,019)	0,035 (0,005)	0,009 (0,003)	27,3	0,003 (0,002)	0,032 (0,011)	0,060 (0,008)	61,3
B4844/ 08						0,016 (0,001)	0,040 (0,025)		0,005 (0,007)	6,8	0,021 (0)	0,055 (0,010)		0,021 (0,015)	9,7	0,002 (0,003)			32,1
Median	0,105	0,292	0,287	0,032		0,014	0,072	0,623	0,005		0,022	0,133	0,132	0,014		0,021	0,091	0,118	

Tab. 16 DSBR-Frequenzen in primären Zellen aus Brusttumorgewebe sowie Lymphozyten aus Blut entsprechender Patientinnen

Die absoluten DSBR-Frequenzen zu den primären Epithelzellen, EMT-Zellen, Fibroblasten und Lymphozyten der Brustkrebspatientinnen wurden in der Tabelle den Tumormaterialnummern zugeordnet. Hierbei wurden die Mittelwerte für jede Zellart und jeden DSBR-Weg (n=2-3) angegeben. In der Klammer befinden sich die Standardabweichungen. In dieser Tabelle wurden nur die Ergebnisse von auswertbaren Messungen (Transfektionseffizienz TE >0,5 %) verzeichnet. Die Medianwerte für Epithelzellen, EMT-Zellen und Fibroblasten wurden aus den Werten dieser Tabelle ermittelt. Die Medianwerte der primären Lymphozyten entsprechen den Medianwerten aller 174 Brustkrebspatientinnen. Abkürzungen: H.=Homologie, k.=kurze, l.=lange, TE=Transfektionseffizienz in %

Tumor	Epithelzellen				EMT-Zellen				Fibroblasten				Lymphozyten		
	NHEJ	SSA/HR (k. H.)	SSA/HR (l. H.)	HR (k. H.)	NHEJ	SSA/HR (k. H.)	SSA/HR (l. H.)	HR (k. H.)	NHEJ	SSA/HR (k. H.)	SSA/HR (l. H.)	HR (k. H.)	NHEJ	SSA/HR (k. H.)	SSA/HR (l. H.)
G2080/ 05 ^{1,4}			17,1	1,9	34,2										
G2182/ 05 ⁵	0,3	0,5	0,9	0,5											
G495/ 06 ^{1,4}			5,3	0,5	3,6										
G550/ 06 ¹			14,4	1,8	0										
G762/ 06 ¹									2,9	0,9	0,8	1,9			
G765/ 06 ¹									2,4	1,0	0,9	1,1			
G777/ 06 ^{1*5}	2,8	0,9	1,1	1,8					2,2	1,6	1,3	1,9			
G799/ 06 ^{1,4}									2,0	1,7	1,6	2,5			
G1000/ 06 ¹									2,9	0,9	0,7	0,3			
G1133/ 06 ¹									2,4	0,3	1,7	1,1	4,5		
G1160/ 06 ¹									7,7	0,5	3,6	0,8	3,3	1,7	0,8
G1199/ 06 ^{1,4}									10,7	1,6	3,8	2,0	4,0	0,9	0,5
G1506/ 06 ¹									3,9						
G1523/ 06 ⁵									0,4	1,0	0,6	0,6			
G1628/ 06 ⁵									1,3	0,9	0,6		1,5	1,3	1,3
G1646/ 06 ^{1*5}					6,3				0,9	1,3	0,8	0,7	1,0		

