

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Zentrum für Onkologie
Klinik für Strahlentherapie und Radioonkologie
Labor für Strahlenbiologie und experimentelle Radioonkologie

Prof. Dr. rer. nat. Kai Rothkamm

CHK1 verhindert Replikationsstress in resistenten Tumor-initiiierenden Brustkrebszellen mit einem DNA-Reparaturdefekt in Homologer Rekombination

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von:

Saskia Alexandra Becker
aus Hamburg

Hamburg 2022

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 20.09.2022**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. Manfred Jücker

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: Prof. Dr. Kerstin Borgmann

Prüfungsausschuss, dritte/r Gutachter/in: Prof. Dr. Kerstin Kutsche

Inhalt

I.	Artikel	4
II.	Ergänzende Materialien	21
III.	Abkürzungsverzeichnis	25
IV.	Darstellung der Publikation	26
	1. Einleitung.....	26
	2. Ergebnisse	27
	2.1 <i>Das krankheitspezifische Überleben hängt von der RAD51- und CHK1- mRNA-Expression in luminalen und TNBC-Brustkrebstumoren ab</i>	27
	2.2 <i>Keine Korrelation von HR-Kapazität, Schutz der Replikationsgabel und Empfindlichkeit gegenüber PARP1-Inhibition und MMC-Behandlung</i>	28
	2.3 <i>Assoziation von MMC-Empfindlichkeit und Bildung von DNA-Schadensfoci in der S-Phase</i>	29
	2.4 <i>Aktivierung der DNA-Schadensreaktion führt zu MMC-Resistenz durch Vermeidung von Replikationsstress</i>	30
	2.5 <i>Die Aktivierung von CHK1 schützt vor DNA-Schäden in der S-Phase und vermittelt die Resistenz gegen MMC in HR-defizienten Zelllinien</i>	31
	3. Diskussion	31
V.	Zusammenfassung.....	34
VI.	Summary.....	34
VII.	Literaturverzeichnis	35
VIII.	Interessenkonflikt	38
IX.	Finanzielle Unterstützung.....	38
X.	Erklärung des Eigenanteils der Publikation	38
XI.	Danksagung.....	39
XII.	Lebenslauf.....	40
XIII.	Eidesstattliche Versicherung	41



Article

Prevention of DNA Replication Stress by CHK1 Leads to Chemoresistance Despite a DNA Repair Defect in Homologous Recombination in Breast Cancer

Felix Meyer ^{1,†}, Saskia Becker ^{1,†}, Sandra Classen ¹, Ann Christin Parplys ¹, Wael Yassin Mansour ^{1,2}, Britta Riepen ¹, Sara Timm ³, Claudia Ruebe ³, Maria Jasin ⁴, Harriet Wikman ⁵, Cordula Petersen ⁶, Kai Rothkamm ¹ and Kerstin Borgmann ^{1,*}

¹ Laboratory of Radiobiology and Experimental Radiooncology, Center of Oncology, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, 20246 Hamburg, Germany; fe.meyer@uke.de (F.M.); saskiaalexandra.becker@uke.de (S.B.); sandra.classen@uke.de (S.C.); a.parplys@uke.de (A.C.P.); w.mansour@uke.de (W.Y.M.); riepen@uke.de (B.R.); k.rothkamm@uke.de (K.R.)

² Tumor Biology Department, National Cancer Institute, Cairo University, Cairo 11796, Egypt

³ Department of Radiation Oncology, Saarland University, 66421 Hamburg/Saar, Germany; sara.timm@uks.eu (S.T.); claudia.ruebe@uks.eu (C.R.)

⁴ Developmental Biology Program, Memorial Sloan Kettering Cancer Center, New York, NY 10065, USA; m-jasin@ski.mskcc.org

⁵ Department of Tumor Biology, University Center Hamburg-Eppendorf, 20246 Hamburg, Germany; h.wikman@uke.de

⁶ Department of Radiotherapy and Radiooncology, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, 20246 Hamburg, Germany; cor.petersen@uke.de

* Correspondence: borgmann@uke.de; Tel.: +49-40-74105-3596

† These authors contributed equally to the manuscript.

Received: 10 December 2019; Accepted: 14 January 2020; Published: 17 January 2020

Abstract: Chromosomal instability not only has a negative effect on survival in triple-negative breast cancer, but also on the well treatable subgroup of luminal A tumors. This suggests a general mechanism independent of subtypes. Increased chromosomal instability (CIN) in triple-negative breast cancer (TNBC) is attributed to a defect in the DNA repair pathway homologous recombination. Homologous recombination (HR) prevents genomic instability by repair and protection of replication. It is unclear whether genetic alterations actually lead to a repair defect or whether superior signaling pathways are of greater importance. Previous studies focused exclusively on the repair function of HR. Here, we show that the regulation of HR by the intra-S-phase damage response at the replication is of overriding importance. A damage response activated by Ataxia telangiectasia and Rad3 related-checkpoint kinase 1 (ATR-CHK1) can prevent replication stress and leads to resistance formation. CHK1 thus has a preferred role over HR in preventing replication stress in TNBC. The signaling cascade ATR-CHK1 can compensate for a double-strand break repair error and lead to resistance of HR-deficient tumors. Established methods for the identification of HR-deficient tumors for Poly(ADP-Ribose)-Polymerase 1 (PARP1) inhibitor therapies should be extended to include analysis of candidates for intra-S phase damage response.

Keywords: triple-negative breast cancer (TNBC); chromosomal instability (CIN); CIN70 score; homologous recombination (HR); DNA-damage response (DDR); CHK1

1. Introduction

Breast cancer is a very heterogeneous disease whose prognosis is determined by the molecular subtype. Tumors of the triple-negative breast cancer (TNBC) subtype show the worst prognosis [1], which could be attributed to increased chromosomal instability (CIN) [2]. Using the CIN, a gene expression profile consisting of 70 genes associated with a functional aneuploidy (CIN70 score) was extracted. The CIN70 score is the highest for TNBCs compared to other subtypes and a correlation of high/intermediate CIN70 score with prognosis has been observed in numerous studies and tumor entities [3]. A high CIN70 value may be caused by defects in DNA repair, as all BRCA1/2 deficient tumors and one in four sporadically occurring TNBCs show a defect in homologous recombination-mediated (HR-mediated) DNA double-strand break (DSB) repair. HR represents the main DSB repair pathway in the S-phase [4]. It processes DSBs with two open ends, one-ended replication-associated DSB and stalled DNA replication forks.

Two-ended DSBs are repaired by synthesis-dependent strand annealing (SDSA) [5]. As first step DNA end resection is initiated via the nucleases CtIP and MRE11 and is completed by DNA2, EXO1 and BLM helicase [6]. RPA binds the single-stranded DNA overhangs and activates ATR/ATRIP, Claspin and CHK1, thereby initiating HR [7]. RPA is then replaced by RAD51 with the involvement of several HR proteins [5]. One-ended DSBs arise when a replication fork collides with a single-strand DNA break (SSB) or when a replication fork collapses [8]. They are repaired by break-induced replication (BIR). Stalled replication forks are usually protected from nucleolytic degradation by numerous HR factors [9] or SMARCAL1 and ZRANB3 [10]. However, insufficient stabilization leads to collapse or breakage of the replication fork. Cellular replication stress, dNTP depletion, or collision of replication forks with DNA lesions results in fork reversal or fork regression and chicken foot formation [11]. SMARCAL1 is recruited by RPA-bound ssDNA to the replication fork [12], while Poly(ADP-Ribose)-Polymerase 1 (PARP1) is involved in fork reversal [11]. The RPA-bound ssDNA segments at the paused replication fork lead to the activation of ATR, which phosphorylates CHK1. ATR is the most important DNA damage-related kinase in S-phase, where it has a major impact on DNA repair and the regulation of DNA replication [13]. ATR phosphorylates the intra-S phase kinase CHK1, whereupon CHK1 translocates into the nucleus and undergoes autophosphorylation [14]. Under replication stress, CHK1 is associated with phosphorylated Claspin, which enhances ATR-dependent phosphorylation and supports recruitment of CHK1 to the replication fork [15]. Thus, ATR-mediated phosphorylation of CHK1 activates DNA repair and the intra-S phase checkpoint. CHK1 regulates elongation [16] and activation of replication origins, stabilizes replication forks [17], and delays S-phase progression [14,18]. The stalling of replication forks at DNA lesions can be avoided by CHK1-mediated activation of translesion synthesis (TLS) [19]. Besides the stabilization of replication forks, CHK1 is essential for the activation of DNA repair by HR through phosphorylation of RAD51 and BRCA2 [7].

It is unclear to what extent the activation of CHK1 influences the sensitivity of HR deficient tumors. Previous methods to identify these tumors focused on the HR defects that result from a BRCA1/2 mutation and a high HR deficiency score (HRD-score). For both a significantly better response to platinum-based chemotherapy was observed [20–24]. In addition to genetic analysis, it is also possible to characterize HR-deficient tumors functionally. The *ex vivo* tissue slice culture assay analyzes primary tumor samples for their ability to perform HR. This is assessed by the formation of RAD51 foci after DNA damage, where absence of foci formation indicates HR deficiency [25,26]. It remains unclear in both approaches: (i) whether the observed genetic alteration leads to a functional repair defect, (ii) whether the loss of the RAD51 foci formation provides sufficient information about the functionality of HR, and (iii) how overexpression of RAD51 in interaction with CHK1, in its multiple functions, impacts on these processes. This study investigated the latter point, especially with regard to replication stress, in sporadic non-BRCA1/2-mutated TNBC cells.

2. Materials and Methods

2.1. Clinical *in Silico* Analysis

Clinical- and mRNA expression data were extracted from the TCGA database from the cBioportal data (<http://www.cbioportal.org>). For each tumor, the CIN70 score was calculated according to

Birbak et al. [3] by adding the expression values of all CIN70 genes from 1400 patients. For the calculation of disease-specific survival (DSS), the survival data of the patients according to CIN70 score, CHK1 or RAD51 mRNA expression were used and the extreme quartiles were plotted and analyzed using a log-rank test. The mRNA expression of RAD51 and CHK1 of the extreme CIN70 score quartiles were plotted depending on the molecular subtype.

2.2. Cell Culture and Treatments

All cell lines used in the study were either purchased from the American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA) or kindly provided by Prof. Dr. H. Wikman. The cell lines were cultivated in DMEM medium with 10% FCS, 2% glutamine, and 1% penicillin streptomycin in incubators at 37 °C, 5% CO₂ atmosphere and 100% humidity in cell culture flasks. To inhibit PARP1, olaparib was used in increasing concentrations up to 50 µM and incubated for 5 days. For the treatment with mitomycin C (MMC) concentrations up to 1.5 µg/mL for maximum 1 h were used. The inhibition of CHK1 was achieved by using the small molecule inhibitor MK8776 at 2 µM for 2 h.

2.3. Homologous Recombination Assay

HR frequency was measured by stable or transient transfection of I-Sce-1-linearized pDR-GFP (Addgene #26475) and DR-oriP-GFP (kindly provided by M. Jasin) plasmids. Briefly, 1 µg linearized plasmid (pDR-GFP) or 0.5 µg (DR-oriP-GFP) linearized plasmid plus 0.5 µg MSCV-N-EBNA1 (Addgene #37954) was transfected into cells using FuGENE (Roche, Basel, Switzerland) in a 1:3 µg/µL ratio according to the manufacturer's instruction. After 24 h cells were harvested, and the fraction of GFP-positive cells was determined by flow cytometry.

2.4. Western Blot and Immunostaining

Total protein was extracted from exponentially growing cells and 40 µg/ml were resolved by SDS-PAGE using a 4%–15% gradient gel (Bio-Rad Laboratories). After transfer and blocking overnight at 4 °C in Odyssey Blocking Buffer (Li-Cor, Lincoln, NE, USA) proteins were detected by primary antibodies against BRCA2 [2A-9] (1:500, kindly provided by Stephen Smith, Leibnitz Institute, Jena, Germany), FANCD2 [FI17] (Santa Cruz, 1:2000), ATR [N-19] (Santa Cruz, 1:1000), CHK1 [2G1D5] (Cell Signaling, 1:750), RAD51 [14B4] (1:2.000, GeneTex, Irvine, CA, USA), PARP1 [C210] (BD, 1:1000), RPA [9H8] (Santa Cruz, 1:1000), pCHK1 [Ser296] (Cell Signaling, 1:1000), pATR [Ser428] (Cell Signaling, 1:1000), pRPA [S4/S8], (Bethyl, Montgomery, TX, USA, 1:1000), β-actin [AC-74] (1:50.000, Sigma, St. Louis, MO, USA) or HSC70 [B6] (Santa Cruz, 1:1000). Primary antibodies were detected with IRDYE 680 conjugated anti-mouse IgG, IRDYE 800 conjugated anti-rabbit IgG (Licor, 1:7500), IRDYE 680 conjugated anti-rabbit IgG (Licor, 1:7.500 or 15.000) or IRDYE 800 conjugated anti-mouse IgG (Licor 1:7.500 or 15.000). For immunofluorescence staining, cells were seeded on culture slides. After treatment cells were fixed, permeabilized and blocked overnight in 3%BSA. Foci were detected using primary antibodies against RAD51 [AB-1] (Calbiochem, 1:500), γH2AX [Ser139] (Millipore, Burlington, MA, USA, 1:250) or RPA [MA34] (Santa Cruz, 1:400), followed by secondary antibodies Alexa Fluor 488 goat anti rabbit IgG (Cell signaling, 1:600), Alexa Fluor 488 goat anti mouse IgG (Cell signaling, 1:600) or Alexa Fluor 594 goat anti-mouse IgG (Cell signaling, 1:500). EdU was stained with Alexa Fluor Azide 594 or 647(Life Technologies, Carlsbad, CA, USA, 1:500), nuclei were stained with DAPI and the samples were mounted (Vector Laboratories). Fluorescence images were captured using a Zeiss Axioplan 2 epifluorescence microscope equipped with a charge-coupled device camera and Axiovision software. For quantitative analysis, foci were counted by fluorescence microscopy using a 1000-fold magnification. There were 100 cells per dose per slide and experiment were evaluated blindly.

2.5. Transmission Electron Microscopy

Treated cells were fixed with 2% paraformaldehyde and 0.05% glutaraldehyde in PBS. Fixed samples were dehydrated using increasing concentrations of ethanol and infiltrated with LR White resin overnight (Plano, Wetzlar, Germany). Subsequently, samples were embedded in fresh resin with accelerator at 37 °C until the resin was polymerized. Ultrathin sections (70 nm) were cut on a

Microtome Ultracut UCT (Leica, Wetzlar, Germany) with diamond knives (Diatome, Biel, Switzerland), gathered up on pioloform-coated nickel grids and processed for immunogold-labeling. To block nonspecific staining sections were placed on drops of blocking solution (Aurion, Wageningen, The Netherlands). Afterwards sections were rinsed and incubated with primary antibodies against γ H2AX (Millipore, 1:250) and RPA (Santa Cruz, 1:400). After rinsing, secondary antibodies conjugated with 6-nm or 10-nm gold particles (Aurion, Wageningen, The Netherlands) were applied to the grids for 1.5 h. Sections were then rinsed and fixed with 2% glutaraldehyde in PBS. All sections were stained with 3% uranyl acetate and examined using Tecnai BiotwinTM transmission electron microscope (FEI, Eindhoven, The Netherlands). Detection, localization and counting of gold beads and clusters were performed at the electron microscope by eye.

2.6. DNA Fiber Assay

Exponentially growing cells were pulse labeled with 25 μ M CldU (Sigma) followed by 250 μ M IdU (Sigma) for 30 min each. HU was given for 2 h between both labels, Inhibitors 2 h before labelling, MMC was given at the beginning of the 2nd pulse labelling time. Labeled cells were harvested, DNA fiber spreads prepared and stained as described [27]. Fibers were examined using an Axioplan 2 fluorescence microscope (Zeiss, Oberkochen, Germany). CldU and IdU tracks were measured using ImageJ (version 1.48, Company, City, State abbrev. If USA, Country) [27,28]. At least 300 forks were analyzed.

2.7. Clonogenic Survival

For survival assays 250 cells were seeded in a 6-well plate 6 h before treatment and cells were cultured for 14 days. Cells were fixed and stained with 1% crystal violet (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Colonies with more than 50 cells were determined microscopically and normalized to untreated samples. Each survival curve represents the mean of at least three independent experiments.

2.8. Statistical Analysis

Statistical analysis, curve fitting and graphs were performed using Prism 6.02 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Data are given as mean (+SEM) of 3–5 replicate experiments. Unless stated otherwise, significance was tested by Student's t-test.

3. Results

3.1. Long-Term Disease Specific Survival in Luminal and Triple-Negative Breast Cancer Tumors Depends On RAD51 and CHK1 mRNA Expression

The relationship between CIN and prognosis has already been investigated in a large number of tumors, whereby a high CIN70 value was often associated with a worse prognosis [3]. However, it is unclear whether CIN70 affects both good and poorly treatable subgroups of breast cancer. To clarify this, the effect of the CIN70 score on disease-specific survival (DSS) was analyzed in all subgroups, as well as only in LumA and TNBC using the two extreme quartiles (Figure 1A–C and Supplementary Figure S1A). Irrespective of the subtype, tumors with high CIN70 showed significantly worse 5- and 10-year DSS compared to patients with tumors harboring a low CIN70.

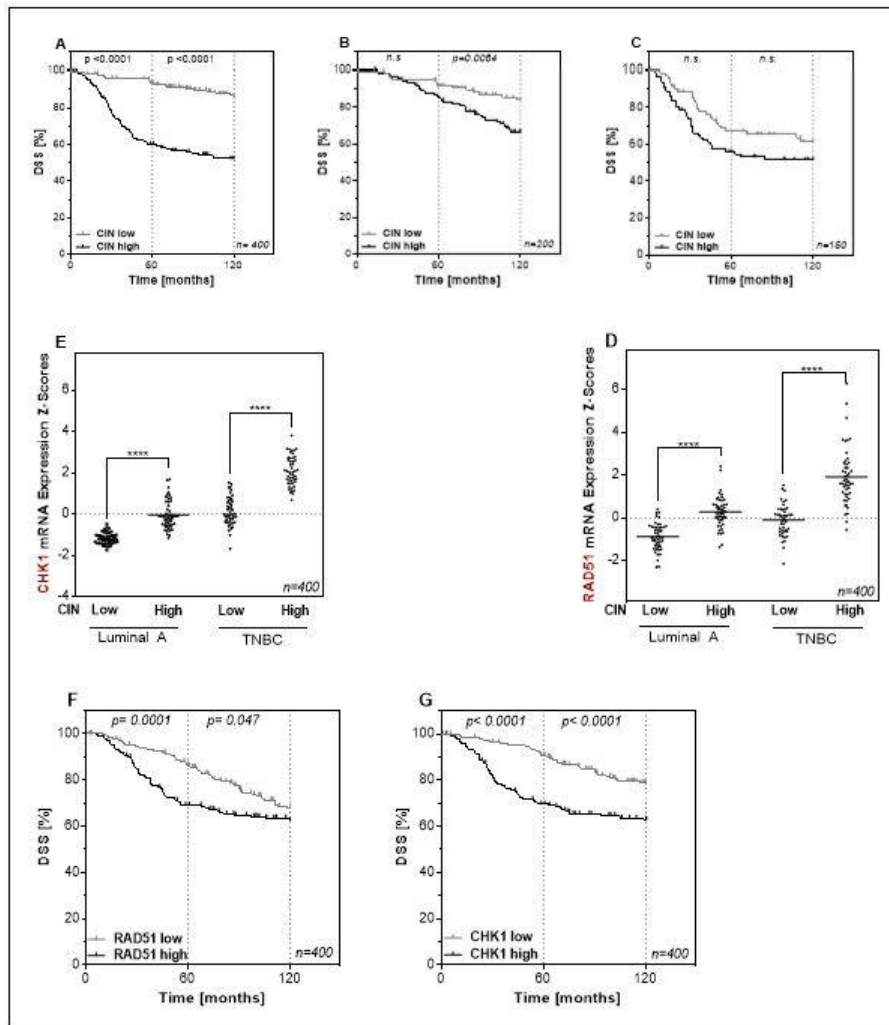


Figure 1. A high gene expression profile consisting of 70 genes associated with a functional aneuploidy (CIN70) score is negatively associated with disease-specific survival in luminal A (LumA) and triple-negative breast cancer (TNBC) subtypes and correlates with the expression of RAD51 and CHK1. (A-C). Kaplan–Meier analysis of the CIN70 score as prognostic factor for disease-specific survival (DSS) in breast cancer patients (A) ($n = 400$) patients with LumA (B) ($n = 200$) and TNBCs (C) ($n = 150$) using the two extreme quartiles. The CIN70 score defines the differential mRNA expression of 70 genes in tumors classified as stable and unstable based on their structural and numerical chromosomal alterations [3]. DSS is plotted against time after therapy. All, LumA and TNBC tumors with CIN high showed significantly worse 5- and 10-year DSS compared to tumors with CIN low, with 52% vs. 86% after 10 years for all, 84% vs. 67% after 10 years (n.s./ $p = 0.0084$) for LumA and 52% vs. 62% after 10 years (n.s./n.s) for TNBC tumors. p -values were calculated on the basis of the log-rank test. (D,E). mRNA expression of RAD51 (D) and CHK1 (E) for LumA and TNBC tumors of the Metabric data set sorted by CIN70 score using the two extreme quartiles. RAD51 is expressed significantly higher in CIN high than in CIN low tumors, both in LumA, with -0.88 ± 0.09 vs. 0.27 ± 0.1 and -0.11 ± 0.01 vs. 1.92 ± 0.19 , respectively. A significantly increased expression in CIN high compared to CIN low was also found for CHK1, with 1.17 ± 0.04 and -0.03 ± 0.096 for LumA and 0.13 ± 0.1 vs. 2.08 ± 0.1 for TNBC. (F,G). Kaplan–Meier analysis of DSS of 400 patients according to the RAD51 (F) or CHK1 (G) expression using the two extreme quartiles. DSS is plotted against time after therapy. Patients whose tumor had a high expression of RAD51 showed significantly lower DSS compared to low RAD51 expression (68% vs. 62%). For the expression of CHK1, the negative effect of a high expression on survival was even more evident (62% vs. 80%). p -values were calculated on the basis of the log-rank test (**** $p < 0.0001$; Student's t -test).

The cause for an increased CIN70 could be a defect in the DNA repair pathway homologous recombination or the DNA damage response. To test this, the role of mRNA expression of RAD51 and CHK1 in respect to CIN70 was analyzed. It was noticeable that the RAD51 expression is significantly higher in CIN high (Figure 1D and Supplementary Figure S1B,D) than in CIN low tumors. This effect was especially pronounced in the TNBC subtype. A significantly increased expression in CIN high compared to CIN low was also found for CHK1 (Figure 1E and Supplementary Figure S1C,D) in both subtypes. Consequently, increased expression of RAD51 and CHK1 in CIN high tumors had a negative effect on survival (Figure 1F,G). Patients whose tumor had a high expression of RAD51 showed significantly lower DSS after both 5 and 10 years compared to low RAD51 expression. For the expression of CHK1, the negative effect of a high expression on survival was even more evident. These data suggest that both increased expression of RAD51 and CHK1 may lead to a decreased DNA repair or DNA damage response resulting in tumors with increased chromosomal instability [27].

3.2. No Correlation of HR Capacity, Replication Fork Protection, and Sensitivity to PARP1 Inhibition and MMC Treatment

Numerous publications have shown that contrary to the assumption that the more protein present, the more DNA repair capacity can be expected—high expression of RAD51 does not lead to improved HR capacity [27–31]. However, the effect of a high CHK1 expression in tumors has not yet been investigated. It is possible that differences in genetic background or individual cellular adaptation strategies such as tolerance to replication stress are responsible for this phenomenon. To test these aspects, a genetically related system of TNBC was chosen consisting of three MDA-MB-231-derived cell lines, which differ only in their metastatic pattern. While MDA-MB-231 metastasizes to all organs, BR is exclusively colonized in the brain [32] and SA in the bone marrow [33]. For comparison, the luminal cell line MCF7 was used. With this system we first investigated the influence of the expression of DNA repair proteins on the various functions of HR, such as double-strand break (DSB) repair, replication fork protection and cellular survival after treatment with PARP1 inhibitor or MMC. A comparable upregulation of CHK1 and RAD51 on the protein level was detected in TNBC cell lines, showing a TNBC-associable expression pattern (Figure 2A, Supplementary Figure S2A–D). The MDA-MB-231 showed a slightly increased expression of CHK1 and a further increase in BR and SA compared to the luminal cell line MCF7. The same pattern is observed for the expression of RAD51 with a significant increase in MDA-MB-231, BR, and SA compared to MCF7 cells. Differences in HR based on a higher S/G2 phase fraction can be excluded. (Supplementary Figure S3).

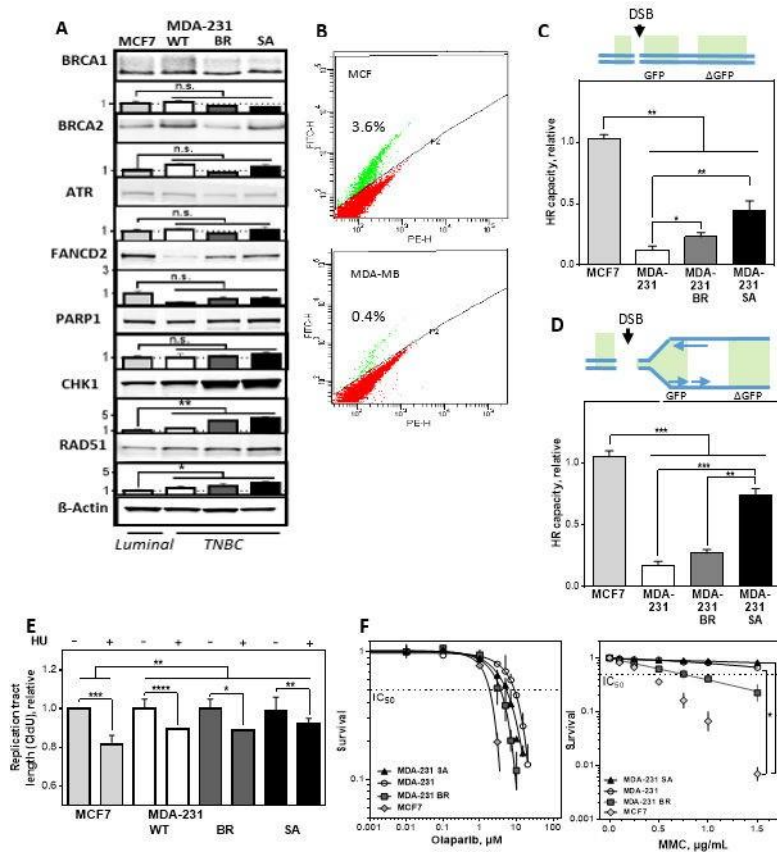


Figure 2. Low homologous recombination (HR) capacity is compatible with efficient replication fork protection and resistance to PARP1 inhibition and mitomycin C (MMC) in TNBCs. (A) Immunoblot detection of BRCA1, BRCA2, ATR, FANCD2, PARP1, CHK1 and RAD51 derived from total cell extracts of exponentially growing MCF7 and MDA-MB-231/BR/SA cells. The MDA-MB-231 showed a slightly increased expression of CHK1 (1.49 ± 0.1) and a further increase in BR (3.7 ± 0.1) and SA (4.3 ± 0.3) compared to MCF7 cells. The same pattern is observed for the expression of RAD51 with a significant increase of 1.64 ± 0.3 in MDA-MB-231, 2.4 ± 0.5 and 2.6 ± 0.3 in BR and SA compared to MCF7 cells. β -Actin was used as the loading control. Data are presented as mean \pm SEM. Immunoblot signals were detected and quantified by a LiCor system. (B–D) Repair of open and replication-associated DNA double-strand break (DSB) as a measure of HR capacity, determined by plasmid-reconstruction assay and analyzed by FACS. Cells were transiently transfected with the pDRGFP construct (C) or DR-ori-GFP plus the ori-activating MSCV-N EBNA1 construct (D) for 24 h. The number of GFP-expressing cells was normalized to the absolute HR capacity of MCF7. A significantly lower HR capacity for frank DSB was found in all TNBCs compared to MCF7 cells, with 0.12 ± 0.008 for MDA-MB-231, 0.23 ± 0.04 for BR, and 0.45 ± 0.07 for SA. The same pattern was observed for DSBs adjacent to a DNA replication origin, with 0.17 ± 0.03 for MDA-MB-231, 0.27 ± 0.03 for BR, and 0.75 ± 0.05 for SA compared to MCF7 cells. (E) Mean length of DNA fibers in MCF7 and MDA-MB-231/BR/SA cells. The cells were sequentially labelled with CldU and IdU for 30 min and treated with HU between both labels for 4 h. DNA was spread on slides, fixed and incorporated nucleotides were detected by immunofluorescence. Although all cell lines showed a shortening of the CldU tract, MCF7 showed the most pronounced shortening with 0.8 ± 0.004 , followed by MDA-MB-231 and BR with 0.89 ± 0.003 and 0.89 ± 0.001 . SA showed only a minimal shortening of the CldU tract with 0.93 ± 0.006 . The length of the DNA fibers was measured with the Image J software and calculated relative to the absolute length of the untreated controls. (F) Cellular survival after treatment with olaparib (left) or MMC (right) in MCF7 and MDA-MB-231/BR/SA cells. The cells were seeded 24-h prior treatment with olaparib or MMC for 5 days or 1 h, fixed after 14 days, and the number of colonies was counted. Shown are means from three independent experiments \pm SEM. Asterisks represent significant differences (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$, n.s. not significant; Student's *t*-test).

Due to the different DNA structure represented by a DSB somewhere in the genome and a DSB adjacent to an active replication fork, we used two DNA repair constructs that allow both situations to be simulated. For this purpose, two repair constructs were used to investigate the DNA repair capacity by HR of a single DNA double-strand break (DR-GFP) (Figure 2B,C) or a DNA double-strand break adjacent to an origin of replication (DR-ori-GFP) (Figure 2D), transfected and analyzed by flow cytometry [34]. Significantly lower HR capacities for frank DSBs and DSBs adjacent to a DNA replication origin were found in all TNBCs compared to MCF7 cells. It is striking that the original cell line had the lowest HR capacity in both constructs, BR a slightly higher and SA the highest HR capacity. Thus, increased expression of RAD51 and CHK1 is not associated with increased DNA DSB repair capacity in TNBC.

In addition to DSB repair, HR proteins are required for the stabilization of replication forks, protecting them from nucleolytic degradation, with RAD51 and CHK1 being critical factors [9,35]. To test their protective function, the DNA fiber assay was performed after depletion of the nucleotide pool by addition of hydroxyurea (HU) (Figure 2E). Although all cell lines showed a shortening of the CldU tract, MCF7 with the highest HR capacity showed the most pronounced shortening, followed by MDA-MB-231 and BR. SA showed the strongest protection and only a minimal shortening of the CldU tract.

Next, we tested whether the difference in HR capacity is reflected by sensitivity to PARP1 inhibition by olaparib or MMC treatment in the colony formation assay. Figure 2F shows cellular survival after increasing concentrations of olaparib (left) and MMC (right) for the four cell lines studied. Although the HR capacity showed clear differences, this was not reflected by the sensitivity against PARP1 inhibition since all cell lines showed comparable IC50 values between $1.9 \pm 0.2 \mu\text{M}$ for the cell lines with the highest and $8.5 \pm 0.2 \mu\text{M}$ for the cell line with the lowest HR capacity. The same effect, but to a greater extent, was observed after treatment with MMC. Again, the cell line with the lowest HR capacity showed a 10-fold higher resistance. Thus, there was no correlation between HR capacity, and cellular sensitivity to chemotherapeutic agents exhibiting their toxic effect at the replication fork.

3.3. MMC Sensitivity Is Associated with DNA Damage Foci Formation in the S-Phase

Functional HR is characterized by the formation of RAD51 foci after damage followed by their removal after successful DNA repair in S- and G2-phase. Figure 3A shows the formation of RAD51 foci after treatment with MMC in pulse-labeled EdU-positive cells. All cell lines were able to form RAD51 foci; however, MMC-resistant TNBCs showed only a weak induction compared to the sensitive lines. A comparable pattern was also observed for the number of γH2AX foci, with a significantly stronger fold increase in sensitive compared to resistant cell lines. These results indicate that HR is the preferred DNA repair pathway in the two resistant cell lines in the S-phase.

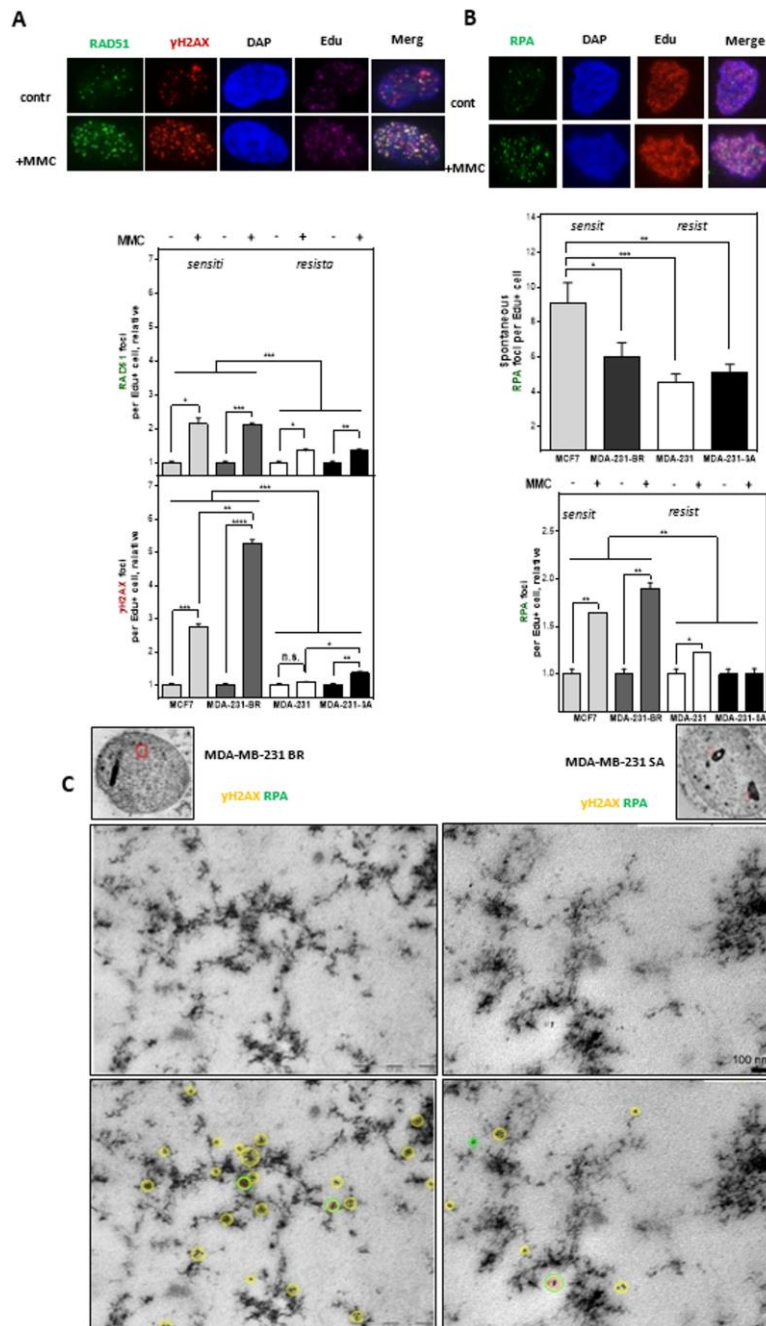


Figure 3. Resistance to MMC is due to the improved repair of DNA damage at DNA replication forks (A). RAD51 (green) and γ H2AX foci (red) as well as (B) RPA foci (green) in S-Phase (Edu+) cells arising spontaneously or after treatment with MMC. Cells were treated with 0.5 μ g/mL MMC for 1 h after pulse labeling with 10 μ M Edu for 20 min. Immunofluorescent staining was performed 24 h after treatment with γ H2AX or RPA and fluorescent second antibodies. Replicating cells were discriminated by incorporated Edu stained with the “click-it” reaction. Foci analysis was done with the Image J Software. Foci were only counted in Edu-positive nuclei ($n = 100$). DNA was counterstained by DAPI. The number of Foci was calculated relatively to the number of Foci in untreated control. Shown are means of three independent experiments \pm SEM. Asterisks represent significant differences (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$, n.s. not significant; Student’s *t*-test). (C) Transmission electron microscopy shows colocalization of gold-labeled γ H2AX (yellow) and RPA (green) for MDA-MB-231 BR and MDA-MB-231 SA cells in untreated and MMC treated cells (0.5 μ g/mL) 24 h after treatment within nuclear ultrastructure mainly associated to heterochromatic regions.