Tumor	Epithelzellen				EMT-Zellen				Fibroblasten				Lymphozyten		
	NHEJ	SSA/HR (k. H.)	SSA/HR (l. H.)	HR (k. H.)	NHEJ	SSA/HR (k. H.)	SSA/HR (l. H.)	HR (k. H.)	NHEJ	SSA/HR (k. H.)	SSA/HR (l. H.)	HR (k. H.)	NHEJ	SSA/HR (k. H.)	SSA/HR (l. H.)
G1655/ 06 ⁵									0,7	1,9	0,9	1,9			
G1676/ 06 ^{1*5}	4,5								1,0	1,5	1,5	0,9	1,3		
G1711/ 06 ^{5*8k}					0	0,7			1,4	1,3	0,6	2,1	0,6	0,9	
G2074/ 06 ³									0	0			0,9		
G2078/ 06 ^{3*8h}					0								0,2		
G295/ 07 ^{5*8k}					0,9								0,4		
G321/ 07 ³									0				0,9	1,4	1,0
G323/ 07 ^{3*8h}					0,9				0	0,4	0,3	0,3			
G369/ 07 ²									0,9	2,9	3,2	0,5	0,3		
G553/ 07 ¹	2,6	0,5	0,3	0											
G636/ 07 ^{1*5}	1,7			1,1					0,6	0,4	63,5	1,4			
G732/ 07 ^{5*8k}	0,9			0,9					0	0,3	1,0	0	2,2	4,5	23,1
G750/ 07 ⁵									1,1	0,4	0,6	0			
G786/ 07 ^{1,2*8h}	1,3	0,2	0,6	0	4,84								1,9	2,3	
G1065/ 07 ⁴	16,4	29,3	37,7	86,0											
B8172/ 07 ⁵	1,3	0,5	1,0	0											

Tumor	Epithelzellen				EMT-Zellen				Fibroblasten				Lymphozyten			
	NHEJ	SSA/HR (k. H.)	SSA/HR (l. H.)	HR (k. H.)	NHEJ	SSA/HR (k. H.)	SSA/HR (l. H.)	HR (k. H.)	NHEJ	SSA/HR (k. H.)	SSA/HR (l. H.)	HR (k. H.)	NHEJ	SSA/HR (k. H.)	SSA/HR (l. H.)	HR (k. H.)
B8318/ 07 ^{4h}					0	0,9		10,4	5,4			6,6	3,6	0,8		0,7
B8407/ 07 ^{5pk}					0,5	1,0	1,0	0,7	0,7	1,4	1,5	0	0,8			
B8565/ 07 ^{3bh}	0,6			0									0			
B8759/ 07 ^{3s}					0,3	0,5	0,6	0								
B12666 /07 ^{4s}	1,1	1,1	0,6	2,8									0,5			
B1004/ 08 ⁵									1,0	1,0	2,0	0	0	1,2	0,2	0,2
B1154/ 08 ¹	0			0	6,3	1,2	0	0								
B1905/ 08 ^{2h}	0,6	1,7		1,3	0								0,1	1,7	1,3	
B1926/ 08 ^{1bh}					2,0			1,2	2,3	1,7	1,5	0,2	3,5	21,2	11,6	
B4532/ 08 ⁵									0,5			1,5	0,9	2,4	1,0	
B4574/ 08 ²									0,7	2,2		2,1	1,4	2,2		
B4617/ 08 ^{3bh}	0,5												0,5			
B4823/ 08 ^{3,4bh}	0,4	1,2	1,1	2,1									0,3	0,8		
B4841/ 08 ^{3,4bh}	0,6	1,5	1,6	4,3					0,2	0,5	0,3	0,6	0,2	0,3	0,5	
B4844/ 08 ^{5pk}					1,1	0,6	1,0		0,9	0,4		1,4	0,1			

Tab. 17 DSBR-Aktivitäten relativ zu den Medianwerten des jeweiligen Zelltyps und DSBR-Mechanismus