In order to analyze whether the high amounts of RAD51 and γ H2AX-foci in the MMC-sensitive cells arise from increased replication stress RPA-foci after MMC treatment were quantified in EdU-positive cells (Figure 3B). The two sensitive cell lines clearly showed 1.5 to 2 times higher amounts of RPA foci than the resistant cell lines without exogenous damage. This increased replication stress in the sensitive cell lines also occurred after treatment with MMC, with on average significantly more RPA foci compared to the resistant cell lines.

To further localize the occurrence of DNA damage in the S-phase, replication-associated DSBs were visualized by electron microscopy by parallel labeling of γ H2AX and RPA after mitomycin C in one of the sensitive and resistant cell lines. (Figure 3C, Supplementary Figure S4). In the sensitive cell line, an accumulation of γ H2AX adjacent to isolated RPA foci in heterochromatic areas (dark staining) was already observed in the untreated state, while the resistant line showed both RPA and γ H2AX rather sporadically and broadly distributed and less frequent.

This trend intensified further after treatment with MMC and reveals the accumulation of several γ H2AX signals in the sensitive cell line around a single RPA signal, whereas in the resistant cell line both markers remained scattered in the nucleus (Supplementary Figure S4). This suggests that the sensitive cell line shows increased DSBs at stalled replication forks, generally also referred to as replication stress. The data very clearly indicate that MMC sensitivity is most likely due to increased replication stress in the two sensitive cell lines.

3.4. Activation of DNA Damage Response Leads to Resistance to MMC by Avoiding Replication Stress

The potential mechanism underlying the differential cellular sensitivity to MMC was investigated by visualization of replication processes [36]. Figure 4A shows the frequency distribution of DNA strand lengths, i.e., before actual damage by MMC or after MMC treatment (Supplementary Figure S5A), compared to untreated control. The sensitive cell lines MCF7 and BR showed significantly shorter DNA strands after damage with MMC than in the untreated control, while the two resistant cell lines showed moderate or no shortening. These observations demonstrate that the differential HR capacity shown in Figure 2B–D cannot explain the observed differences in cellular sensitivity to MMC, which instead appear to be linked to the protection of replication tracts, and therefore to the DNA damage response at the replication fork. To verify this, the activation of ATR, CHK1, and RPA was investigated. Figure 4B shows the phosphorylation of ATR, CHK1, and RPA after MMC (Supplementary Figure S6A,B). The phosphorylation of CHK1 was clearly associated with resistance to MMC, and showed a more than two-fold activation in the two resistant cell lines compared to the two sensitive. This activation, which can be clearly assigned to resistance, is also reflected in the reduced phosphorylation of RPA showing a 7.0 ± 0.4 and 6.0 ± 0.02 fold increase in the two sensitive cell lines but not in the two resistant ones. The activation of ATR, on the other hand, showed no consistent response in the sensitive and resistant cell lines. These activation patterns suggest that CHK1 plays a crucial role in MMC resistance. To test this hypothesis, we treated the cells with MMC in the presence of a CHK1 inhibitor and determined the length of the DNA strands with the DNA fiber assay. Figure 4C shows the frequency distribution of CldU or IdU (Supplementary Figure S5B) labeled DNA fibers, i.e., before MMC damage, but in the presence of the CHK1 inhibitor MK8776. As expected, the two resistant cell lines showed a significant effect in response to the CHK1 inhibitor, while there were only minor effects present in the sensitive ones. This confirms the assumption that the observed resistance is due to an increased activation of CHK1.

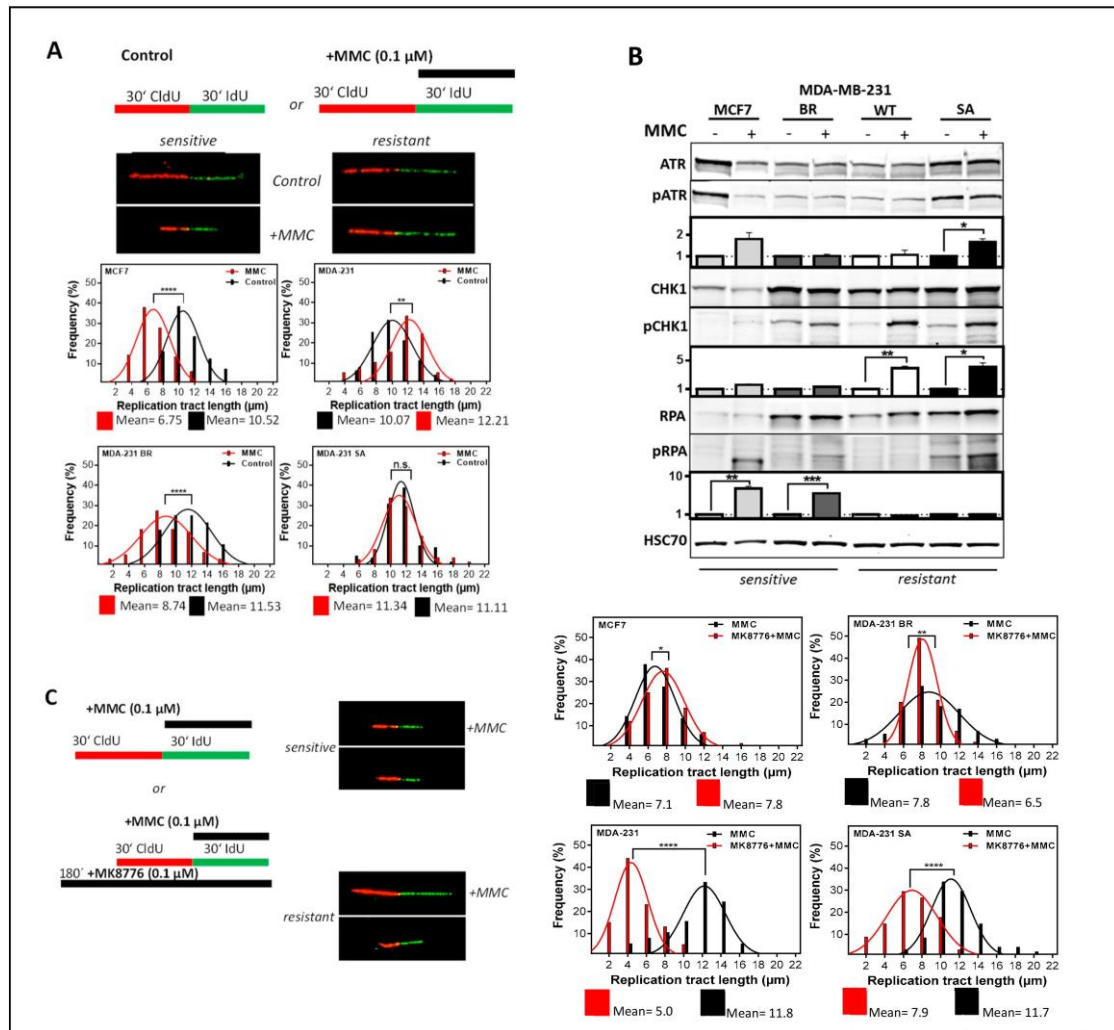


Figure 4. CHK1 inhibition leads to increased replication stress only in MMC-resistant TNBC. (A) Examples and frequency distribution of DNA fiber lengths (CldU) in untreated and MMC treated cells. Exponentially growing cells were sequentially labeled with CldU and IdU in the absence or presence of MMC (0.1 μM). DNA was spread and incorporated CldU and IdU was detected with appropriate antibodies. Shown are means ± SEM of DNA fiber length (CldU) frequency distributions of three independent experiments. Asterisks represent significant differences (** $p < 0.01$; *** $p < 0.0001$, Student's *t*-test). (B) Immunodetection of activated intra-S phase checkpoint proteins. Cells were treated with 1.5 μg/mL MMC for 1 h and proteins were extracted 24 h later. Proteins were separated and transferred by Western blotting. Detection of proteins was performed with appropriate antibodies. HSC70 served as the loading control. Phosphorylation of the untreated control was used for standardization and ratios of phosphorylated to non-phosphorylated protein are shown. Data from three independent experiments were used for quantification. Errors are mean values + SEM. (C) DNA fiber lengths of CldU labeled tracts after treatment with MMC in the presence of the CHK1 inhibitor MK8776 (1 μM). Exponentially growing cells were incubated for 2 h with MK8776 and sequentially labeled with CldU and IdU (plus 0.1 μM MMC), DNA was spread and incorporated nucleotides were detected with the appropriate antibodies. The frequency distribution of DNA fiber lengths in the first label (CldU) of three independent experiments is shown. Asterisks represent significant differences (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$, n.s. not significant; Student's *t*-test).

3.5. Activation of CHK1 Protects against DNA Damage in the S-Phase and Mediates Resistance to MMC in HR-Deficient Cell Lines

Next, it was investigated whether the observed replication stress after inhibition of CHK1 in the two resistant cell lines had a more pronounced effect on DNA damage and cellular survival. Figure 5A shows the occurrence of a pan-nuclear γ H2AX signal as a marker of the replicative catastrophe [37] after MMC damage. While in the two sensitive cell lines a large proportion of cells with pan-nuclear γ H2AX signal could be observed following MMC treatment, the two resistant lines showed a 3–4 times lower percentage of pan-nuclear γ H2AX positive cells. Conversely, after combined treatment with MMC and CHK1 inhibitor, the percentage of pan-nuclear γ H2AX positive cells increased 6- and 2.5-fold respectively in the two resistant cell lines, whereas the two sensitive lines showed only a 1.2-fold increase relative to MMC mono treatment. These results suggest that MMC treatment alone was already sufficient to induce the replicative catastrophe in sensitive cells. In the resistant cells, this effect was only achieved to a comparable extent when MMC was combined with CHK1 inhibition.

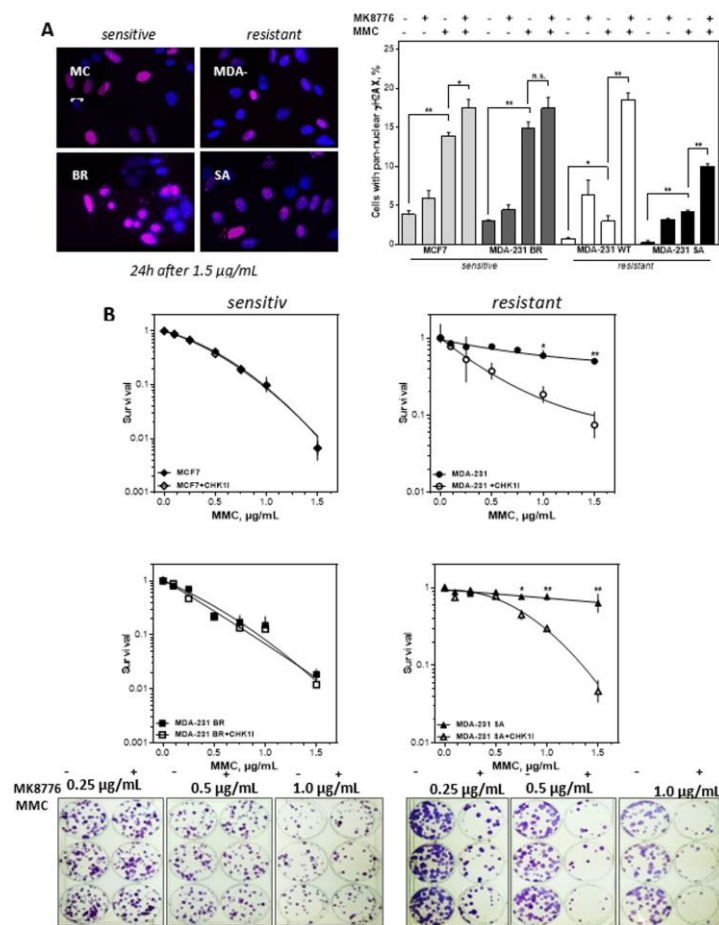


Figure 5. CHK1 inhibition sensitizes only cells with resistance towards MMC (A). Percentage and representative examples of cells with pan-nuclear γ H2AX signal (red) after treatment with MMC alone or combined with CHK1 (MK8776) inhibition. Exponentially growing cells were treated with 0.5 μ g MMC for 1 h after being incubated with 2 μ M MK8776 for 2 h. The 24 h after treatment immunofluorescence staining for γ H2AX was performed and nuclei were counterstained with DAPI. Cells with pan-nuclear γ H2AX signal indicating replication stress were microscopically evaluated. Means + SEM of three independent experiments are shown. Asterisks represent significant differences (* $p < 0.05$, ** $p < 0.001$, *** $p < 0.0001$, Student's t-test). (B) Cellular survival after treatment with MMC alone or in combination with the CHK1 inhibitor MK8776. Cells were plated, treated with MK8776 (2 μ M) for 2 h and/or MMC for 1 h, fixed and stained after 14 days and the number of colonies was counted. Adding MK8776 sensitized the two resistant cell lines to MMC ($p = 0.003$ and 0.007 at 1.5 μ g/mL MMC). For the two MMC sensitive cells there was no sensitizing

effect by the CHK1 inhibitor. Shown are means of three independent experiments \pm SEM. Asterisks represent significant differences (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$, Student's t-test). Induction of the replicative catastrophe should result in cell death, which was investigated by the colony formation assay. Figure 5B shows that adding the CHK1 inhibitor MK8776 sensitized the two resistant cell lines to MMC. The IC₅₀ values for the two cell lines were reduced by an enhancement factor of 4.3 and 2.9. For the two MMC sensitive cells there was no sensitizing effect by the CHK1 inhibitor. Thus, only cell lines resistant to MMC could be sensitized by inhibition of CHK1 (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$, n.s. not significant; Student's t-test).

4. Discussion

In this study, we showed a negative association of a high CIN70 score with DSS in breast cancer and confirmed data from previous studies [2,3]. Furthermore, we observed that a high CIN 70 score determines survival in both good and poorly curable subgroups of breast cancer. The high CIN70 score in LumA corresponds to the low CIN70 score of the TNBC. This implies that the use of a more aggressive therapy for LumA with a high CIN70 score could possibly lead to significantly higher survival rates. An increased DNA repair capacity to compensate the higher CIN with a resulting therapy resistance as the cause of the poor prognosis for breast as well as other tumors [3]. We confirm here that this assumption applies not only to TNBCs but also to LumA, with a significantly increased mRNA expression of RAD51 and CHK1 in tumors with high CIN scores. Accordingly, DSS was negatively associated with increased expression of both genes. This confirms data from us and others showing an association of high expression and poor prognosis for RAD51 [38–41], as well as CHK1 [41–43] at the protein and mRNA levels, respectively. However, there is also a highly significant increase in mRNA expression with CIN, both for RAD51 and even stronger for CHK1. This observation clearly shows that more DNA repair protein does not lead to increased DNA repair. It seems more likely that the superior DNA damage response with cell cycle checkpoints or increased tolerance to DNA damage is causal. Both options would lead to decreased response and poorer survival of treated patients. In the present study, the general DNA damage response appears to be the decisive factor for the observed therapy resistance in TNBCs.

In addition, we showed that TNBC cells display no degradation of replication forks and no increased olaparib sensitivity despite a reduced HR capacity. Rather, resistance was observed after MMC with adequate RAD51 focus formation and correspondingly low levels of the DNA damage marker γ H2AX in the S-phase. This was due to a pronounced activation of the DNA damage response by CHK1, which ensured unimpaired replication and could be reversed by CHK1 inhibition. Thus, this study demonstrates an important role of CHK1 which can compensate for a reduced HR capacity by preventing replication stress in TNBC.

A correlation of increased RAD51 and CHK1 expression was observed in several studies and was significantly associated with TNBC status [44]. The low HR capacity in TNBC cells observed here also confirms the described limited HR functionality in TNBCs in the clinical setting [21]. Despite high RAD51 expression and functional BRCA1 a low HR capacity was observed by the plasmid reconstruction assay. This could be attributed to a lack of activation of CHK2 via ATM [45]. It is more likely that the induction of a single DSB activates neither ATM, nor ATR [8]. The limited validity of the detection of a single DSB is strongly supported by the observation that cells without BRCA1 expression show a high HR capacity for a replication-independent DSB and virtually no HR capacity for a replication-associated DSB (Supplementary Figure S7).

One of the further functions of HR is the protection of replication forks. Cells with the highest HR capacity showed the highest instability of replication forks. Reduced protection of replication forks has already been observed in tumor cells despite functional HR [9]. This distinguishes tumor from non-tumor cells for which stabilization of replication forks by HR factors is essential [46].

Despite their low HR capacity, MDA-MB-231 were resistant to olaparib and MMC. Both agents lead to one-ended DSB, which occur when a replication fork hits a single strand break and collapses [47,48]. A replication run-off occurs, the replication machinery dissociates and a DNA end is released [49] which is the substrate for the third function of HR [47]. The one-ended DSB

resulting from MMC treatment represents a more complex repair situation for the cell and activates both nucleotide excision and Fanconi repair factors [50]. Only after successful activation of FANCD2 a substrate for HR is provided in the further repair process [51,52]. All cell lines could successfully form RAD51 foci according to their cellular survival after MMC. Thus, no HR defect was observed.

The processes of HR at the replication fork, such as fork protection and repair of one-ended DSB, are controlled by the intra-S phase damage response kinase ATR and its downstream kinase CHK1 [45]. The replication fork stabilizing function of CHK1 can be observed after PARP1 inhibition and MMC treatment and is independent of ATR, RAD51, and BRCA1 [35,45,53,54]. The resistance mechanism may involve avoidance of one-ended DSBs or activation of alternative DNA repair pathways [14,55]. More obvious is the direct negative effect of CHK1. The inhibition of CHK1 leads to the increased initiation of replication and increased phosphorylation of further ATR targets. This results in production of more DSBs, reduced MRE11 activity [17] and an affected HR function due to the phosphorylation of RAD51 [56]. Thus, efficient utilization of the ATR-CHK1 signaling cascade can compensate for reduced HR function. This is confirmed by studies in ovarian carcinoma [57]. Thus, the activation of CHK1 could influence the sensitivity of HR deficient tumors. Therefore, the established methods to successfully identify HR deficient tumors should be extended by the detection of CHK1 activation. This could be made possible by extending BRCA1/2 testing by genes of the intra S-phase damage response or the combined detection of RAD51 with RPA in S-phase cells [25,26,58].

Supplementary Materials: The following are available online at <http://www.mdpi.com/2073-4409/9/1/238/s1>, Figures S1–S7.

Author Contributions: Conceptualization and experiment design, K.B., F.M., S.B., and S.C., Writing—Original draft preparation, K.B., F.M., S.B., and S.C., Writing—Review and editing, all authors, Investigation and analysis B.R., A.C.P., W.Y.M., S.T., C.R., and M.J., Verification and supervision C.R., C.P., H.W., and K.R. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work is in part supported by (1) DFG, grant no. BO1868/5, (2) BMBF, grant no. 02NUK032 and (3) 02NUK035B, (4) Wilhelm-Sander Foundation project 2017.106.1.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest.

References

1. Bianchini, G.; Balko, J.M.; Mayer, I.A.; Sanders, M.E.; Gianni, L. Triple-negative breast cancer: Challenges and opportunities of a heterogeneous disease. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **2016**, *13*, 674–690. [[CrossRef](#)]
2. Carter, S.L.; Eklund, A.C.; Kohane, I.S.; Harris, L.N.; Szallasi, Z. A signature of chromosomal instability inferred from gene expression profiles predicts clinical outcome in multiple human cancers. *Nat. Genet.* **2006**, *38*, 1043–1048. [[CrossRef](#)]
3. Birkbak, N.J.; Eklund, A.C.; Li, Q.; McClelland, S.E.; Endesfelder, D.; Tan, P.; Tan, I.B.; Richardson, A.L.; Szallasi, Z.; Swanton, C. Paradoxical relationship between chromosomal instability and survival outcome in cancer. *Cancer Res.* **2011**, *71*, 3447–3452. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Karanam, K.; Kafri, R.; Loewer, A.; Lahav, G. Quantitative live cell imaging reveals a gradual shift between DNA repair mechanisms and a maximal use of HR in mid S phase. *Mol. Cell* **2012**, *47*, 320–329. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Heyer, W.D.; Ehmsen, K.T.; Liu, J. Regulation of homologous recombination in eukaryotes. *Annu. Rev. Genet.* **2010**, *44*, 113–139. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Symington, L.S.; Gautier, J. Double-strand break end resection and repair pathway choice. *Annu. Rev. Genet.* **2011**, *45*, 247–271. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Sorensen, C.S.; Syljuasen, R.G.; Falck, J.; Schroeder, T.; Ronnstrand, L.; Khanna, K.K.; Zhou, B.B.; Bartek, J.; Lukas, J. Chk1 regulates the S phase checkpoint by coupling the physiological turnover and ionizing radiation-induced accelerated proteolysis of Cdc25A. *Cancer Cell* **2003**, *3*, 247–258. [[CrossRef](#)]
8. Saleh-Gohari, N.; Bryant, H.E.; Schultz, N.; Parker, K.M.; Cassel, T.N.; Helleday, T. Spontaneous homologous recombination is induced by collapsed replication forks that are caused by endogenous DNA single-strand breaks. *Mol. Cell. Biol.* **2005**, *25*, 7158–7169. [[CrossRef](#)]

9. Schlacher, K.; Wu, H.; Jasin, M. A distinct replication fork protection pathway connects Fanconi anemia tumor suppressors to RAD51-BRCA1/2. *Cancer Cell* **2012**, *22*, 106–116. [[CrossRef](#)]
10. Poole, L.A.; Cortez, D. Functions of SMARCAL1, ZRANB3, and HLTf in maintaining genome stability. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **2017**, *52*, 696–714. [[CrossRef](#)]
11. Liao, H.; Ji, F.; Helleday, T.; Ying, S. Mechanisms for stalled replication fork stabilization: New targets for synthetic lethality strategies in cancer treatments. *EMBO Rep.* **2018**, *19*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Puccetti, M.V.; Adams, C.M.; Kushinsky, S.; Eischen, C.M. Smarcal1 and Zranb3 Protect Replication Forks from Myc-Induced DNA Replication Stress. *Cancer Res.* **2019**, *79*, 1612–1623. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Ciccia, A.; Elledge, S.J. The DNA damage response: Making it safe to play with knives. *Mol. Cell* **2010**, *40*, 179–204. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Gonzalez Besteiro, M.A.; Gottifredi, V. The fork and the kinase: A DNA replication tale from a CHK1 perspective. *Mutat. Res. Rev. Mutat. Res.* **2015**, *763*, 168–180. [[CrossRef](#)]
15. Saldivar, J.C.; Cortez, D.; Cimprich, K.A. The essential kinase ATR: Ensuring faithful duplication of a challenging genome. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2017**, *18*, 622–636. [[CrossRef](#)]
16. Petermann, E.; Maya-Mendoza, A.; Zachos, G.; Gillespie, D.A.; Jackson, D.A.; Caldecott, K.W. Chk1 requirement for high global rates of replication fork progression during normal vertebrate S phase. *Mol. Cell. Biol.* **2006**, *26*, 3319–3326. [[CrossRef](#)]
17. Thompson, R.; Montano, R.; Eastman, A. The Mre11 nuclease is critical for the sensitivity of cells to Chk1 inhibition. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e44021. [[CrossRef](#)]
18. Petermann, E.; Woodcock, M.; Helleday, T. Chk1 promotes replication fork progression by controlling replication initiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 16090–16095. [[CrossRef](#)]
19. Yamada, M.; Watanabe, K.; Mistrik, M.; Vesela, E.; Protivankova, I.; Mailand, N.; Lee, M.; Masai, H.; Lukas, J.; Bartek, J. ATR-Chk1-APC/CCdh1-dependent stabilization of Cdc7-ASK (Dbf4) kinase is required for DNA lesion bypass under replication stress. *Genes Dev.* **2013**, *27*, 2459–2472. [[CrossRef](#)]
20. Tung, N.M.; Garber, J.E. BRCA1/2 testing: Therapeutic implications for breast cancer management. *Br. J. Cancer* **2018**, *119*, 141–152. [[CrossRef](#)]
21. Telli, M.L.; Timms, K.M.; Reid, J.; Hennessy, B.; Mills, G.B.; Jensen, K.C.; Szallasi, Z.; Barry, W.T.; Winer, E.P.; Tung, N.M.; et al. Homologous Recombination Deficiency (HRD) Score Predicts Response to Platinum-Containing Neoadjuvant Chemotherapy in Patients with Triple-Negative Breast Cancer. *Clin. Cancer Res.* **2016**, *22*, 3764–3773. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Watkins, J.; Weekes, D.; Shah, V.; Gazinska, P.; Joshi, S.; Sidhu, B.; Gillett, C.; Pinder, S.; Vanoli, F.; Jasin, M.; et al. Genomic Complexity Profiling Reveals that HORMAD1 Overexpression Contributes to Homologous Recombination Deficiency in Triple-Negative Breast Cancers. *Cancer Discov.* **2015**, *5*, 488–505. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Zhao, E.Y.; Shen, Y.; Plesance, E.; Kasaian, K.; Leelakumari, S.; Jones, M.; Bose, P.; Ch'ng, C.; Reisle, C.; Eirew, P.; et al. Homologous Recombination Deficiency and Platinum-Based Therapy Outcomes in Advanced Breast Cancer. *Clin. Cancer Res.* **2017**, *23*, 7521–7530. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Gulhan, D.C.; Lee, J.J.; Melloni, G.E.M.; Cortes-Ciriano, I.; Park, P.J. Detecting the mutational signature of homologous recombination deficiency in clinical samples. *Nat. Genet.* **2019**, *51*, 912–919. [[CrossRef](#)] Meijer, T.G.; Verkaik, N.S.; Sieuwerts, A.M.; Van Riet, J.; Naipal, K.A.T.; Van Deurzen, C.H.M.; Den Bakker, M.A.; Sleddens, H.; Dubbink, H.J.; Den Toom, T.D.; et al. Functional Ex Vivo Assay Reveals Homologous Recombination Deficiency in Breast Cancer Beyond BRCA Gene Defects. *Clin. Cancer Res.* **2018**, *24*, 6277–6287. [[CrossRef](#)]
25. Naipal, K.A.; Verkaik, N.S.; Ameziane, N.; van Deurzen, C.H.; Ter Brugge, P.; Meijers, M.; Sieuwerts, A.M.; Martens, J.W.; O'Connor, M.J.; Vrieling, H.; et al. Functional ex vivo assay to select homologous recombination-deficient breast tumors for PARP inhibitor treatment. *Clin. Cancer Res.* **2014**, *20*, 4816–4826. [[CrossRef](#)]
26. Parplys, A.C.; Seelbach, J.I.; Becker, S.; Behr, M.; Wrona, A.; Jend, C.; Mansour, W.Y.; Joosse, S.A.; Stuerzbecher, H.W.; Pospiech, H.; et al. High levels of RAD51 perturb DNA replication elongation and cause unscheduled origin firing due to impaired CHK1 activation. *Cell Cycle* **2015**, *14*, 3190–3202. [[CrossRef](#)]
27. Magwood, A.C.; Mundia, M.M.; Baker, M.D. High levels of wild-type BRCA2 suppress homologous recombination. *J. Mol. Biol.* **2012**, *421*, 38–53. [[CrossRef](#)]
28. Wurster, S.; Hennes, F.; Parplys, A.C.; Seelbach, J.I.; Mansour, W.Y.; Zielinski, A.; Petersen, C.; Clauditz,

- T.S.; Munscher, A.; Friedl, A.A.; et al. PARP1 inhibition radiosensitizes HNSCC cells deficient in homologous recombination by disabling the DNA replication fork elongation response. *Oncotarget* **2016**, *7*, 9732–9741. [[CrossRef](#)]
29. Paffett, K.S.; Clikeman, J.A.; Palmer, S.; Nickoloff, J.A. Overexpression of Rad51 inhibits double-strand break-induced homologous recombination but does not affect gene conversion tract lengths. *DNA Repair* **2005**, *4*, 687–698. [[CrossRef](#)]
 30. Kim, P.M.; Allen, C.; Wagener, B.M.; Shen, Z.; Nickoloff, J.A. Overexpression of human RAD51 and RAD52 reduces double-strand break-induced homologous recombination in mammalian cells. *Nucleic Acids Res.* **2001**, *29*, 4352–4360. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
 31. Yoneda, T.; Williams, P.J.; Hiraga, T.; Niewolna, M.; Nishimura, R. A bone-seeking clone exhibits different biological properties from the MDA-MB-231 parental human breast cancer cells and a brain-seeking clone in vivo and in vitro. *J. Bone Miner. Res.* **2001**, *16*, 1486–1495. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
 32. Pollari, S.; Kakonen, S.M.; Edgren, H.; Wolf, M.; Kohonen, P.; Sara, H.; Guise, T.; Nees, M.; Kallioniemi, O. Enhanced serine production by bone metastatic breast cancer cells stimulates osteoclastogenesis. *Breast Cancer Res. Treat.* **2011**, *125*, 421–430. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
 33. Moynahan, M.E.; Cui, T.Y.; Jasin, M. Homology-directed dna repair, mitomycin-c resistance, and chromosome stability is restored with correction of a Brca1 mutation. *Cancer Res.* **2001**, *61*, 4842–4850.
 34. Min, W.; Bruhn, C.; Grigaravicius, P.; Zhou, Z.W.; Li, F.; Kruger, A.; Siddeek, B.; Greulich, K.O.; Popp, O.; Meisezahl, C.; et al. Poly(ADP-ribose) binding to Chk1 at stalled replication forks is required for S-phase checkpoint activation. *Nat. Commun.* **2013**, *4*, 2993. [[CrossRef](#)]
 35. Parplys, A.C.; Petermann, E.; Petersen, C.; Dikomey, E.; Borgmann, K. DNA damage by X-rays and their impact on replication processes. *Radiother. Oncol.* **2012**, *102*, 466–471. [[CrossRef](#)]
 36. Toledo, L.; Neelsen, K.J.; Lukas, J. Replication Catastrophe: When a Checkpoint Fails because of Exhaustion. *Mol. Cell* **2017**, *66*, 735–749. [[CrossRef](#)]
 37. Tennstedt, P.; Fresow, R.; Simon, R.; Marx, A.; Terracciano, L.; Petersen, C.; Sauter, G.; Dikomey, E.; Borgmann, K. RAD51 overexpression is a negative prognostic marker for colorectal adenocarcinoma. *Int. J. Cancer* **2013**, *132*, 2118–2126. [[CrossRef](#)]
 38. Wiegmans, A.P.; Al-Ejeh, F.; Chee, N.; Yap, P.Y.; Gorski, J.J.; Da Silva, L.; Bolderson, E.; Chenevix-Trench, G.; Anderson, R.; Simpson, P.T.; et al. Rad51 supports triple negative breast cancer metastasis. *Oncotarget* **2014**, *5*, 3261–3272. [[CrossRef](#)]
 39. Alshareeda, A.T.; Negm, O.H.; Aleskandarany, M.A.; Green, A.R.; Nolan, C.; TigHhe, P.J.; Madhusudan, S.; Ellis, I.O.; Rakha, E.A. Clinical and biological significance of RAD51 expression in breast cancer: A key DNA damage response protein. *Breast Cancer Res. Treat.* **2016**, *159*, 41–53. [[CrossRef](#)]
 40. Rodriguez, A.A.; Makris, A.; Wu, M.F.; Rimawi, M.; Froehlich, A.; Dave, B.; Hilsenbeck, S.G.; Chamness, G.C.; Lewis, M.T.; Dobrolecki, L.E.; et al. DNA repair signature is associated with anthracycline response in triple negative breast cancer patients. *Breast Cancer Res. Treat.* **2010**, *123*, 189–196. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
 - Grabauskiene, S.; Bergeron, E.J.; Chen, G.; Chang, A.C.; Lin, J.; Thomas, D.G.; Giordano, T.J.; Beer, D.G.; Morgan, M.A.; Reddy, R.M. CHK1 levels correlate with sensitization to pemetrexed by CHK1 inhibitors in non-small cell lung cancer cells. *Lung Cancer* **2013**, *82*, 477–484. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
 41. Albiges, L.; Goubar, A.; Scott, V.; Vicier, C.; Lefebvre, C.; Alsafadi, S.; Commo, F.; Saghatchian, M.; Lazar, V.; Dessen, P.; et al. Chk1 as a new therapeutic target in triple-negative breast cancer. *Breast* **2014**, *23*, 250–258. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
 42. Woditschka, S.; Evans, L.; Duchnowska, R.; Reed, L.T.; Palmieri, D.; Qian, Y.; Badve, S.; Sledge, G., Jr.; Gril, B.; Aladjem, M.I.; et al. DNA double-strand break repair genes and oxidative damage in brain metastasis of breast cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* **2014**, *106*. [[CrossRef](#)]
 43. Jazayeri, A.; Falck, J.; Lukas, C.; Bartek, J.; Smith, G.C.; Lukas, J.; Jackson, S.P. ATM- and cell cycle-dependent regulation of ATR in response to DNA double-strand breaks. *Nat. Cell Biol.* **2006**, *8*, 37–45. [[CrossRef](#)]
 44. Zadorozhny, K.; Sannino, V.; Belan, O.; Mlcouskova, J.; Spirek, M.; Costanzo, V.; Krejci, L. Fanconi-Anemia-Associated Mutations Destabilize RAD51 Filaments and Impair Replication Fork Protection. *Cell Rep.* **2017**, *21*, 333–340. [[CrossRef](#)]
 45. Llorente, B.; Smith, C.E.; Symington, L.S. Break-induced replication: What is it and what is it for? *Cell Cycle* **2008**, *7*, 859–864. [[CrossRef](#)]
 46. Saleh-Gohari, N.; Helleday, T. Conservative homologous recombination preferentially repairs DNA double-strand breaks in the S phase of the cell cycle in human cells. *Nucleic Acids Res.* **2004**, *32*, 3683–