Die DSBR-Frequenzen zu den primären Epithelzellen, EMT-Zellen, Fibroblasten und Lymphozyten der Brustkrebspatientinnen wurden durch die jeweiligen ermittelten Medianwerte dividiert (siehe Tab. 16). Dadurch wurden Erhöhung oder Senkung der DSBR-Daten im Vergleich zu den jeweiligen Medianwerten direkt sichtbar. Mit den Kopfnoten wurde hypothetisch die Einteilung in die klassifizierten DSBR-Defekttypen gekennzeichnet. (¹=BRCA1-DSBR-Defekttyp Abschnitt 4.1.1, NHEJ mindestens 1,6-fach erhöht; ²=BRCA2-DSBR-Defekttyp Abschnitt 4.1.2, SSA/HR mindestens 1,6-fach erhöht, HR Senkung fakultativ; ³=NBN/RAD50-DSBR-Defekttyp Abschnitt 4.1.3, NHEJ/SSA-Senkung auf mindestens 0,6; ⁴= TP53-DSBR-Defekttyp Abschnitt 4.1.7, HR

mindestens 2-fach, SSA/HR mindestens 1,6-fach erhöht ⁵=unauffällig, keine markanten Änderungen, * =Epithel-/EMT-Zellen und Fibroblasten/Lymphozyten gemessen, ^h=putativ hereditär, ^s=putativ nicht hereditär, ^k=keine Aussage möglich) Die Veränderungen, die für die Einteilung in die DSBR-Defektypen als markant galten, wurden fett markiert. Die in den Klammern angegebenen Faktoren gelten für alle Zellarten. Abkürzungen: H.=Homologie, k.=kurze, l.=lange

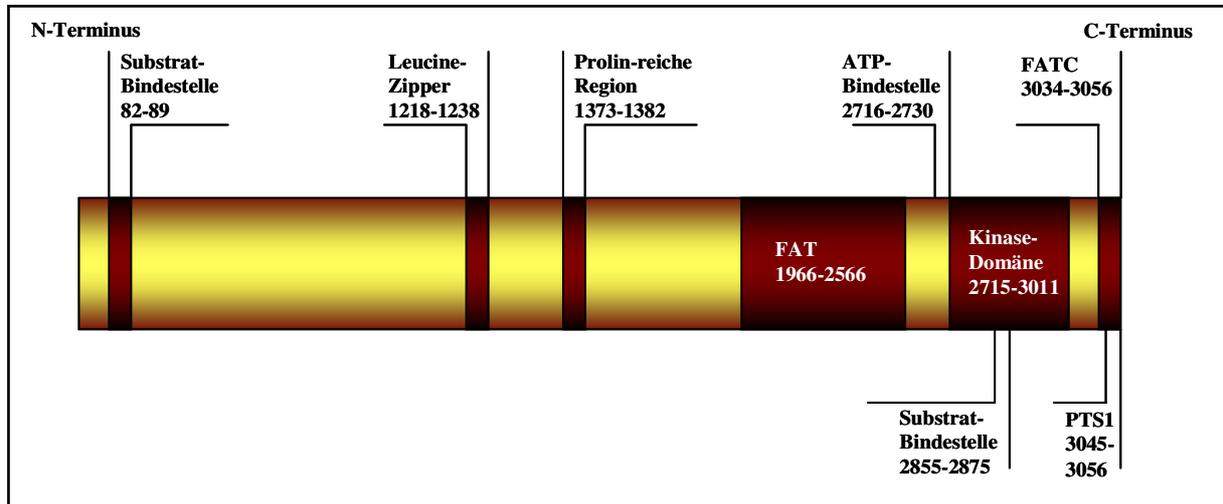


Abb. 56 Schematische Darstellung des ATM-Proteins

Die Darstellung des ATM-Proteins inklusive der wichtigsten Domänen wurde nach Lavin *et. al*, 2004 modifiziert. Dabei wurden die Aminosäure-Regionen für jede Domäne und Bindestelle angegeben.

9.5 Danksagung

Frau Prof. Dr. Wiesmüller danke ich sehr für die Aufnahme in ihre Arbeitsgruppe, die interessanten und abwechslungsreichen Aufgabenstellungen, die Betreuung dieser Arbeit und ihre stete Förderung, Diskussions- und Hilfsbereitschaft.

Bei Herrn Prof. Dr. Grosse bedanke ich mich ganz herzlich für die Übernahme des Erstgutachtens.

Allen MitarbeiterInnen des EOL danke ich für die Unterstützung und gute Zusammenarbeit. Dies gilt insbesondere für Cindy Baumann und Simone Siehler. Wir waren als Dreiergespann ein super Team und haben viele Hürden gemeinsam überwunden!

Für die Unterstützung im Rahmen der Laborarbeit möchte ich mich vor allem bei Marina Wager, Heike Göggerle, Julia Kaufmann und Cathleen Petzold bedanken.

Dem Personal der Universitätsfrauenklinik und allen freiwilligen Spenderinnen danke ich für ihre Blutspenden. In diesem Rahmen möchte ich mich auch recht herzlich bei allen Ärzten und Krankenschwestern für die Blutabnahmen bedanken. Insbesondere danke ich Dr. Miriam Uhl (Universitätsfrauenklinik Ulm), Dr. Michael Denkinger (Bethesda Ulm) und Dr. Schrezenmeier (Transfusionsmedizin Ulm).

Frau Dr. Koretz danke ich für die Übergabe der Tumorproben und die Hilfestellungen bei allen Fragen rund um die Tumordiagnostik.

Für die Erstellung der Datenbanken und die Eingabe der Daten möchte ich mich recht herzlich bei Annette Engelke, Thomas Zemmler und Christian Hecker bedanken.

All meinen Freunden danke ich für die moralische Unterstützung und das Verständnis auch in schwierigeren Zeiten!

Von ganzem Herzen danke in meiner Familie für die moralische und finanzielle Unterstützung, vor allem in der Endphase meiner Doktorarbeit!

9.6 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Marlen Keimling
Geburtstag	28.11.1979
Geburtsort	Sömmerda
Familienstand	ledig

Schulbildung und beruflicher Werdegang

04/2004-12/2008	Doktorandin in der AG von Frau Prof. Dr. Lisa Wiesmüller, Sektion gynäkologische Onkologie an der Universitätsfrauenklinik in Ulm Themengebiet: „DNA-Doppelstrangbruchreparatur-Dysfunktion bei Brustkrebs: Etablierung und Evaluierung eines funktionellen Tests als Biomarker für ein erhöhtes Risiko.“
03/2003-01/2004	Diplomandin am Lehrstuhl für Lebensmitteltoxikologie am Institut für Ernährungswissenschaften in Jena Diplomthema:“ Die Wirkung des Darmfermentationsproduktes Butyrat auf humane Kolonadenom- und Kolonkarzinomzelllinien unter serumfreien und serumhaltigen Bedingungen.“
09/1998-03/2004	Studium der Ernährungswissenschaft an der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena Abschluss: Diplom Trophologin
09/1991-08/1998	Abitur am Prof. Fritz-Hofmann-Gymnasium in Kölleda

Publikationen

Keimling, M., Wiesmüller, L. (2009). DNA double-strand break repair activities in mammary epithelial cells - influence of endogenous p53 variants. *Carcinogenesis*. 30(7):1260-8

Keimling, M., Kaur, J., Bagadi, S.A., Kreienberg, R., Wiesmüller, L., Ralhan, R. (2008). A sensitive test for the detection of specific DSB repair defects in primary cells from breast cancer specimens. *Int J Cancer*, 123(3):730-6.

Gatz SA., Keimling M., Baumann C., Dörk T., Debatin KM., Fulda S., Wiesmüller L. (2008). Resveratrol modulates DNA double-strand break repair pathways in an ATM/ATR-p53-and – Nbs1-dependent manner. *Carcinogenesis*. 29(3):519-527.

Maxim Keimling

Selbständigkeitserklärung

Ich, Marlen Keimling, erkläre an Eides statt, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema „DNA-Doppelstrangbruchreparatur-Dysfunktion bei Brustkrebs: Etablierung und Evaluierung eines funktionellen Tests als Biomarker für ein erhöhtes Risiko“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.



Marlen Keimling