3688. [[CrossRef](#)]
47. Strumberg, D.; Pilon, A.A.; Smith, M.; Hickey, R.; Malkas, L.; Pommier, Y. Conversion of topoisomerase I cleavage complexes on the leading strand of ribosomal DNA into 5^l-phosphorylated DNA double-strand breaks by replication runoff. *Mol. Cell. Biol.* **2000**, *20*, 3977–3987. [[CrossRef](#)]
 48. Deans, A.J.; West, S.C. DNA interstrand crosslink repair and cancer. *Nat. Rev. Cancer* **2011**, *11*, 467–480. [[CrossRef](#)]
 49. Huang, J.; Liu, S.; Bellani, M.A.; Thazhathveetil, A.K.; Ling, C.; de Winter, J.P.; Wang, Y.; Wang, W.; Seidman, M.M. The DNA translocase FANCM/MHF promotes replication traverse of DNA interstrand crosslinks. *Mol. Cell* **2013**, *52*, 434–446. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
 50. Akkari, Y.M.; Bateman, R.L.; Reifsteck, C.A.; Olson, S.B.; Grompe, M. DNA replication is required To elicit cellular responses to psoralen-induced DNA interstrand cross-links. *Mol. Cell. Biol.* **2000**, *20*, 8283–8289. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
 51. Kim, H.; George, E.; Ragland, R.; Rafail, S.; Zhang, R.; Krepler, C.; Morgan, M.; Herlyn, M.; Brown, E.; Simpkins, F. Targeting the ATR/CHK1 Axis with PARP Inhibition Results in Tumor Regression in BRCA-Mutant Ovarian Cancer Models. *Clin. Cancer Res.* **2017**, *23*, 3097–3108. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
 52. Yarden, R.I.; Metsuyanin, S.; Pickholtz, I.; Shabbeer, S.; Tellio, H.; Papa, M.Z. BRCA1-dependent Chk1 phosphorylation triggers partial chromatin disassociation of phosphorylated Chk1 and facilitates S-phase cell cycle arrest. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2012**, *44*, 1761–1769. [[CrossRef](#)]
 53. Mijic, S.; Zellweger, R.; Chappidi, N.; Berti, M.; Jacobs, K.; Mutreja, K.; Ursich, S.; Ray Chaudhuri, A.; Nussenzweig, A.; Janscak, P.; et al. Replication fork reversal triggers fork degradation in BRCA2-defective cells. *Nat. Commun.* **2017**, *8*, 859. [[CrossRef](#)]
 54. Sorensen, C.S.; Hansen, L.T.; Dziegielewska, J.; Syljuasen, R.G.; Lundin, C.; Bartek, J.; Helleday, T. The cell-cycle checkpoint kinase Chk1 is required for mammalian homologous recombination repair. *Nat. Cell Biol.* **2005**, *7*, 195–201. [[CrossRef](#)]
 55. Huntoon, C.J.; Flatten, K.S.; Wahner Hendrickson, A.E.; Huehls, A.M.; Sutor, S.L.; Kaufmann, S.H.; Karnitz, L.M. ATR inhibition broadly sensitizes ovarian cancer cells to chemotherapy independent of BRCA status. *Cancer Res.* **2013**, *73*, 3683–3691. [[CrossRef](#)]
 56. Telli, M.L.; Stover, D.G.; Loi, S.; Aparicio, S.; Carey, L.A.; Domchek, S.M.; Newman, L.; Sledge, G.W.; Winer, E.P. Homologous recombination deficiency and host anti-tumor immunity in triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* **2018**, *171*, 21–31. [[CrossRef](#)]



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

II. Ergänzende Materialien

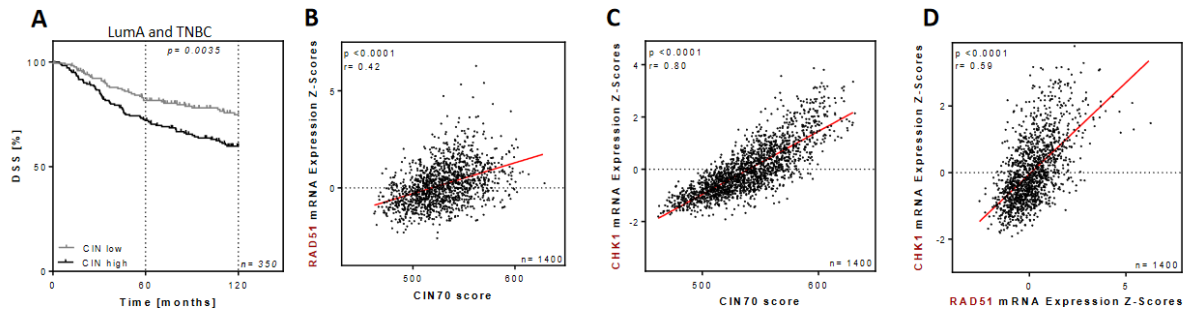


Fig. S1: (A) Kaplan-Meier survival analysis of the CIN70 score as prognostic factor for DSS in 350 patients with luminal A or Triple-negative breast cancer (log-rank test). DSS is plotted against time. (B, C) Correlation of the CIN70 score and the mRNA expression of RAD51 and CHK1. The mRNA expression values for RAD51 (B) or CHK1 (C) were sorted by magnitude, plotted against the corresponding CIN70 scores and correlated. (D) Correlation of CHK1 and RAD51 mRNA expression. The mRNA expression values of CHK1 were sorted by magnitude and plotted against the corresponding RAD51 mRNA-expression values. For statistical analysis the Pearson coefficient and p values were calculated.

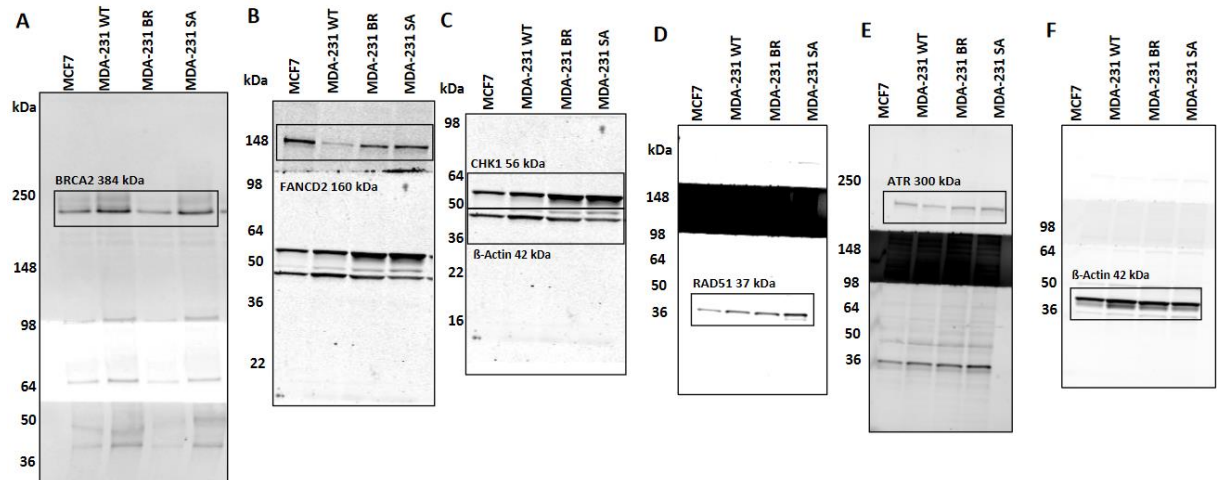


Fig. S2A: The full length blots of Figure 2A. Crop lines are indicated in the full length western blots for BRCA2 (A), FANCD2 (B), CHK1 (C), RAD51 (D), ATR(E) and β -actin(F). After reaction with the BRCA2-antibody the same blot was stripped, re-blocked with skim milk and then reacted with the anti-FANCD2, anti-CHK1 and anti- β -actin antibodies. kDa: Kilodalton. Only black framed bands were used in figure 1A.

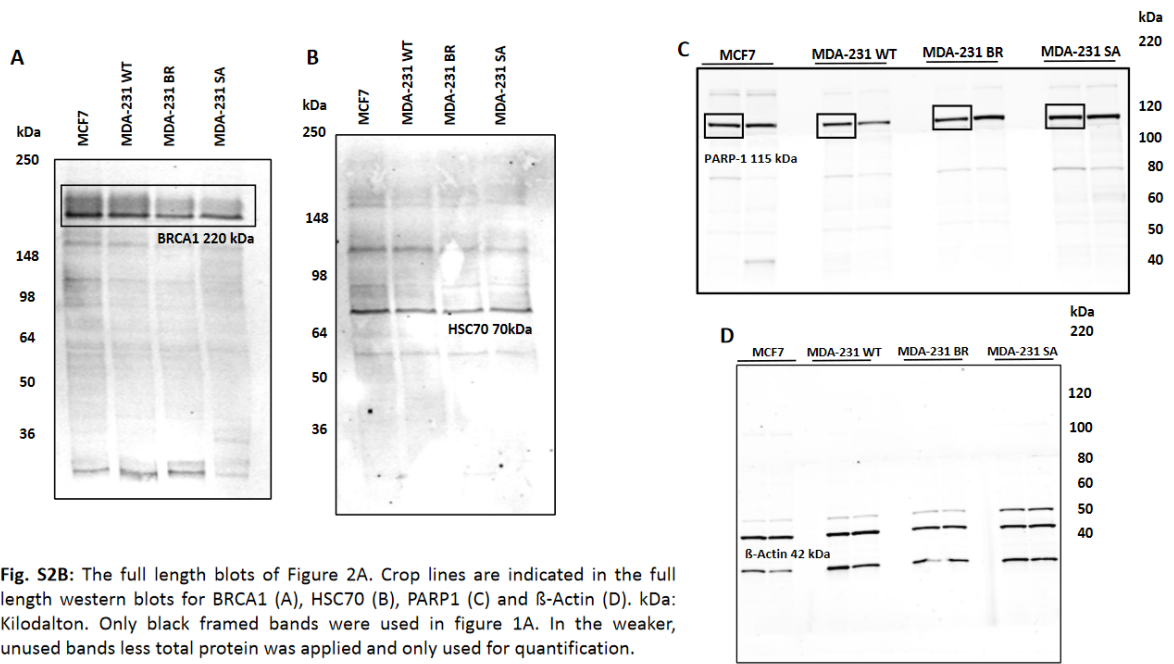


Fig. S2B: The full length blots of Figure 2A. Crop lines are indicated in the full length western blots for BRCA1 (A), HSC70 (B), PARP1 (C) and β -Actin (D). kDa: Kilodalton. Only black framed bands were used in figure 1A. In the weaker, unused bands less total protein was applied and only used for quantification.

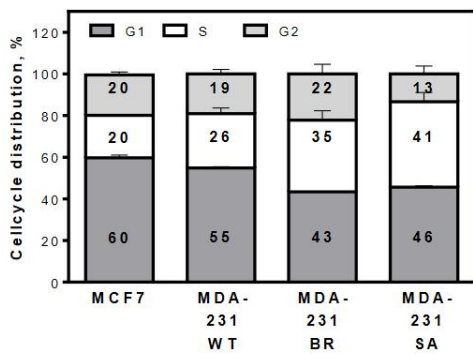


Fig S3: Cell cycle distribution from the luminal and the TNBC cell lines. Exponentially growing cells were fixed, the DNA was labelled with propidium iodide and the cell cycle phases were determined by analysis of the DNA content in the flow cytometer. Shown are means from three independent experiments \pm SEM.

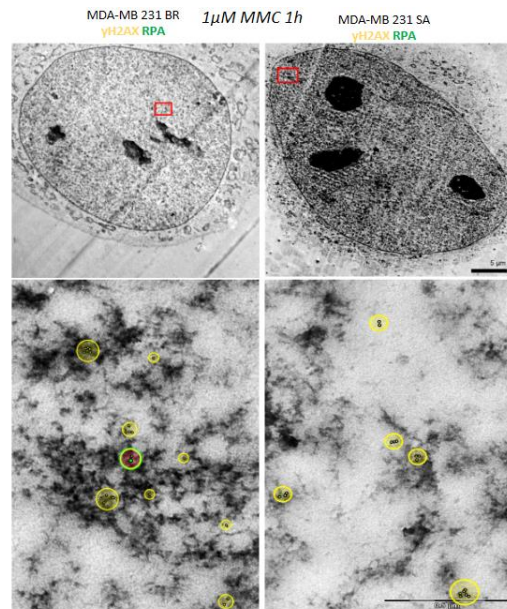


Fig. S4: Transmission electron microscopy shows colocalization of gold-labeled γ H2AX (yellow) and RPA (green) for MDA-MB-231 BR and MDA-MB-231 SA cells 24h after treatment with 0.5 μ g/mL MMC for 1h within nuclear ultrastructure mainly associated to heterochromatic regions.

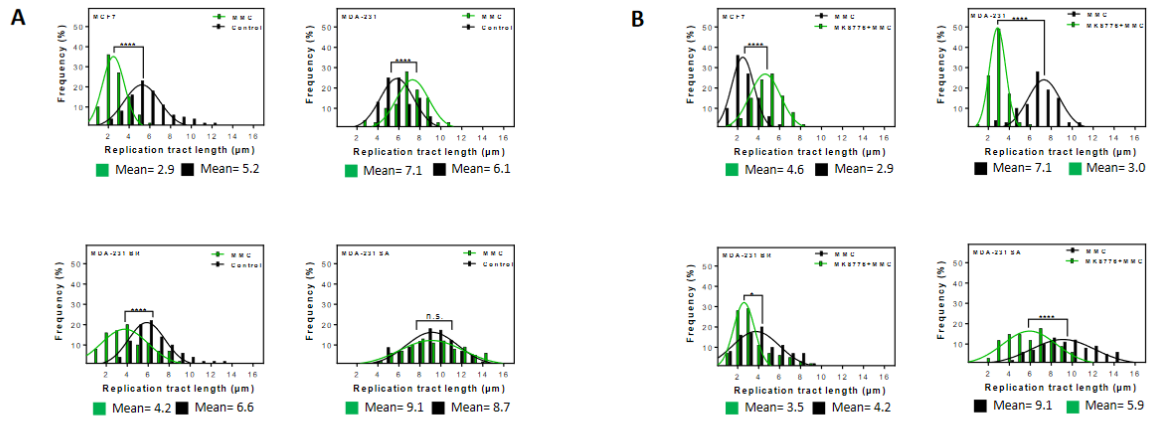


Fig. S5: CHK1 inhibition induces replication stress only in MMC resistant cells. **(A)** Frequency distribution of DNA fiber lengths (IdU) in untreated and MMC treated cells. Exponentially growing cells were sequentially labeled with CldU and IdU in the absence or presence of mitomycin C (0.1μM). DNA was spread and incorporated CldU and IdU was detected with appropriate antibodies. Shown are means ± SEM of DNA fiber lengths (IdU) frequency distributions of three independent experiments. Asterisks (*) represents significant differences (** p < 0.01; *** p < 0.0001, Student's t-test). **(B)** DNA fiber lengths of IdU labeled tracts after treatment with mitomycin C in the presence of the CHK1 inhibitor MK8776 (1μM). Exponentially growing cells were incubated for 2h with MK8776 and sequentially labeled with CldU and IdU (plus 0.1μM MMC), DNA was spread and incorporated nucleotides were detected with the appropriate antibodies. The frequency distribution of DNA fiber lengths in the first label (CldU) of three independent experiments is shown. Asterisks (*) represents significant differences (*p<0.05; **p<0.01; ***p<0.0001, Student's t-test).

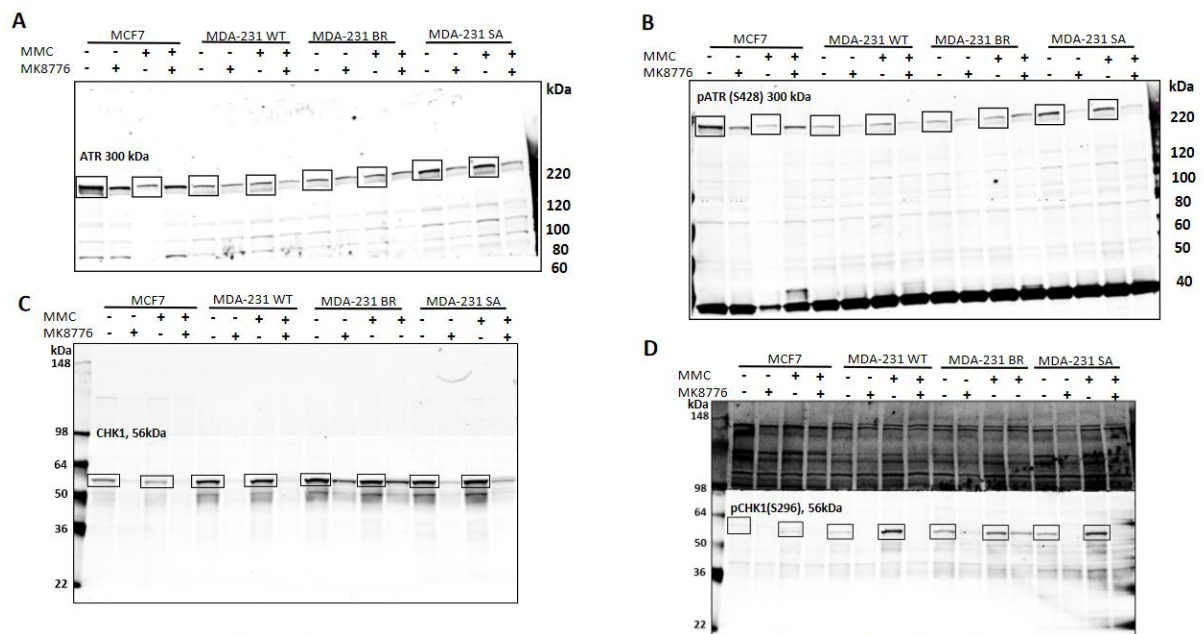


Fig. S6A: The full length blots of Figure 4B. Crop lines are indicated in the full length western blots for (A) ATR, (B) pATR, CHK1 (C) and pCHK1 (D). kDa: Kilodalton. Only black framed bands were used in figure 4A. The weaker, unused bands are the same cells, but additionally treated with MK8776.

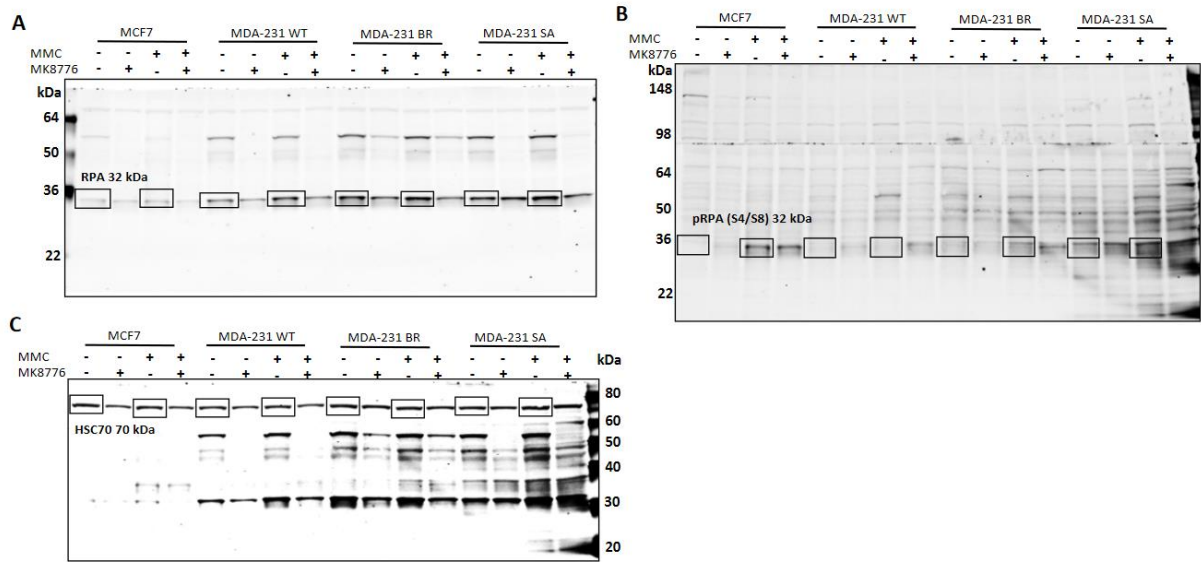


Fig. S6B: The full length blots of Figure 4B. Crop lines are indicated in the full length western blots for (A) RPA, (B) pRPA and (C) HSC70. kDa: Kilodalton. Only black framed bands were used in figure 4A. The weaker, unused bands are the same cells, but additionally treated with MK8776.

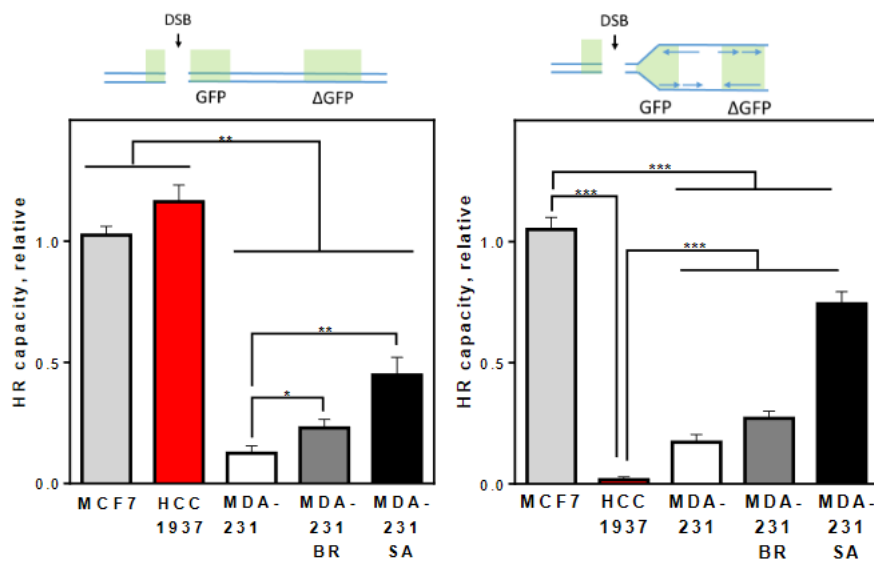


Fig. S7: Repair of frank and (left) replication-associated DSB (right), measured by plasmid reconstruction assay and analyzed by FACS. Cells were transiently transfected with DR-GFP construct (B) or DR-ori-GFP plus the ori-activating MSCV-N EBNA1 construct (B) for 24h. The number of GFP-expressing cells was normalized to the absolute HR capacity of MCF7

III. Abkürzungsverzeichnis

ATM	Ataxia teleangiectasia mutated
ATR	Ataxia teleangiectasia and Rad3 related
BR	Brain
BRCA1	Breast cancer gene 1
BRCA2	Breast cancer gene 2
CHK1	Checkpointkinase 1
CHK2	Checkpointkinase 2
CIN	Chromosomal instability
CldU	5-Chloro-2'-deoxyuridine
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DR-GFP	Direct repeats green fluorescent protein
DR-ori-GFP	Direct repeats origen green fluorescent protein
DSB	Double strand break
DSS	Disease specific survival
EBNA1	Epstein-Barr-Virus nukleäres Antigen 1
EdU	5-Ethynyl-2'-deoxyuridine
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FANCD2	Fanconi anemia group D2 protein
G2-Phase	Gap 2 Phase
Her2	Human epidermal growth factor receptor 2
HR	Homologe Rekombination
HU	Hydroxy Urea
IC 50	mittlere inhibitorische Konzentration
IdU	5-iodo-2'-deoxyuridine
Ki67	Kiel-Antigen 67
LumA	Luminal A
MCF7	Michigan Cancer Foundation 7
MDA-MB 231	M. D. Anderson Metastasis Breast cancer 231
µM	Mikromol
MK8776	CHK1-Inhibitor
MMC	Mitomycin C
MRE11	Meiotic recombination 11 protein
mRNA	messenger ribonucleic acid)
PARP1	Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase 1
RAD51	DNA-bindendes Protein
RPA	Replication protein A
SA	Bone marrow
S-Phase	Synthese-Phase
TNBC	Triple negative breast cancer
WT	Wildtyp

IV. Darstellung der Publikation

1. Einleitung

Trotz intensiver Forschung und einer Vielzahl von Therapiemöglichkeiten lassen sich bestimmte Mammakarzinome noch immer schwer behandeln. Bekanntlich umfasst Brustkrebs eine Gruppe heterogener Erkrankungen, die sich in Auftreten, Behandelbarkeit und Prognose unterscheiden. Prognostisch relevant sind unter anderem die vier molekularen Subtypen: (1) Luminal-A (Hormonrezeptor-positiv, Her2-negativ, Ki67 niedrig), (2) Luminal-B (Hormonrezeptor-positiv, Her2-negativ, Ki67 hoch), (3) Her2-positiv (Hormonrezeptor-positiv/-negativ, Her2-positiv) und (4) Triple-negativ (Hormonrezeptor-negativ, Her2-negativ). Triple-negative Tumoren (TNBC) zeigen die schlechteste Prognose [1]. Während Hormonrezeptor-positive Brustkrebstumoren mittels hormoneller Therapie, sowie Her2-positive Tumoren dank moderner Antikörpertherapie mit Trastuzumab zielgerichtet behandelt werden können, fehlt es für TNBC im klinischen Alltag weiterhin an zielgerichteten Substanzen. Immuntherapien zeigen erste vielversprechende Ergebnisse [4]. Die Inhibition des DNA-Reparatur-Proteins PARP1 hat sich ebenfalls als Therapieansatz bewährt [5]. Dieses Enzym ist insbesondere essentiell für die Reparatur einzelsträngiger DNA-Brüche. Nach Behandlung mit PARP1-Inhibitoren ist dieser Reparaturweg ausgeschaltet und es greift stattdessen der eigentlich für doppelsträngige DNA-Schäden vorgesehene Reparaturmechanismus, die Homologe Rekombination (HR). Besteht jedoch zusätzlich ein Defekt in der HR, so ist die Zelle nicht in der Lage, den Schaden zu reparieren und es entsteht eine selektive Tumortoxizität. Dieses Prinzip wird auch „synthetische Letalität“ [6,10] genannt.

Defekte in DNA-Reparaturmechanismen können die genomische Instabilität von Tumoren erhöhen. Um diese Instabilität messbar darzustellen, wurde der CIN70-Score entwickelt [2,3]. Mit Hilfe des Scores lassen sich Tumoren hinsichtlich ihrer genomischen Instabilität vergleichen. Dabei zeigte sich ein Zusammenhang zwischen CIN70-Score und Prognose bei einer großen Anzahl von Tumoren, wobei ein hoher CIN70-Score häufig mit einer schlechteren Prognose assoziiert war [3]. Möglicherweise erklärt dieser Zusammenhang, warum auch prinzipiell gut behandelbare Luminal-A-Tumoren sich in einigen Fällen therapieresistent zeigen.

Weiterhin besteht daher Bedarf an neuen Therapieansätzen und an einem besseren Verständnis der DNA-Reparaturfähigkeit von Tumorzellen. Aus diesem Grund sind im Rahmen dieser Dissertation die molekularen Signalkaskaden und im Speziellen die HR mit verschiedenen experimentellen Ansätzen näher untersucht worden. Die Fähigkeit einer Tumorzelle zur DNA-Reparatur, insbesondere zur HR, wurde an vier Zelllinien mittels Plasmid-Rekonstruktions-Assay überprüft. Mit zwei unterschiedlichen Plasmiden wurde untersucht, ob

eine komplexe Schädigung an Replikationsgabeln durch die Zellen schwieriger zu reparieren ist als ein vergleichsweise einfacher Doppelstrangbruch. Diese Hypothese einer unterschiedlichen Reparaturleistung konnte hier nicht bestätigt werden. Es wurde jedoch schnell deutlich, dass weitere Faktoren, neben der HR-Fähigkeit, entscheidend zur Reparaturleistung beitragen könnten. Denn interessanterweise ließen sich zwei der verwendeten Zelllinien (MCF-7 und MDA-MB 231 WT) im Koloniebildungsassay chemotherapeutisch mit Mitomycin C (MMC) behandeln, während zwei andere Zelllinien (MDA-MB 231 BR und -SA) weitgehend resistent blieben. Dabei bestand kein Zusammenhang zwischen der Therapieresistenz und der HR-Fähigkeit der Zelllinien. Diese Arbeit wird zeigen, dass dies unter anderem auf Wirkungen der Checkpointkinase 1 (CHK1) zurückzuführen ist. Indem CHK1 *in vitro* inhibiert wurde, konnte eine signifikante Sensibilisierung gegenüber Mitomycin C erreicht werden.

2. Ergebnisse

2.1 *Das krankheitsspezifische Überleben hängt von der RAD51- und CHK1-mRNA-Expression in luminalen und TNBC-Brustkrebstumoren ab*

Um zu klären, inwiefern sich die genomische Instabilität auf das krankheitsspezifische Überleben (DSS) auswirkt, wurde der Einfluss des CIN70-Scores auf das DSS exemplarisch an Luminal A-Tumoren und TNBC analysiert (Abbildung 1A-C und ergänzende Abbildung S1A). Unabhängig vom Subtyp zeigten Tumore mit hohem CIN70-Score (oberes Quartil) ein signifikant schlechteres 5- und 10-Jahres-DSS im Vergleich zu Tumoren, die einen niedrigen CIN70-Score (unteres Quartil) aufweisen.

Die Ursache für eine erhöhte genomische Instabilität könnte ein Defekt der Homologen Rekombination sein. Um dies zu überprüfen, wurde die mRNA-Expression der entsprechenden DNA-Reparaturproteine RAD51 und CHK1 analysiert. Es zeigte sich, dass die RAD51-Expression in Tumoren mit einem hohen CIN70-Score signifikant höher ist als in Tumoren mit einem niedrigen CIN70-Score (Abbildung 1D und ergänzende Abbildung S1B,D). Besonders ausgeprägt war dieser Effekt in TNBC. Außerdem wurde in beiden Subtypen eine signifikant erhöhte CHK1-Expression in Tumoren mit hohem CIN70-Score im Vergleich zu Tumoren mit niedrigem CIN70-Score (Abbildung 1E und ergänzende Abbildung S1C,D) gefunden. Folglich korreliert eine erhöhte Expression von RAD51 und CHK1 mit hohen CIN70-Scores und demnach auch mit einer ungünstigeren Prognose (Abbildung 1F,G). Patientinnen, deren Tumor eine hohe Expression von RAD51 aufwies, zeigten sowohl nach 5 als auch nach 10 Jahren ein signifikant niedrigeres DSS im Vergleich zu Tumoren mit einer niedrigen RAD51-Expression. Für die Expression von CHK1 war der negative Effekt einer hohen Expression auf das Überleben noch deutlicher. Diese Daten legen

nahe, dass die verminderte DNA-Reparatur und die daraus resultierende genomische Instabilität auf eine erhöhte Expression von RAD51 und/oder CHK1 zurückzuführen ist [17].

2.2 Keine Korrelation von HR-Kapazität, Schutz der Replikationsgabel und Empfindlichkeit gegenüber PARP1-Inhibition und MMC-Behandlung

Zahlreiche Publikationen haben schon früher gezeigt, dass eine hohe Expression von RAD51 nicht zu einer verbesserten HR-Kapazität führt [17,18,19,20,21]. Der Effekt einer hohen CHK1-Expression in Tumoren ist nun erstmals untersucht worden. Auch diese Ergebnisse widersprechen der naheliegenden Annahme, dass je mehr Protein vorhanden ist, desto mehr DNA-Reparaturkapazität zu erwarten wäre. Um die HR-Kapazität genauer zu untersuchen, wurde ein genetisch verwandtes System von TNBC gewählt, das aus drei MDA-MB-231-abgeleiteten Zelllinien besteht, die sich nur in ihrem Metastasierungsmuster unterscheiden. Während MDA-MB 231 WT in alle Organe metastasiert, wird MDA-MB 231 BR ausschließlich im Gehirn und -SA im Knochenmark [21] angesiedelt. Zum Vergleich diente die luminaire Zelllinie MCF7. Mittels dieser Zelllinien wurde untersucht, welchen Einfluss die Expression von DNA-Reparaturproteinen auf die verschiedenen Funktionen der HR (u.a. Doppelstrangbruch-Reparatur), auf den Schutz der Replikationsgabel und das zelluläre Überleben nach Behandlung mit PARP1-Inhibitor oder MMC hat. Eine erhöhte Expression von CHK1 und RAD51 auf Proteinebene wurde in TNBC-Zelllinien festgestellt (TNBC-assoziiertes Expressionsmuster, vgl. Abbildung 2A, ergänzende Abbildung S2A-D). Die MDA-MB 231 WT zeigte eine leicht, die -BR und -SA eine deutlicher erhöhte Expression von CHK1 im Vergleich zur luminalen Zelllinie MCF7. Das gleiche Muster zeigt sich für die Expression von RAD51 mit einem signifikanten Anstieg in MDA-MB 231 WT, -BR und -SA im Vergleich zu MCF7-Zellen. Unterschiede in der HR aufgrund einer höheren S/G2-Phasenfraktion konnten ausgeschlossen werden (ergänzende Abbildung S3).

Ein Doppelstrangbruch (DSB) an einer beliebigen Stelle im Genom führt zu einer anderen DNA-Struktur als ein DSB in unmittelbarer Nachbarschaft zu einer aktiven Replikationsgabel. Um beide Situationen zu simulieren, wurden zwei unterschiedliche DNA-Reparaturkonstrukte verwendet: DR-GFP zur Reparatur einzelner DSBs (Abbildung 2B,C) und DR-ori-GFP zur Reparatur von DSBs an einem Replikationsursprung (Abbildung 2D) [22]. Durchflusszytometrisch zeigten sich signifikant niedrigere HR-Kapazitäten in allen TNBCs im Vergleich zu MCF7-Zellen. Die ursprüngliche Zelllinie MDA-MB 231 WT wies in beiden Konstrukten die niedrigste, -BR eine etwas höhere und -SA die höchste HR-Kapazität auf. Folglich ist die erhöhte Expression von RAD51 und CHK1 nicht mit einer erhöhten DNA-DSB-Reparaturkapazität bei TNBC verbunden.

Zusätzlich zur DSB-Reparatur sind HR-Proteine, u.a. RAD51 und CHK1, für die

Stabilisierung von Replikationsgabeln erforderlich, um diese vor nukleolytischem Abbau zu schützen [8,24]. Um ihre Schutzfunktion zu testen, wurde der DNA-Fiber-Assay durchgeführt (Abbildung 2E). Alle verwendeten Zelllinien zeigten nach Schädigung eine Verkürzung des CldU-Trakts und somit Replikationsstress. Interessanterweise wiesen jedoch die eigentlich HR-kompetenteren Zelllinien mehr Schäden auf, als die Zelllinien mit der schlechteren HR-Kapazität. MCF7 zeigte die stärkste Verkürzung, gefolgt von MDA-MB-231 WT und -BR. MDA-MB 231 SA wies den stärksten Schutz und nur eine minimale Verkürzung des CldU-Trakts auf.

Als nächstes wurde getestet, ob sich der Unterschied in der HR-Kapazität in der Empfindlichkeit gegenüber der PARP1-Inhibition durch Olaparib oder MMC-Behandlung im Koloniebildungsassay widerspiegelt. Abbildung 2F zeigt das zelluläre Überleben nach ansteigenden Konzentrationen von Olaparib und MMC für die vier untersuchten Zelllinien. Trotz unterschiedlicher HR-Kapazität spiegelte sich dies nicht in der Sensitivität gegenüber der PARP1-Inhibition wider, da alle Zelllinien vergleichbare IC50-Werte zwischen $1,9 \pm 0,2 \mu\text{M}$ für die Zelllinien mit der höchsten und $8,5 \pm 0,2 \mu\text{M}$ für die Zelllinie mit der niedrigsten HR-Kapazität zeigten. Der gleiche Effekt, aber in einem größeren Ausmaß, wurde nach der Behandlung mit MMC beobachtet. Auch hier zeigte die Zelllinie mit der geringsten HR-Kapazität eine 10-fach höhere Resistenz. Aufgrund der unterschiedlichen Reaktion auf MMC wurden die Zelllinien klassifiziert in „sensitive Zelllinien“ (MCF7 und MDA-MB 231 BR) sowie „resistente Zelllinien“ (MDA-MB 231 WT und MDA-MB 231 SA). Es ergab sich keine Korrelation zwischen der HR-Kapazität und der zellulären Empfindlichkeit gegenüber bestimmten Chemotherapeutika.

2.3 *Assoziation von MMC-Empfindlichkeit und Bildung von DNA-Schadensfoci in der S-Phase*

Die Bildung sowie anschließende Entfernung von RAD51-Foci nach endogener oder exogener DNA-Schädigung kennzeichnet die erfolgreiche DNA-Reparatur mittels HR in der S- und G2-Phase. Abbildung 3A zeigt die Bildung von RAD51-Foci nach Behandlung mit MMC: Alle hier verwendeten Zelllinien waren in der Lage, RAD51-Foci zu bilden. Die MMC-resistenten TNBCs zeigten jedoch nur eine schwache Induktion im Vergleich zu den sensitiven Zelllinien. Ein vergleichbares Muster wurde auch für die Anzahl der γH2AX -Foci beobachtet, mit einer signifikant stärkeren Vervielfachung in sensitiven im Vergleich zu resistenten Zelllinien. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die HR (trotz reduzierter Kapazität im Plasmid-Rekonstruktionsassay) der bevorzugte DNA-Reparaturweg in den beiden resistenten Zelllinien MDA-MB 231 WT und -SA in der S-Phase sein könnte.

Um zu analysieren, ob die hohen Mengen an RAD51- und γH2AX -Foci in den MMC-

sensitiven Zellen durch erhöhten Replikationsstress entstehen, wurden RPA-Foci nach MMC-Behandlung in EdU-positiven Zellen quantifiziert (Abbildung 3B). Die beiden sensitiven Zelllinien zeigten auch ohne exogene Schädigung 1,5- bis 2-mal höhere Mengen an RPA-Foci als die resistenten Zelllinien. Dieser erhöhte Replikationsstress in den sensitiven Zelllinien trat auch nach der Behandlung mit MMC auf (mehr RPA-Foci im Vergleich zu den resistenten Zelllinien). Um das Auftreten von DNA-Schäden in der S-Phase weiter zu lokalisieren, wurden Replikations-assoziierte DSBs durch parallele Markierung von γ H2AX und RPA nach MMC-Gabe in einer sensitiven (MDA-MB 231 BR) und einer resistenten Zelllinie (MDA-MB-231 SA) elektronenmikroskopisch sichtbar gemacht (Abbildung 3C, ergänzende Abbildung S4). In der sensitiven Zelllinie zeigte sich bereits im unbehandelten Zustand eine Anhäufung von γ H2AX neben isolierten RPA-Foci in heterochromatischen Bereichen, während die resistente Linie sowohl RPA als auch γ H2AX eher sporadisch und breiter verteilt zeigte. Dieser Trend verstärkte sich nach der Behandlung mit MMC weiter und zeigte in der sensitiven Zelllinie die Anhäufung von mehreren γ H2AX-Signalen um ein einzelnes RPA-Signal, während in der resistenten Zelllinie beide Marker im Zellkern verstreut blieben (ergänzende Abbildung S4). Dies deutet darauf hin, dass die sensitive Zelllinie vermehrt DSBs an blockierten Replikationsgabeln aufweist, was allgemein auch als Replikationsstress bezeichnet wird. Die Daten zeigen außerdem deutlich, dass die MMC-Sensitivität höchstwahrscheinlich auf erhöhten Replikationsstress in beiden sensitiven Zelllinien zurückzuführen ist.

2.4 Aktivierung der DNA-Schadensreaktion führt zu MMC-Resistenz durch Vermeidung von Replikationsstress

Der zellulären Empfindlichkeit gegenüber MMC könnten beeinträchtigte Replikationsprozesse zugrunde liegen [24]. Abbildung 4A zeigt die Häufigkeitsverteilung der DNA-Stranglängen vor und nach Behandlung mit MMC im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (ergänzende Abbildung S5A). Die sensitiven Zelllinien MCF7 und MDA-MB 231 BR zeigten nach Schädigung mit MMC signifikant kürzere DNA-Stränge als in der unbehandelten Kontrolle, während die beiden resistenten Zelllinien eine moderate oder keine Verkürzung aufwiesen. Diese Beobachtungen zeigen, dass die unterschiedliche HR-Kapazität (Abbildung 2B-D) die Unterschiede in der zellulären Sensitivität gegenüber MMC nicht erklären kann. Stattdessen scheint diese mit dem Schutz der Replikation und damit mit der DNA-Schadensantwort an der Replikationsgabel verbunden zu sein.

Um dies zu verifizieren, wurde die Aktivierung von ATR, CHK1 und RPA untersucht. Abbildung 4B zeigt die Phosphorylierung der genannten Proteine nach MMC-Behandlung (ergänzende Abbildung S6A,B). Die Phosphorylierung von CHK1 war eindeutig mit der Resistenz gegen MMC assoziiert und zeigte eine mehr als zweifache Aktivierung in den beiden

resistenten Zelllinien im Vergleich zu den beiden sensitiven Zelllinien. Diese Aktivierung spiegelte sich auch in der verminderten Phosphorylierung von RPA wider, die in den beiden sensitiven, nicht aber in den beiden resistenten Zelllinien eine $7,0 \pm 0,4$ - bzw. $6,0 \pm 0,02$ -fache Erhöhung zeigte. Die Aktivierung von ATR hingegen zeigte keine konsistente Reaktion in den sensitiven und resistenten Zelllinien. Diese Aktivierungsmuster legen nahe, dass CHK1 eine entscheidende Rolle bei der MMC-Resistenz spielt. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden die Zellen in Gegenwart eines CHK1-Inhibitors mit MMC behandelt und anschließend die Länge der DNA-Stränge mit dem DNA-Fiber-Assay bestimmt. Abbildung 4C zeigt die Häufigkeitsverteilung der mit CldU oder IdU (ergänzende Abbildung S5B) markierten DNA-Fiber, d. h. vor der MMC-Schädigung, aber in Anwesenheit des CHK1-Inhibitors MK8776. Wie erwartet, zeigten die beiden resistenten Zelllinien eine signifikante Reaktion auf den CHK1-Inhibitor, während bei den sensitiven Zelllinien nur geringe Effekte vorhanden waren. Dies bestätigt die Vermutung, dass die beobachtete Resistenz auf eine erhöhte Aktivierung von CHK1 zurückzuführen ist.

2.5 Die Aktivierung von CHK1 schützt vor DNA-Schäden in der S-Phase und vermittelt die Resistenz gegen MMC in HR-defizienten Zelllinien

Als nächstes wurde untersucht, ob der beobachtete Replikationsstress nach Inhibition von CHK1 in den beiden resistenten Zelllinien einen Einfluss auf DNA-Schäden und das zelluläre Überleben hat. Abbildung 5A zeigt das Auftreten eines pan-nukleären γ H2AX-Signals als Marker der replikativen Katastrophe [25] nach MMC-Behandlung. Während in den beiden sensitiven Zelllinien ein großer Anteil an Zellen mit pan-nukleärem γ H2AX-Signal nach MMC-Gabe beobachtet werden konnte, zeigten die beiden resistenten Linien einen 3- bis 4-fach geringeren Anteil an pan-nukleären γ H2AX-positiven Zellen. Umgekehrt stieg nach einer kombinierten Behandlung mit MMC und CHK1-Inhibitor der Anteil der pan-nukleären γ H2AX-positiven Zellen in den beiden resistenten Zelllinien um das 6- bzw. 2,5-fache, während die beiden sensitiven Linien nur einen 1,2-fachen Anstieg im Vergleich zur MMC-Monobehandlung aufwiesen. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die MMC-Behandlung allein bereits ausreichend war, um die replikative Katastrophe in den sensitiven Zellen zu induzieren. In den resistenten Zellen wurde dieser Effekt nur dann in vergleichbarem Ausmaß erreicht, wenn MMC mit CHK1-Inhibition kombiniert wurde.

3. Diskussion

Diese Studie zeigt die negative Assoziation eines hohen CIN70-Scores mit dem DSS bei Brustkrebs und bestätigt Daten früherer Studien [2,3]. Außerdem wurde deutlich, dass dieser Zusammenhang sowohl in gut als auch in schlecht therapierbaren Untergruppen von Brustkrebs besteht. Bei grundsätzlich erhöhter genomischer Instabilität in TNBC bedeutet ein gleicher CIN70-Score in LumA eine vergleichsweise eher hohe, in TNBC eine

vergleichsweise eher niedrige Instabilität. Dies impliziert, dass der Einsatz einer aggressiveren Therapie bei LumA mit einem hohen CIN70-Score möglicherweise zu deutlich höheren Überlebensraten führen könnte. Eine verbesserte DNA-Reparaturkapazität zur Kompensation der höheren CIN mit einer daraus resultierenden Therapieresistenz ist die Ursache für die schlechte Prognose bei Brustkrebs wie auch bei anderen Tumoren [3]. Es bestätigt sich, dass diese Annahme nicht nur für TNBCs, sondern auch für LumA gilt, mit einer signifikant erhöhten mRNA-Expression von RAD51 und CHK1 in Tumoren mit hohem CIN-Score. Entsprechend war das DSS negativ mit einer erhöhten Expression beider Gene assoziiert. Dies bestätigt Daten, die eine Assoziation von hoher Expression und schlechter Prognose für RAD51 [26,27,28,29] sowie CHK1 [29,30,31] auf Protein- bzw. mRNA-Ebene zeigen. Allerdings gibt es auch einen hochsignifikanten Anstieg der mRNA-Expression bei hoher CIN, sowohl für RAD51 und noch stärker für CHK1. Diese Beobachtung zeigt deutlich, dass mehr DNA-Reparaturprotein nicht zu einer erhöhten DNA-Reparatur führt. Es scheint wahrscheinlicher, dass die übergeordnete DNA-Schadensantwort mit Zellzykluskontrollpunkten oder einer erhöhten Toleranz gegenüber DNA-Schäden ursächlich ist. Beide Möglichkeiten würden zu einem verminderten Ansprechen und einem schlechteren Überleben der behandelten Patientinnen führen. In der vorliegenden Studie scheint die allgemeine DNA-Schadensantwort der entscheidende Faktor für die beobachtete Therapieresistenz bei TNBCs zu sein.

Es konnte zudem gezeigt werden, dass TNBC-Zellen trotz reduzierter HR-Kapazität keine Verkürzung von Replikationsgabeln und keine erhöhte Olaparib-Sensitivität aufweisen. Vielmehr wurde eine Resistenz nach MMC-Gabe bei ausreichender RAD51-Focibildung und entsprechend niedrigen Werten des DNA-Schadensmarkers γ H2AX in der S-Phase beobachtet. Dies war auf eine ausgeprägte Aktivierung der DNA-Schadensantwort durch CHK1 zurückzuführen, die für eine ungestörte Replikation sorgte und durch CHK1-Inhibition rückgängig gemacht werden konnte. Somit demonstriert diese Studie eine wichtige Rolle von CHK1, indem es eine reduzierte HR-Kapazität kompensieren und Replikationsstress bei TNBC verhindern kann.

Eine Korrelation von erhöhter RAD51- und CHK1-Expression wurde in mehreren Studien beobachtet und war signifikant mit der Tripelnegativität assoziiert [34]. Die hier beobachtete geringe HR-Kapazität in TNBC-Zellen bestätigt auch die beschriebene eingeschränkte HR-Funktionalität in TNBCs im klinischen Setting [14]. Trotz hoher RAD51-Expression und funktionsfähigem BRCA1 wurde mit dem Plasmid-Rekonstruktions-Assay eine geringe HR-Kapazität beobachtet. Dies könnte auf eine fehlende Aktivierung von CHK2 über ATM zurückgeführt werden [35]. Es ist allerdings wahrscheinlicher, dass die Induktion eines einzelnen DSB weder ATM, noch ATR aktiviert [7]. Die begrenzte Aussagekraft der Detektion

eines einzelnen DSB wird stark durch die Beobachtung unterstützt, dass Zellen ohne BRCA1-Expression eine hohe HR-Kapazität für einen replikationsunabhängigen DSB und praktisch keine HR-Kapazität für einen replikationsassoziierten DSB zeigen (Ergänzende Abbildung S7).

Eine der weiteren Funktionen der HR ist der Schutz von Replikationsgabeln. Dennoch zeigten Zellen mit der höchsten HR-Kapazität zugleich die höchste Instabilität an dieser Stelle. Ein trotz funktioneller HR reduzierter Schutz von Replikationsgabeln wurde bereits in Tumorzellen beobachtet [8]. Dies unterscheidet Tumor- von Nicht-Tumorzellen, für die die Stabilisierung von Replikationsgabeln durch HR-Faktoren essentiell ist [13,36].

Trotz ihrer geringen HR-Kapazität waren MDA-MB 231 resistent gegen Olaparib und MMC. Beide Wirkstoffe führen zu ein-endigen DSBs, die auftreten, wenn eine Replikationsgabel auf einen Einzelstrangbruch trifft und kollabiert [37,38]. Der aus der MMC-Behandlung resultierende ein-endige DSB stellt für die Zelle eine komplexe Reparatursituation dar und aktiviert sowohl die Nukleotid-Exzisions- als auch die Fanconi-Reparaturfaktoren (FANC) [39]. Erst nach erfolgreicher Aktivierung von FANCD2 wird im weiteren Reparaturprozess ein Substrat für HR bereitgestellt [39,40]. Alle Zelllinien konnten entsprechend ihres zellulären Überlebens nach MMC erfolgreich RAD51-Foci bilden. Es wurde also in diesem Fall kein HR-Defekt beobachtet.

Die Prozesse der HR an der Replikationsgabel, wie der Schutz der Replikationsgabel und die Reparatur von ein-endigen DSB, werden durch die Intra-S-Phase-Schadensreaktionskinase ATR und ihre nachgeschaltete Kinase CHK1 kontrolliert [35]. Diese stabilisierende Funktion von CHK1 kann nach PARP1-Inhibition und MMC-Behandlung beobachtet werden und ist unabhängig von ATR, RAD51 und BRCA1 [23,33,42,43]. Der Resistenzmechanismus könnte die Vermeidung von ein-endigen DSBs oder die Aktivierung alternativer DNA-Reparaturwege beinhalten [11,43]. Die Inhibition von CHK1 führt zu einer verstärkten Initiierung der Replikation und einer erhöhten Phosphorylierung weiterer ATR-Zielstrukturen. Dies führt zur Produktion von mehr DSBs, reduzierter MRE11-Aktivität [12] und einer beeinträchtigten HR-Funktion aufgrund der Phosphorylierung von RAD51 [45]. Somit kann eine effiziente Nutzung der ATR-CHK1-Signalkaskade eine reduzierte HR-Funktion kompensieren. Dies wird durch Studien beim Ovarialkarzinom bestätigt [41,44]. Die Aktivierung von CHK1 könnte die Sensitivität von HR-defizienten Tumoren beeinflussen. Daher sollten die etablierten Methoden zur Identifizierung von HR-defizienten Tumoren um den Nachweis der CHK1-Aktivierung erweitert werden. Dies könnte durch die Ergänzung der BRCA1/2-Testung um Gene der Intra-S-Phasen-Schadensantwort oder den kombinierten Nachweis von RAD51 mit RPA in S-Phasen-Zellen ermöglicht werden [15,16,45].

V. Zusammenfassung

Chromosomale Instabilität hat nicht nur einen negativen Einfluss auf das Überleben bei triple-negativem Brustkrebs, sondern auch auf die gut behandelbare Untergruppe der luminalen A-Tumoren. Dies deutet auf einen generellen, Subtypen-unabhängigen Mechanismus hin, der diesen Effekt bewirkt. Die erhöhte chromosomale Instabilität wird auf einen Defekt in der Homologen Rekombination zurückgeführt, die für Reparatur und Schutz der Replikation sorgt. Es ist unklar, ob genetische Veränderungen tatsächlich zu einem Reparaturdefekt führen oder ob übergeordnete Signalwege von größerer Bedeutung sind. Bisherige Studien konzentrierten sich ausschließlich auf die Reparaturfunktion der HR. In dieser Arbeit wird erstmalig gezeigt, dass die Regulation der HR durch die Intra-S-Phase-DNA-Schadensantwort von übergeordneter Bedeutung ist. ATR-CHK1 aktiviert die DNA-Schadensantwort und ist somit in der Lage, Replikationsstress zu verhindern. Diese Signalkaskade kann außerdem eine reduzierte HR kompensieren und die Resistenzbildung HR-defizienter Tumore bedingen. Etablierte Methoden zur Identifizierung von HR-defizienten Tumoren für PARP1-Inhibitor-Therapien sollten somit um die Analyse von Genen für die Intra-S-Phase-DNA-Schadensantwort erweitert werden.

VI. Summary

Chromosomal instability not only has a negative effect on survival in triple-negative breast cancer, but also on the well treatable subgroup of luminal A tumors. This suggests a general mechanism independent of subtypes. Increased chromosomal instability is attributed to a defect in homologous recombination. HR prevents genomic instability by repair and protection of replication. It is unclear whether genetic alterations actually lead to a repair defect or whether superior signaling pathways are of greater importance. Previous studies focused exclusively on the repair function of HR. Here, we show that the regulation of HR by the intra-S-phase damage response is of overriding importance. A damage response activated by ATR-CHK1 can prevent replication stress and lead to resistance formation. The signaling cascade can compensate for a double-strand break repair error and lead to resistance of HR-deficient tumors. Established methods for the identification of HR-deficient tumors for PARP1-inhibitor therapies should be extended to include gene analysis for intra-S-phase damage response.

VII. Literaturverzeichnis

1. Bianchini G., Balko J.M., Mayer I.A., Sanders M.E., Gianni L. Triple-negative breast cancer: Challenges and opportunities of a heterogeneous disease. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 2016;13:674–690. doi: 10.1038/nrclinonc.2016.66.
2. Carter S.L., Eklund A.C., Kohane I.S., Harris L.N., Szallasi Z. A signature of chromosomal instability inferred from gene expression profiles predicts clinical outcome in multiple human cancers. *Nat. Genet.* 2006;38:1043–1048. doi: 10.1038/ng1861.
3. Birkbak N.J., Eklund A.C., Li Q., McClelland S.E., Endesfelder D., Tan P., Tan I.B., Richardson A.L., Szallasi Z., Swanton C. Paradoxical relationship between chromosomal instability and survival outcome in cancer. *Cancer Res.* 2011;71:3447–3452. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-3667.
4. Schmid P, Adams S, Rugo HS, Schneeweiss A, Barrios CH, Iwata H, Diéras V, Hegg R, Im SA, Shaw Wright G, Henschel V, Molinero L, Chui SY, Funke R, Husain A, Winer EP, Loi S, Emens LA; IMpassion130 Trial Investigators. Atezolizumab and Nab-Paclitaxel in Advanced Triple-Negative Breast Cancer. *N Engl J Med.* 2018 Nov 29;379(22):2108-2121. doi: 10.1056/NEJMoa1809615.
5. Robson M, Im SA, Senkus E, Xu B, Domchek SM, Masuda N, Delaloge S, Li W, Tung N, Armstrong A, Wu W, Goessl C, Runswick S, Conte P. Olaparib for Metastatic Breast Cancer in Patients with a Germline BRCA Mutation. *N Engl J Med.* 2017 Aug 10;377(6):523-533. doi: 10.1056/NEJMoa1706450. Epub 2017 Jun 4. Erratum in: *N Engl J Med.* 2017 Oct 26;377(17):1700. PMID: 28578601.
6. Ashworth A. A synthetic lethal therapeutic approach: poly(ADP) ribose polymerase inhibitors for the treatment of cancers deficient in DNA double-strand break repair. *J Clin Oncol.* 2008;26:3785–3790.
7. Saleh-Gohari N., Bryant H.E., Schultz N., Parker K.M., Cassel T.N., Helleday T. Spontaneous homologous recombination is induced by collapsed replication forks that are caused by endogenous DNA single-strand breaks. *Mol. Cell. Biol.* 2005;25:7158–7169. doi: 10.1128/MCB.25.16.7158-7169.2005.
8. Schlacher K., Wu H., Jasin M. A distinct replication fork protection pathway connects Fanconi anemia tumor suppressors to RAD51-BRCA1/2. *Cancer Cell.* 2012;22:106–116. doi: 10.1016/j.ccr.2012.05.015.
9. Poole L.A., Cortez D. Functions of SMARCAL1, ZRANB3, and HLF in maintaining genome stability. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 2017;52:696–714. doi: 10.1080/10409238.2017.1380597.
10. Liao H., Ji F., Helleday T., Ying S. Mechanisms for stalled replication fork stabilization: New targets for synthetic lethality strategies in cancer treatments. *EMBO Rep.* 2018;19 doi: 10.15252/embr.201846263.
11. Gonzalez Besteiro M.A., Gottifredi V. The fork and the kinase: A DNA replication tale from a CHK1 perspective. *Mutat. Res. Rev. Mutat. Res.* 2015;763:168–180. doi: 10.1016/j.mrrev.2014.10.003.
12. Thompson R., Montano R., Eastman A. The Mre11 nuclease is critical for the sensitivity of cells to Chk1 inhibition. *PLoS ONE.* 2012;7:e44021. doi: 10.1371/journal.pone.0044021.
13. Petermann E., Woodcock M., Helleday T. Chk1 promotes replication fork progression by controlling replication initiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2010;107:16090–16095. doi: 10.1073/pnas.1005031107.
14. Telli M.L., Timms K.M., Reid J., Hennessy B., Mills G.B., Jensen K.C., Szallasi Z., Barry W.T., Winer E.P., Tung N.M., et al. Homologous Recombination Deficiency (HRD) Score Predicts Response to Platinum-Containing Neoadjuvant Chemotherapy in Patients with Triple-Negative Breast Cancer. *Clin. Cancer Res.* 2016;22:3764–3773. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-15-2477.
15. Naipal K.A., Verkaik N.S., Ameziane N., van Deurzen C.H., Ter Brugge P., Meijers M., Sieuwerts A.M., Martens J.W., O'Connor M.J., Vrieling H., et al. Functional ex vivo assay to select homologous recombination-deficient breast tumors for PARP inhibitor treatment. *Clin. Cancer Res.* 2014;20:4816–4826. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-14-0571.
16. Parplys A.C., Seelbach J.I., Becker S., Behr M., Wrona A., Jend C., Mansour W.Y., Joosse S.A., Stuerzbecher H.W., Pospiech H., et al. High levels of RAD51 perturb DNA replication elongation and cause unscheduled origin firing due to impaired CHK1 activation. *Cell Cycle.* 2015;14:3190–3202. doi: 10.1080/15384101.2015.1055996.
17. Magwood A.C., Mundia M.M., Baker M.D. High levels of wild-type BRCA2 suppress homologous

recombination. *J. Mol. Biol.* 2012;421:38–53. doi: 10.1016/j.jmb.2012.05.007.

18. Wurster S., Hennes F., Parpys A.C., Seelbach J.I., Mansour W.Y., Zielinski A., Petersen C., Clauditz T.S., Munscher A., Friedl A.A., et al. PARP1 inhibition radiosensitizes HNSCC cells deficient in homologous recombination by disabling the DNA replication fork elongation response. *Oncotarget.* 2016;7:9732–9741. doi: 10.18632/oncotarget.6947.

19. Paffett K.S., Clikeman J.A., Palmer S., Nickoloff J.A. Overexpression of Rad51 inhibits double-strand break-induced homologous recombination but does not affect gene conversion tract lengths. *DNA Repair.* 2005;4:687–698. doi: 10.1016/j.dnarep.2005.03.003.

20. Kim P.M., Allen C., Wagener B.M., Shen Z., Nickoloff J.A. Overexpression of human RAD51 and RAD52 reduces double-strand break-induced homologous recombination in mammalian cells. *Nucleic Acids Res.* 2001;29:4352–4360. doi: 10.1093/nar/29.21.4352.

21. Yoneda T., Williams P.J., Hiraga T., Niewolna M., Nishimura R. A bone-seeking clone exhibits different biological properties from the MDA-MB-231 parental human breast cancer cells and a brain-seeking clone in vivo and in vitro. *J. Bone Miner. Res.* 2001;16:1486–1495. doi: 10.1359/jbmr.2001.16.8.1486.

22. Moynahan M.E., Cui T.Y., Jasin M. Homology-directed dna repair, mitomycin-c resistance, and chromosome stability is restored with correction of a Brca1 mutation. *Cancer Res.* 2001;61:4842–4850.

23. Min W., Bruhn C., Grigaravicius P., Zhou Z.W., Li F., Kruger A., Siddeek B., Greulich K.O., Popp O., Meisezahl C., et al. Poly(ADP-ribose) binding to Chk1 at stalled replication forks is required for S-phase checkpoint activation. *Nat. Commun.* 2013;4:2993. doi: 10.1038/ncomms3993.

24. Parpys A.C., Petermann E., Petersen C., Dikomey E., Borgmann K. DNA damage by X-rays and their impact on replication processes. *Radiother. Oncol.* 2012;102:466–471. doi: 10.1016/j.radonc.2012.01.005.

25. Toledo L., Neelsen K.J., Lukas J. Replication Catastrophe: When a Checkpoint Fails because of Exhaustion. *Mol. Cell.* 2017;66:735–749. doi: 10.1016/j.molcel.2017.05.001.

26. Tennstedt P., Fresow R., Simon R., Marx A., Terracciano L., Petersen C., Sauter G., Dikomey E., Borgmann K. RAD51 overexpression is a negative prognostic marker for colorectal adenocarcinoma. *Int. J. Cancer.* 2013;132:2118–2126. doi: 10.1002/ijc.27907.

27. Wiegman A.P., Al-Ejeh F., Chee N., Yap P.Y., Gorski J.J., Da Silva L., Bolderson E., Chenevix-Trench G., Anderson R., Simpson P.T., et al. Rad51 supports triple negative breast cancer metastasis. *Oncotarget.* 2014;5:3261–3272. doi: 10.18632/oncotarget.1923.

28. Alshareeda A.T., Negm O.H., Aleskandarany M.A., Green A.R., Nolan C., TigHhe P.J., Madhusudan S., Ellis I.O., Rakha E.A. Clinical and biological significance of RAD51 expression in breast cancer: A key DNA damage response protein. *Breast Cancer Res. Treat.* 2016;159:41–53. doi: 10.1007/s10549-016-3915-8.

29. Rodriguez A.A., Makris A., Wu M.F., Rimawi M., Froehlich A., Dave B., Hilsenbeck S.G., Chamness G.C., Lewis M.T., Dobrolecki L.E., et al. DNA repair signature is associated with anthracycline response in triple negative breast cancer patients. *Breast Cancer Res. Treat.* 2010;123:189–196. doi: 10.1007/s10549-010-0983-z.

30. Grabauskiene S., Bergeron E.J., Chen G., Chang A.C., Lin J., Thomas D.G., Giordano T.J., Beer D.G., Morgan M.A., Reddy R.M. CHK1 levels correlate with sensitization to pemetrexed by CHK1 inhibitors in non-small cell lung cancer cells. *Lung Cancer.* 2013;82:477–484. doi: 10.1016/j.lungcan.2013.09.010.

31. Albiges L., Goubar A., Scott V., Vicier C., Lefebvre C., Alsafadi S., Commo F., Saghatchian M., Lazar V., Dessen P., et al. Chk1 as a new therapeutic target in triple-negative breast cancer. *Breast.* 2014;23:250–258. doi: 10.1016/j.breast.2014.02.004.

32. Woditschka S., Evans L., Duchnowska R., Reed L.T., Palmieri D., Qian Y., Badve S., Sledge G., Jr., Gril B., Aladjem M.I., et al. DNA double-strand break repair genes and oxidative damage in brain metastasis of breast cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 2014;106 doi: 10.1093/jnci/dju145.

33. Jazayeri A., Falck J., Lukas C., Bartek J., Smith G.C., Lukas J., Jackson S.P. ATM- and cell cycle-dependent regulation of ATR in response to DNA double-strand breaks. *Nat. Cell Biol.* 2006;8:37–45. doi: 10.1038/ncb1337.

34. Zadorozhny K., Sannino V., Belan O., Mlcouskova J., Spirek M., Costanzo V., Krejci L. Fanconi-Anemia-

- Associated Mutations Destabilize RAD51 Filaments and Impair Replication Fork Protection. *Cell Rep.* 2017;21:333–340. doi: 10.1016/j.celrep.2017.09.062.
35. Llorente B., Smith C.E., Symington L.S. Break-induced replication: What is it and what is it for? *Cell Cycle.* 2008;7:859–864. doi: 10.4161/cc.7.7.5613.
36. Saleh-Gohari N., Helleday T. Conservative homologous recombination preferentially repairs DNA double-strand breaks in the S phase of the cell cycle in human cells. *Nucleic Acids Res.* 2004;32:3683–3688. doi: 10.1093/nar/gkh703.
37. Strumberg D., Pilon A.A., Smith M., Hickey R., Malkas L., Pommier Y. Conversion of topoisomerase I cleavage complexes on the leading strand of ribosomal DNA into 5'-phosphorylated DNA double-strand breaks by replication runoff. *Mol. Cell. Biol.* 2000;20:3977–3987. doi: 10.1128/MCB.20.11.3977-3987.2000.
38. Deans A.J., West S.C. DNA interstrand crosslink repair and cancer. *Nat. Rev. Cancer.* 2011;11:467–480. doi: 10.1038/nrc3088.
39. Huang J., Liu S., Bellani M.A., Thazhathveetil A.K., Ling C., de Winter J.P., Wang Y., Wang W., Seidman M.M. The DNA translocase FANCM/MHF promotes replication traverse of DNA interstrand crosslinks. *Mol. Cell.* 2013;52:434–446. doi: 10.1016/j.molcel.2013.09.021.
40. Akkari Y.M., Bateman R.L., Reifsteck C.A., Olson S.B., Grompe M. DNA replication is required To elicit cellular responses to psoralen-induced DNA interstrand cross-links. *Mol. Cell. Biol.* 2000;20:8283–8289. doi: 10.1128/MCB.20.21.8283-8289.2000.
41. Kim H., George E., Ragland R., Rafail S., Zhang R., Krepler C., Morgan M., Herlyn M., Brown E., Simpkins F. Targeting the ATR/CHK1 Axis with PARP Inhibition Results in Tumor Regression in BRCA-Mutant Ovarian Cancer Models. *Clin. Cancer Res.* 2017;23:3097–3108. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-16-2273.
42. Mijic S., Zellweger R., Chappidi N., Berti M., Jacobs K., Mutreja K., Ursich S., Ray Chaudhuri A., Nussenzweig A., Janscak P., et al. Replication fork reversal triggers fork degradation in BRCA2-defective cells. *Nat. Commun.* 2017;8:859. doi: 10.1038/s41467-017-01164-5.
43. Sorensen C.S., Hansen L.T., Dziegielewska J., Syljuasen R.G., Lundin C., Bartek J., Helleday T. The cell-cycle checkpoint kinase Chk1 is required for mammalian homologous recombination repair. *Nat. Cell Biol.* 2005;7:195–201. doi: 10.1038/ncb1212.
44. Huntoon C.J., Flatten K.S., Wahner Hendrickson A.E., Huehls A.M., Sutor S.L., Kaufmann S.H., Karnitz L.M. ATR inhibition broadly sensitizes ovarian cancer cells to chemotherapy independent of BRCA status. *Cancer Res.* 2013;73:3683–3691. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-13-0110.
45. Telli M.L., Stover D.G., Loi S., Aparicio S., Carey L.A., Domchek S.M., Newman L., Sledge G.W., Winer E.P. Homologous recombination deficiency and host anti-tumor immunity in triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* 2018;171:21–31. doi: 10.1007/s10549-018-4807-x.

VIII. Interessenkonflikt

Die Autoren erklären, dass keine Interessenkonflikte bestehen.

IX. Finanzielle Unterstützung

Diese Arbeit wird teilweise unterstützt durch (1) DFG, Förderkennzeichen BO1868/5, (2) BMBF, Fördermittel Nr. 02NUK032 und (3) 02NUK035B sowie (4) Wilhelm-Sander-Stiftung, Projekt 2017.106.1.

X. Erklärung des Eigenanteils der Publikation

In enger Zusammenarbeit mit Frau Prof. Dr. Kerstin Borgmann und Dr. Felix Meyer habe ich das dieser Dissertation zugrunde liegende Projekt inklusive der Fragestellung konzipiert. Anhand einer ausführlichen Literaturrecherche vor Beginn der experimentellen Phase formulierte ich gemeinsam mit Frau Prof. Borgmann die Arbeitshypothese. Zu meinen Aufgaben als Co-Erstautorin gehörten die Mitentwicklung der ersten experimentellen Schritte sowie die maßgebliche Durchführung der Experimente. Die Zelllinien wurden von mir in der Zellkultur betreut und regelmäßig umgesetzt. Für den Plasmidrekonstruktionsassay stellte ich die Plasmide mittels Plasmidextraktion her. Ich prüfte die Funktionsfähigkeit der Plasmide mittels Gelelektrophorese und führte den HR-Assay in allen untersuchten Zelllinien nach transienter Transfektion durch. Darüber hinaus stellte ich in einem dreimonatigen Selektionsprozess für zwei Zelllinien stabil transfizierte Klone für die Plasmide DR und DR-ori her und analysierte in allen genannten Versuchen die Zelllinien durchflusszytometrisch. Ich plante die Kolonietests mit den jeweiligen Zelllinien, züchtete die Zellen dementsprechend an und behandelte diese anschließend mit Mitomycin C. Anschließend wertete ich die Kolonien zählerisch aus. Die DNA-Foci und DNA-Fiber Assays wurden gemeinsam mit Herrn Dr. Felix Meyer durchgeführt. Die Auswertung der Ergebnisse sowie das Verfassen des Manuskriptes erfolgten in Zusammenarbeit mit Dr. Felix Meyer und Prof. Dr. Kerstin Borgmann.

XI. Danksagung

Mein größter Dank gilt Frau Prof. Dr. rer. nat. Kerstin Borgmann für Ihre unermüdliche Unterstützung, Geduld und Hilfe bei der Planung, Durchführung und beim Verfassen meiner Doktorarbeit. Während meiner Zeit im Labor hat sie mir stets mit Rat und Tat zur Seite gestanden und dieses Projekt auch darüber hinaus mit begleitet. Sie hat mir Wissenschaft und Forschung nähergebracht und mein Interesse daran maßgeblich geweckt. Ich danke Herrn Dr. rer. nat. Felix Meyer für die großartige Zeit, die gute Zusammenarbeit im Labor und dafür, dass er stets ein offenes Ohr hatte. Weiter möchte ich den hilfsbereiten Menschen aus dem Labor für Strahlenbiologie und Radioonkologie danken, u.a. Alexandra Zielinski dafür, dass sie mich so geduldig an das Arbeiten an der Werkbank herangeführt hat. Außerdem gilt mein großer Dank Britta Riepen, Dr. rer. nat. Ann-Christin Parpys und Herrn PD Dr. rer. nat. Wael Mansour, der mir Laborprotokolle und Versuche auch praktisch nähergebracht hat. Frau Prof. Dr. med. Cordula Petersen hat in mir den Forschergeist wachgehalten, dafür danke ich ihr sehr. Auch Herr Prof. Dr. med. Andreas Krüll hat diese Arbeit großzügig gefördert. Ohne Herrn Prof. Dr. rer. nat. Kai Rothkamm als Leiter des Labors für Strahlenbiologie und Radioonkologie wäre meine Arbeit ebenfalls nicht möglich gewesen, ihm danke ich für die hilfreichen Tipps und seine immer gut gelaunte Unterstützung. Abschließend möchte ich meiner Familie und meinen Freunden danken, die mich auch in anstrengenden Zeiten stets unterstützt haben und mir Mut zugesprochen haben, ohne sie wäre ich nicht dort, wo ich jetzt bin.

XII. Lebenslauf

Aus datenschutzrechtlichen Gründen wird der Lebenslauf in der elektronischen Fassung nicht veröffentlicht.

XIII. Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'Sed'.

Unterschrift: