



BRCA1 verändert die Strahlenempfindlichkeit
durch Modifikation des Tumorstammzellanteils
in MCF7 Zellen

DISSERTATION

Zur Erlangung des akademischen Grades
eines Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
des Fachbereiches Biologie
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
der Universität Hamburg

vorgelegt von:

Elena Rahlf

Hamburg, 2020

Die vorliegende Dissertation wurde zwischen Juli 2017 und Januar 2020 im Labor für Strahlenbiologie und Experimentelle Radioonkologie unter Anleitung von Prof. Dr. Kerstin Borgmann angefertigt.

Gutachter: 1. Prof. Dr. rer. nat. Kerstin Borgmann
2. Prof. Dr. rer. nat. Susanne Dobler

Tag der Disputation: 12.02.2021

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denen bedanken, die mich bei der Ausarbeitung meiner Dissertation unterstützt und begleitet haben:

Mein besonderer Dank gilt an erster Stelle Prof. Dr. Kerstin Borgmann, die mir die Möglichkeit gegeben hat, ein interessantes und spannendes Projekt während meiner Promotion in dem Labor für Strahlenbiologie und Experimentelle Radioonkologie am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf durchzuführen. Als Betreuerin und Erstgutachterin hat sie mich in den drei Jahren meiner Promotion begleitet und mir in schwierigen Phasen meiner Arbeit wertvolle Ratschläge gegeben. Außerdem war sie stets offen für anregende Diskussionen und neue Ansätze. Sie ermöglichte mir zudem die Teilnahme an nationalen und internationalen Konferenzen und Kongressen, wo ich mich mit anderen Wissenschaftlern auf dem Gebiet der Strahlenbiologie und Onkologie austauschen konnte. Dafür bin ich sehr dankbar.

Danken möchte ich zudem Prof. Dr. Kai Rothkamm, der Leitung des Labors, in dessen Institut ich meine Promotion durchführen konnte. Ich danke ihm für viele kritische und anregende Diskussionen über meine Ergebnisse und Daten.

Mein Dank gilt zudem Prof. Dr. Susanne Dobler für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Besonders bedanken möchte ich mich bei PD Dr. Helmut Pospiech, dem Kooperationspartner dieses Projekts und Projektleiter in der Arbeitsgruppe „Englert“ am Fritz-Lipmann-Institut (FLI) in Jena. Unter seiner Leitung durfte ich am FLI Experimente durchführen, die maßgeblich zum Beginn des Projekts (Etablierung der Zelllinien) beigetragen haben. Die zahlreichen und diskussionsreichen Besprechungen via Skype habe ich sehr geschätzt.

Ich danke Johannes Jungwirth für seine Unterstützung im Labor am FLI und während des gesamten Projekts. Weiterhin möchte ich mich bei allen Kollegen der Arbeitsgruppe „Englert“ für ihre Hilfe während meines Aufenthalts im Labor bedanken.

Besonderer Dank geht auch an Lena Schuckenbrock, die mich als technische Assistentin bei den Experimenten unterstützt hat und mit der ich neue Assays im Labor etabliert habe.

Ich möchte mich bei Britta Riepen und Alexandra Zielinski für ihre Unterstützung und Hilfsbereitschaft im Labor, für ihre Herzlichkeit und ihren Humor bedanken. Konstantin Hoffer danke ich für seine Hilfe im Labor und für seine lustigen Gespräche über die absurdesten Szenarien.

Ein großer Dank gilt zudem Dr. Felix Meyer, der mir mit Rat und Tat zur Seite stand und der mich zu Beginn meiner Promotion herzlich und freundlich in die Arbeitsgruppe aufgenommen hat.

Bei Dr. Ann Christin Parplys bedanke ich mich für ihre Hilfe und ihren Rat sowie für die Möglichkeit, an einem *Journal Club* für alle Doktoranden des UCCH teilzunehmen.

Außerdem gilt ein herzlicher und großer Dank Sandra Classen, deren Blockpraktikum und Masterarbeit ich betreuen durfte und die wesentlich zum Anfang und Fortschritt des Projekts beigetragen hat. Ich möchte ihr für ihre großartige Arbeit im Labor, ihren Enthusiasmus, ihren Ehrgeiz, ihre Unterstützung sowie für ihre Fröhlichkeit und Motivation danken.

Ich habe zudem die Medizinstudentin Nina Albers bei ihrer medizinischen Doktorarbeit betreut, und ich danke ihr sehr für ihren Ehrgeiz und Einsatz im Labor.

Ein besonderer und großer Dank geht an die Deutsche Forschungsgemeinschaft, deren Förderung (Nr.BO1868) die Realisierung des Projekts überhaupt erst möglich gemacht hat.

Ein besonderer und herzlicher Dank gilt schließlich meinen Eltern und meiner Familie, die mich bei jeder meiner Entscheidungen unterstützt und mir den Rücken gestärkt haben. Sie haben mich in schwierigen Phasen aufgebaut und motiviert, ohne ihre Unterstützung wäre ich nicht so weit gekommen. Ich möchte meinem Freund ein großes und herzliches Dankeschön aussprechen. Er hat mir in allen Phasen meiner Doktorarbeit immer zur Seite gestanden, mich motiviert, unterstützt und aufgebaut.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift „*BRCA1 verändert die Strahlenempfindlichkeit durch Modifikation des Tumorstammzellanteils in MCF7 Zellen*“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Ort, Datum

Elena Rahlf

Zusammenfassung und Abstract

Zusammenfassung

Das Mammakarzinom ist weltweit die häufigste Krebserkrankung von Frauen. Trotz des größtenteils guten Ansprechens auf die Therapie sind Resistenzen problematisch, deren zugrundeliegenden Mechanismen nicht vollständig verstanden sind. Die Entstehung des Mammakarzinoms ist häufig durch einen Defekt in dem DNA-Reparaturweg *Homologe Rekombination* (HR) gekennzeichnet, wie z.B. durch eine *BRCA1*-Defizienz. Eine Folge eines HR-Defekts ist genomische Instabilität mit vermehrten DNA-Schäden, die die intrazelluläre Immunantwort aktivieren. Allerdings zeigen spätere Karzinome häufig eine erhöhte *BRCA1* Expression und gesteigerte DNA-Reparaturkapazität, welches u.a. auf chemo- und radio-resistente Tumorstammzellen (CSCs) zurückgeführt wird. Für die Analyse dieses Paradoxons fehlen geeignete, isogene Zellsysteme, die das Wissen über die Auswirkungen der reduzierten Expression des HR-Proteins *BRCA1* auf das Wechselspiel von intrazellulärer Immunantwort und Tumorstammzellen erweitern würde, und daher Gegenstand der vorliegenden Arbeit waren. Dazu wurde zunächst ein isogenes Zellsystem etabliert und charakterisiert: Die MCF7 mit drei *BRCA1* Allelen wurde über CRISPR/Cas9 spezifisch in Exon 9 bzw. 14 modifiziert. Eine Modifikation wurde bei fünf Klonen in Exon 9 und bei drei Klonen in Exon 14 in einem bzw. zwei der drei Allele in der PCR und im *Bioanalyzer* bestätigt, ohne einen vollständigen *Knockout*. Die *BRCA1* Expression war stabil um max. 43 % (Klon 9.3, $p: 0,0226$) reduziert. Interessanterweise zeigten Exon 9 veränderte Klone eine gesteigerte Proliferationsrate (um bis zu 3 h); Exon 14 Klone eine teilweise verringerte Rate (um bis zu 4 h). Diese Variation war auf unterschiedliche Längen der S-Phase zurückzuführen. Eine signifikant verminderte HR-Kapazität zeigten sieben der acht *BRCA1* Klone unabhängig vom Exon, um bis zu 77 % in Klon 14.3 ($p < 0,0001$), ein Klon (Klon 14.2) zeigte eine um 33 % gesteigerte Kapazität. Die Klone mit der geringsten und höchsten HR-Kapazität wiesen eine hohe Anzahl an DNA-Schäden (Bsp. Klon 14.3 mit γ H2AX Foci: $12,26 \pm 0,79$ ($p < 0,0001$), MCF7: $3,56 \pm 0,16$) und RAD51 Foci (Bsp. Klon 14.3: $8,22 \pm 0,75$ ($p: 0,0069$), MCF7: $5,28 \pm 0,28$) nach MMC auf. Dies deutet auf einen eingeschränkten Abschluss der fehlerfreien HR hin. Dies führte in dem Klon mit der geringsten HR-Kapazität (Klon 14.3) zu vermehrten Chromatinbrücken ($62,00 \pm 2,00$ % (MCF7: $2,25 \pm 0,25$ %)) in der Mitose und zur Bildung von Mikrokernen ($23,29 \pm 10,19$ % (MCF7: $11,21 \pm 2,51$ %)) nach DNA-Schädigung. Eine reduzierte HR wurde durch Analysen des zellulären Überlebens nach DNA-schädigenden Agenzien wie MMC, PARP1-Inhibition und ionisierende Strahlung bestätigt. Eine erhöhte MMC-Sensitivität lag in allen Exon 14 Klonen und in drei der Exon 9 Klonen vor. Eine erhöhte Resistenz vgl. zur MCF7 (IC_{50} : $0,39 \mu\text{g/ml}$) wiesen zwei Exon 9 Klone auf (Klon 9.2 und Klon 9.3: IC_{50} von $0,46 \mu\text{g/ml}$). Die höchste MMC-Empfindlichkeit zeigte Klon 14.3 (IC_{50} : $0,18 \mu\text{g/ml}$), bestätigt durch das höchste Niveau endogener DNA-Schäden (γ H2AX Foci: $10,25 \pm 1,29$ ($p < 0,0001$); MCF7: $1,43 \pm 0,08$). Die Empfindlichkeit gegen PARP1-Inhibition deutete in einigen Klonen auf eine ausgeprägte HR-Defizienz hin, mit dem sensitivsten Klon 9.4 (IC_{50} : $0,40 \mu\text{M}$; MCF7, IC_{50} : $1,00 \mu\text{M}$). Andere zeigten eine erhöhte Resistenz und HR-Profizienz (Bsp. Klon 9.3, IC_{50} : $1,70 \mu\text{M}$ ($p: 0,032$)). Eine erhöhte Strahlenempfindlichkeit wurde bei allen Exon 14 und einigen Exon 9 Klonen festgestellt, mit dem sensitivsten Klon 14.3 (D_{37} : $2,0 \text{ Gy}$ ($p: 0,0335$)) vgl. zur MCF7 (D_{37} : $3,0 \text{ Gy}$). Radioresistenzen zeigten zwei Exon 9 Klone (Klon 9.2 mit D_{37} : $3,6 \text{ Gy}$ und Klon 9.5 mit D_{37} : $3,1 \text{ Gy}$). Die Daten wiesen also darauf hin, dass die *BRCA1* Veränderung S-Phase-spezifisch Exon14-abhängig zu einer Sensibilisierung führte und Exon 9-abhängig zu Resistenzen. Die reduzierte *BRCA1* Expression beeinflusste zudem die Expression von *CHK1* und *FANCD2*, die ebenfalls in die DNA-Reparatur und -Schadensantwort involviert sind: Parallel zeigten sie eine reduzierte *CHK1* Expression ($R^2=0,52$; $p: 0,0277$), weshalb *RAD51* um max. 67 % und *FANCD2* um

max. 108 % (p-Wert: 0,0012) kompensatorisch erhöht exprimiert wurden. Letzteres wurde jedoch nicht vermehrt über Monoubiquitinierung aktiviert, welches bei diesen Klonen zu den hohen DNA-Schäden führte. Dies weist zusammen mit der unterschiedlichen HR-Kapazität auf eine veränderte DNA-Schadensantwort und eine veränderte Rekrutierung von DNA-Reparaturfaktoren in der S-Phase hin. Darüber hinaus wurden zellmorphologische Veränderungen von einem epithelialen in Richtung eines mesenchymalen Phänotyps beobachtet. Dies bestätigt sich durch eine veränderte Expression von Stammzellfaktoren: ZEB1 wurde bis zu sechsfach erhöht, E-Cadherin dynamisch und ALDH1A1 leicht erhöht exprimiert. Auffallend war ein erhöhter CSC-Anteil (ALDH-positive Zellen) in Klonen mit zwei intakten *BRCA1* Allelen, erhöht um 18 % in Klon 9.2 mit der höchsten Resistenz. Ein reduzierter CSC-Anteil führte zu einer erhöhten Sensitivität in Klonen mit einem intakten Allel. Unabhängig vom CSC-Anteil war die Menge an endogener dsDNA im Cytosol reduziert, mit dem niedrigsten Niveau in Klon 14.2 mit $3496,55 \pm 121,46$ ng/ 10^6 Zellen (MCF7: $5139,46 \pm 96,11$ ng/ 10^6 Zellen). Eine erhöhte strahlungsinduzierte Akkumulation cytosolischer dsDNA wurde in allen Klonen festgestellt, wobei das höchste Level Klon 14.1 aufwies mit $7152,97 \pm 457,68$ ng/ 10^6 Zellen (MCF7: $6709,71 \pm 242,09$ ng/ 10^6 Zellen). Erste Analysen zweier *BRCA1*-Klone bezogen auf eine strahlungsinduzierte Expression immunrelevanter Gene ergaben keinen Hinweis auf eine aktivierte intrazelluläre Immunantwort. Die wichtigste Beobachtung war, dass nur im diploiden *BRCA1* Status ein erhöhter Anteil an CSCs auftrat, während im haploiden bzw. triploiden Zustand vergleichsweise weniger CSCs zu verzeichnen waren. Dies wurde in Exon 9 sowie in Exon 14 Klonen beobachtet und korrelierte am stärksten mit der Sensitivität gegenüber PARP1-Inhibition (p: 0,0023). Folglich bedingen eine *BRCA1* Überexpression und ein haploider Zustand eine erhöhte Empfindlichkeit in MCF7 aufgrund weniger CSCs. Die hohe Resistenz der CSCs könnte auf eine vermehrte Aktivierung der Kinase ATR in der S-Phase zurückzuführen sein. Diese Annahme sollte Gegenstand zukünftiger Untersuchungen sein, in denen ATR-Inhibitoren zur spezifischen Sensibilisierung resistenter Tumorstammzellen eingesetzt werden könnten.

Abstract

Breast cancer is the most common cancer in women worldwide. Despite the mostly good response to therapy, resistances are problematic and their underlying mechanisms are not fully understood. The development of breast cancer is often characterized by a defect in the DNA repair pathway homologous recombination (HR), such as a *BRCA1* deficiency. One consequence of a HR defect is genomic instability with increased DNA damage that activates the intracellular immune response. However, later carcinomas often show increased *BRCA1* expression and increased DNA repair capacity, which is attributed to chemo- and radio-resistant cancer stem cells (CSCs). For the analysis of this paradox, suitable isogenic cell systems are missing, which would increase the knowledge about the effects of the reduced expression of the HR-protein *BRCA1* on the interplay between intracellular immune response and cancer stem cells, and were therefore the subject of the present work.

First, an isogenic cell system was established and characterized: The MCF7 with three *BRCA1* alleles was modified via CRISPR/Cas9 specifically in exons 9 and 14, respectively. A modification was confirmed in five clones in exon 9 and three clones in exon 14 in one or two of the three alleles in the PCR and in the *Bioanalyzer* without a complete *knockout*. The *BRCA1* expression was stably reduced by max. 43 % (clone 9.3, $p: 0.0226$). Interestingly, exon 9 modified clones showed an increased proliferation rate (by up to 3 h), exon 14 clones showed a partially reduced rate (by up to 4 h). This variation was due to different lengths of the S phase. Seven of the eight *BRCA1* clones showed a significantly decreased HR capacity independent of the exon, up to 77 % in clone 14.3 ($p < 0.0001$), one clone (clone 14.2) showed a 33 % increased capacity. The clones with the lowest and highest HR capacity showed a high number of DNA damages (e.g. clone 14.3 with γ H2AX foci: 12.26 ± 0.79 ($p < 0.0001$), MCF7: 3.56 ± 0.16) and RAD51 foci (e.g. clone 14.3: 8.22 ± 0.75 ($p < 0.0069$), MCF7: 5.28 ± 0.28) after MMC. This indicates a limited completion of error-free HR. This led to increased chromatin bridges (62.00 ± 2.00 % (MCF7: 2.25 ± 0.25 %)) in the mitosis in clone with the lowest HR capacity (clone 14.3) and to the formation of micronuclei (23.29 ± 10.19 % (MCF7: 11.21 ± 2.51 %)) after DNA damage. A reduced HR was confirmed by analyses of cellular survival after DNA-damaging agents such as MMC, PARP1 inhibition and ionizing radiation. An increased MMC sensitivity was found in all exon 14 clones and in three of the exon 9 clones. An increased resistance compared to MCF7 (IC_{50} : $0.39 \mu\text{g/ml}$) was shown in two exon 9 clones (clone 9.2 and clone 9.3: IC_{50} of $0.46 \mu\text{g/ml}$). Clone 14.3 showed the highest MMC sensitivity (IC_{50} : $0.18 \mu\text{g/ml}$), confirmed by the highest level of endogenous DNA damage (γ H2AX foci: 10.25 ± 1.29 , $p < 0.0001$, MCF7: 1.43 ± 0.08). Sensitivity to PARP1 inhibition indicated a pronounced HR deficiency in some clones, with the most sensitive clone 9.4 (IC_{50} : $0.40 \mu\text{M}$; MCF7, IC_{50} : $1.00 \mu\text{M}$). Others showed an increased resistance and HR-proficiency (e.g. clone 9.3, IC_{50} : $1.70 \mu\text{M}$, $p: 0.032$). An increased radio sensitivity was found in all exon 14 and some exon 9 clones, with the most sensitive clone 14.3 (D_{37} : 2.0 Gy , $p: 0.0335$), compared to MCF7 (D_{37} : 3.0 Gy). Two exon 9 clones showed radio resistances (clone 9.2 with D_{37} : 3.6 Gy and clone 9.5 with D_{37} : 3.1 Gy). The data thus indicated that the *BRCA1* modification led to S phase specific sensitization dependent on exon 14 and to resistances dependent on exon 9. The reduced *BRCA1* expression also influenced the expression of *CHK1* and *FANCD2* which are also involved in DNA repair and damage response: In parallel, they showed a reduced *CHK1* expression ($R^2=0.52$, $p: 0.0277$), which is why *RAD51* was expressed increased by max. 67 % and *FANCD2* by max. 108 % ($p: 0.0012$) compensatory. However, the latter was not activated increased via monoubiquitination, which led to the high DNA damage in these clones. This, together with the different HR capacity, indicates an altered DNA damage response and an altered recruitment of DNA repair factors in the S phase. Furthermore, cell morphological changes from an epithelial to a mesenchymal phenotype were observed. This is confirmed by an altered expression of

stem cell factors: ZEB1 was increased up to sixfold, E-cadherin dynamic and ALDH1A1 slightly increased. Noticeable was an increased proportion of CSCs (ALDH-positive cells) in clones with two intact *BRCA1* alleles, increased by 18 % in clone 9.2 with the highest resistance. A reduced CSC content resulted in increased sensitivity in clones with one intact allele. Regardless of the CSC content, the amount of endogenous dsDNA in the cytosol was reduced, with the lowest level in clone 14.2 with 3496.55 ± 121.46 ng/ 10^6 cells (MCF7: 5139.46 ± 96.11 ng/ 10^6 cells). An increased radiation-induced accumulation of cytosolic dsDNA was observed in all clones with the highest level in clone 14.1 with 7152.97 ± 457.68 ng/ 10^6 cells (MCF7: 6709.71 ± 242.09 ng/ 10^6 cells). First analyses of two *BRCA1* clones related to a radiation-induced expression of immune-relevant genes did not indicate an activated intracellular immune response.

The most important observation was that only in the diploid *BRCA1* status an increased proportion of CSCs occurred, whereas in the haploid or triploid state comparatively less CSCs were observed. This was observed in both exon 9 as well as exon 14 clones and correlated most strongly with the sensitivity to PARP1 inhibition (p: 0.0023). Consequently, *BRCA1* overexpression and a haploid state cause an increased sensitivity in MCF7 due to fewer CSCs. The high resistance of CSCs might be due to an increased activation of the kinase ATR in the S phase. This assumption should be the subject of future studies in which ATR inhibitors could be used to specifically sensitize resistant cancer stem cells.

Inhaltsverzeichnis

Gutachter III

Danksagung. IV

Eidesstattliche Erklärung VI

Zusammenfassung und Abstract. VII

 Zusammenfassung. VII

 Abstract IX

Inhaltsverzeichnis XI

1 Einleitung 1

 1.1 Das Mammakarzinom 1

 1.1.1 Klassifizierung des Mammakarzinoms in Subtypen und Prognose 1

 1.1.2 Entstehung des Mammakarzinoms 4

 1.2 Bedeutung der Homologen Rekombination für die Entstehung und Therapieantwort des Mammakarzinoms. 4

 1.2.1 Die Homologe Rekombination (HR) und BRCA1 in der DNA-Reparatur 5

 1.2.2 Die Homologe Rekombination und BRCA1 in der replikationsassoziierten Reparatur 8

 1.2.3 Der FA/HR Signalweg in der Reparatur von replikationsassoziierten DNA-Schäden 8

 1.2.4 Die Funktion von BRCA1 im Zellzyklus 9

 1.3 Das Brustkrebsgen *BRCA1* 9

 1.3.1 Das *BRCA1* Gen und Aufbau des BRCA1-Proteins 9

 1.3.2 Folgen einer *BRCA1*-Mutation für die Entstehung des Mammakarzinoms 10

 1.3.3 Hohe Mutationsraten in Regionen des *BRCA1* Gens 11

 1.3.4 Therapie-Optionen für Patientinnen mit *BRCA1*-Mutation bzw. HR-Defekt 12

 1.4 Folgen einer HR-Defizienz für die adaptive und intrazelluläre Immunantwort 13

1.4.1	Folgen einer HR-Defizienz für die adaptive Immunantwort	13
1.4.2	Folgen einer HR-Defizienz für die intrazelluläre Immunantwort	14
1.5	Bedeutung der HR für die Therapieresistenz von Tumorstammzellen	15
1.5.1	Problematik von Therapieresistenzen	15
1.5.2	Eigenschaften der Tumorstammzellen	16
1.5.3	Hochregulierte DNA-Reparatur als Resistenzmechanismus in Tumorstammzellen	18
1.5.4	Funktion von BRCA1 in normalen und malignen Stammzellen	19
1.6	Zielsetzung der Arbeit	19
2	Material und Methoden	20
2.1	Material	20
2.1.1	Zelllinien.	20
2.1.2	Plasmide.	21
2.1.3	<i>single guide</i> RNAs	21
2.1.4	Primer	21
2.1.5	Antikörper	22
2.1.6	Chemikalien.	24
2.1.7	Puffer und Lösungen	26
2.1.8	Enzyme	30
2.1.9	Bakterienstämme	30
2.1.10	Kits	30
2.1.11	Verbrauchsmaterialien	34
2.1.12	Geräte	36
2.1.13	Software.	38
2.2	Methoden	39
2.2.1	Generierung von MCF7 Zellen mit CRISPR/Cas9-veränderten <i>BRCA1</i> Allelen	39

2.2.2	Analyse der Proteinexpression in den MCF7-Klonen	46
2.2.3	Bestimmung der Proliferationsrate	49
2.2.4	Analyse des Zellzyklus.	49
2.2.5	Bestimmung der relativen HR-Kapazität im Plasmid-Rekonstruktionsassay	50
2.2.6	Erzeugung von DNA-Schäden	51
2.2.7	Analyse des zellulären Überlebens im Koloniebildungstest	52
2.2.8	Nachweis von RAD51 Foci und γ H2AX Foci in der Immunfluoreszenz . . .	53
2.2.9	Nachweis von Mikrokernen über Giemsa-Färbung	54
2.2.10	Der <i>ALDEFLUOR</i> TM -Assay	55
2.2.11	Immuncytochemischer Nachweis der cytosolischen dsDNA.	56
2.2.12	Nachweis der cytosolischen dsDNA im <i>Quant-iT</i> TM <i>PicoGreen</i> TM <i>dsDNA Assay</i>	57
2.2.13	Analyse der mRNA Expression von immunrelevanten Genen	59
2.2.14	Statistische Auswertung	62
3	Ergebnisse	63
3.1	Etablierung eines isogenen Zellsystems	63
3.1.1	Gezielte Veränderung des <i>BRCA1</i> Gens in Exon 9 und Exon 14	63
3.1.2	Untersuchung der veränderten <i>BRCA1</i> Allele in der PCR.	65
3.1.3	Untersuchung der veränderten <i>BRCA1</i> Allele im <i>Bioanalyzer</i>	66
3.2	Charakterisierung der <i>BRCA1</i> -Klone	68
3.2.1	Expression von <i>BRCA1</i> und von in der DNA-Reparatur relevanten Proteinen.	68
3.2.2	Endogene DNA-Schäden in den <i>BRCA1</i> -Klonen	70
3.2.3	Proliferation und Zellzyklusverteilung in den <i>BRCA1</i> -Klonen	73
3.3	Auswirkungen auf die Homologe Rekombination	75
3.3.1	Relative HR-Kapazität in den <i>BRCA1</i> -Klonen	75

3.3.2	RAD51 Foci-Bildung nach MMC-Schädigung	76
3.3.3	Exogene DNA-Schäden durch MMC.	78
3.3.4	Überleben nach MMC.	79
3.3.5	Überleben nach PARP1-Inhibition mit Olaparib	81
3.3.6	Überleben nach ionisierender Strahlung	83
3.4	Tumorstammzeleigenschaften.	86
3.4.1	Zellmorphologie der BRCA1-Klone	86
3.4.2	Expression von EMT- und Tumorstammzell-Markern in den BRCA1-Klonen	87
3.4.3	Aktivität des Tumorstammzellmarkers ALDH1	88
3.5	Einfluss auf die intrazelluläre Immunantwort	90
3.5.1	Mögliche strahlungsinduzierte Akkumulation von cytosolischer dsDNA in den BRCA1-Klonen	90
3.5.2	Expression immunrelevanter Gene nach Bestrahlung in zwei BRCA1-Klonen.	91
3.5.3	Veränderte Level cytosolischer dsDNA und strahlungsinduzierte Akkumulation in BRCA1-Klonen	93
3.6	Abschließende Zusammenfassung	96
4	Diskussion	98
4.1	Notwendigkeit der Entwicklung eines isogenen Zellsystems zur Untersuchung einer reduzierten HR	99
4.1.1	Ansatz für die Etablierung eines isogenen Zellsystems.	99
4.1.2	Nachteile bisher verfügbarer Systeme	99
4.1.3	Notwendigkeit eines neuen Zellsystems	100
4.2	Isogenes MCF7 Zellsystem mit gezielt veränderter und stabil reduzierter BRCA1 Expression	100
4.2.1	Etablierung eines isogenen Zellsystems	100

4.2.2	BRCA1 Reduktion verändert Expression HR-relevanter Proteine in MCF7 Zellen	101
4.2.2.1	Reduzierte BRCA1 Expression in MCF7-Klonen	101
4.2.2.2	Erhöhte FANCD2 Expression und verringerte CHK1 Expression	102
4.2.2.3	Kompensatorisch erhöhte RAD51 Expression.	102
4.2.3	Reduzierte endogene DNA-Schäden nach reduzierter BRCA1 Expression	103
4.2.3.1	Endogen reduzierte Aktivierung von FANCD2	103
4.2.3.2	Exon-abhängig reduzierte endogene DNA-Schäden (γ H2AX Foci)	104
4.2.3.3	Reduzierte Bildung spontaner RAD51 Foci	105
4.2.3.4	Endogener Stress anhand vermehrter Chromatinbrücken und Mikrokerne	105
4.2.4	Exon-abhängig veränderte Proliferationsrate und Exon-unabhängig veränderte Zellzyklusverteilung	107
4.2.4.1	Exon-abhängig erhöhte bzw. verringerte Proliferationsrate	107
4.2.4.2	Verkürzte S-Phase in den BRCA1-Klonen	108
4.3	BRCA1 Reduktion beeinflusst speziell die DSB-Reparatur der Homologen Rekombination in MCF7	109
4.3.1	Reduzierte DSB-Reparatur in den BRCA1-Klonen	109
4.3.2	Exon-abhängige Reparatur residueller DNA-Schäden nach MMC	110
4.3.2.1	Eingeschränkte RAD51 Rekrutierung nach exogenen DNA-Schäden	110
4.3.2.2	Residuelle DNA-Doppelstrangbrüche nach MMC	110
4.3.2.3	Auflösung residueller RAD51 Foci	111
4.3.2.4	Erhöhtes Auftreten von Chromatinbrücken und Mikrokernen nach exogener Schädigung.	112
4.3.3	Exon- und Allel-Abhängigkeit der Sensitivität gegenüber DNA-schädigenden Agenzien	112

4.3.3.1	Exon- und Allel-abhängige MMC-Sensitivität	112
4.3.3.2	Exon-unabhängige und Allel-abhängige Olaparib-Sensitivität	114
4.3.3.3	Exon- und Allel-abhängige Strahlenempfindlichkeit	115
4.3.4	Eigenschaften des resistentesten und sensitivsten BRCA1-Klons	117
4.3.4.1	Charakteristika des resistentesten Klon 9.2	117
4.3.4.2	Charakteristika des sensitivsten Klon 14.3	117
4.4	Tumorstammzellanteil bestimmt Resistenz in BRCA1 reduzierten MCF7-Klonen	118
4.4.1	Dynamischer EMT-Status in BRCA1-Klonen	119
4.4.2	Erhöhte ALDH-Aktivität in resistenten BRCA1-Klonen	120
4.5	Endogen reduzierte Level cytosolischer dsDNA und keine Aktivierung der intrazellulären Immunantwort trotz strahlungsinduzierter Akkumulation	122
4.5.1	Hinweis auf eine strahlungsinduzierte Akkumulation cytosolischer dsDNA, ohne Aktivierung der Expression immunrelevanter Gene in zwei BRCA1-Klonen	123
4.5.2	Reduzierte endogene Level cytosolischer dsDNA und Akkumulation nach Bestrahlung	124
4.6	Zusammenfassung und Modell	125
4.6.1	Zusammenfassung	125
4.6.2	Modell	127
4.7	Konklusion und Ausblick	128
4.7.1	Konklusion	128
4.7.2	Ausblick	128
	Abkürzungsverzeichnis	VIII
	Abbildungsverzeichnis	XV
	Tabellenverzeichnis	XVII
	Literaturverzeichnis	XX
	Anhang	XLIV

1 Einleitung

Krebs ist weltweit eine der häufigsten tödlichen Krankheiten. Die WHO registrierte im Jahr 2018 weltweit 18,1 Millionen Neuerkrankungen und 9,6 Millionen krebsbedingte Todesfälle [1]. Die drei häufigsten Entitäten sind Lungenkrebs, Darmkrebs und Brustkrebs, die ein Drittel aller Krebsfälle ausmachen und für die weltweit hohe Mortalitätsrate verantwortlich sind [1]. Krebs bezeichnet eine Tumorerkrankung und ist hauptsächlich durch ein unkontrolliertes Wachstum charakterisiert, welches durch besondere Merkmale (der sog. *Hallmarks of Cancer* [2, 3]) verursacht wird, wie beispielsweise *Genomische Instabilität*, *unbegrenzt Replikationspotenzial* und *Umgehung der Immunreaktion*.

Brustkrebs, das sog. *Mammakarzinom*, ist die häufigste Krebserkrankung der Frau [1] und wird aufgrund seiner hohen Heterogenität in Subtypen unterteilt [4]. Der Subtyp bestimmt die Überlebenswahrscheinlichkeit und Prognose der Patientinnen. Trotz zahlreicher therapeutischer Ansätze zur Behandlung des Mammakarzinoms sind auftretende Resistenzen problematisch. Dementsprechend besteht die Notwendigkeit, die Therapie zu verbessern und die Überlebenswahrscheinlichkeit für alle Patientinnen, unabhängig vom Subtyp, zu erhöhen. Um dies zu erreichen, ist es jedoch unerlässlich, die zugrundeliegenden Mechanismen zu identifizieren, die einen neuen Tumor initiieren und Resistenzen verursachen.

1.1 Das Mammakarzinom

Das Mammakarzinom bezeichnet die Entartung der Brustdrüse. Im Jahr 2018 wurden etwa 72.000 neue Fälle diagnostiziert und etwa 19.000 Todesfälle in Deutschland von der WHO registriert [1]. Insgesamt erkrankt jede achte Frau im Laufe ihres Lebens an Brustkrebs [5]. Der Anteil junger Frauen (unter 55 Jahre) liegt bei fast einem Drittel (drei von zehn Frauen) [5].

1.1.1 Klassifizierung des Mammakarzinoms in Subtypen und Prognose

Das Mammakarzinom umfasst eine Gruppe heterogener Karzinome und wird daher auf Grundlage molekularer Eigenschaften in Subtypen eingeteilt, wobei hauptsächlich vier Typen unterschieden werden: *Luminal A*, *Luminal B*, *HER2* (engl. *human epidermal growth factor receptor 2*)-positive und *triple negative* Mammakarzinome (*TNBC*, engl. *triple negative breast cancer*), siehe Abb. 1.1 [4, 6, 7].

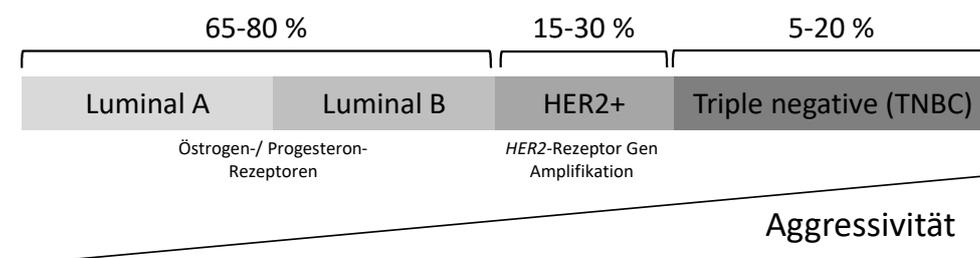


Abbildung 1.1: Subtypen des Mammakarzinoms mit deren Häufigkeit und Aggressivität [Quellen im Text]. Luminal A und B sind durch Östrogen- und/oder Progesteron-Rezeptoren gekennzeichnet und tragen zu 65 bis 80 % der Mammakarzinome bei. Dagegen weisen 15 bis 30 % eine Amplifikation des *HER2* Gens auf (*HER2+*

Karzinome). Die triple negativen Mammakarzinome (TNBC) umfassen 5 bis 20 % und besitzen weder Hormonrezeptoren noch eine Amplifikation des *HER2* Gens. Die Aggressivität nimmt dargestellt von rechts nach links ab, wobei die TNBC die höchste Aggressivität aufweisen, Luminal A Tumore die niedrigste.

Je nach vorliegendem Subtyp gibt es erhebliche Unterschiede im Ansprechen auf die Therapie und in der Überlebensrate der Patientinnen. Ein großer Teil der Mammakarzinome (65 bis 80 %) gehört zu den Subtypen Luminal A und Luminal B [8, 9]. Diese weisen Hormonrezeptoren (Östrogen- und/oder Progesteron-Rezeptoren) und eine unterschiedliche Proliferationsrate auf [10, 11]. Die beste Prognose haben Patientinnen mit Luminal A Karzinomen [12] aufgrund eines langsam proliferierenden Tumors [11]. Eine minimal schlechtere Prognose weisen Patientinnen mit Luminal B Tumoren [12] aufgrund eines schnell proliferierenden Tumors auf [10, 11]. Fast ein Drittel (15 bis 30 %) der Mammakarzinome gehören zu den *HER2*-positiven Tumoren, die eine Amplifikation oder Überexpression des Wachstumsrezeptors *HER2* aufweisen, aber keine Hormonrezeptoren exprimieren [13]. Der kleinste Anteil der Mammakarzinome (5 bis 20 %) umfasst die triple negativen Karzinome [14, 15]. Diese besitzen weder Östrogen- und Progesteron-Rezeptoren, noch sind sie durch eine Amplifikation des *HER2* Gens charakterisiert [16]. Dieser Subtyp ist durch eine hohe Aggressivität gekennzeichnet, wobei Karzinome des Subtyps Luminal A die niedrigste Aggressivität besitzen (siehe Abb. 1.1) [17].

Die Standardtherapie für Patientinnen mit Mammakarzinom umfasst lokale Behandlungen, wie Operation und Bestrahlung, und anschließende systemische Therapien, wie adjuvante Chemotherapien. Bei einigen Subtypen können zielgerichtete Therapien eingesetzt werden [18, 19]. Aufgrund der unterschiedlichen therapeutischen Möglichkeiten und der Aggressivität der Tumore variiert die Überlebenswahrscheinlichkeit je nach Subtyp erheblich, wie in Abb. 1.2 mithilfe des Schätzungsverfahrens nach Kaplan-Meier dargestellt [12].

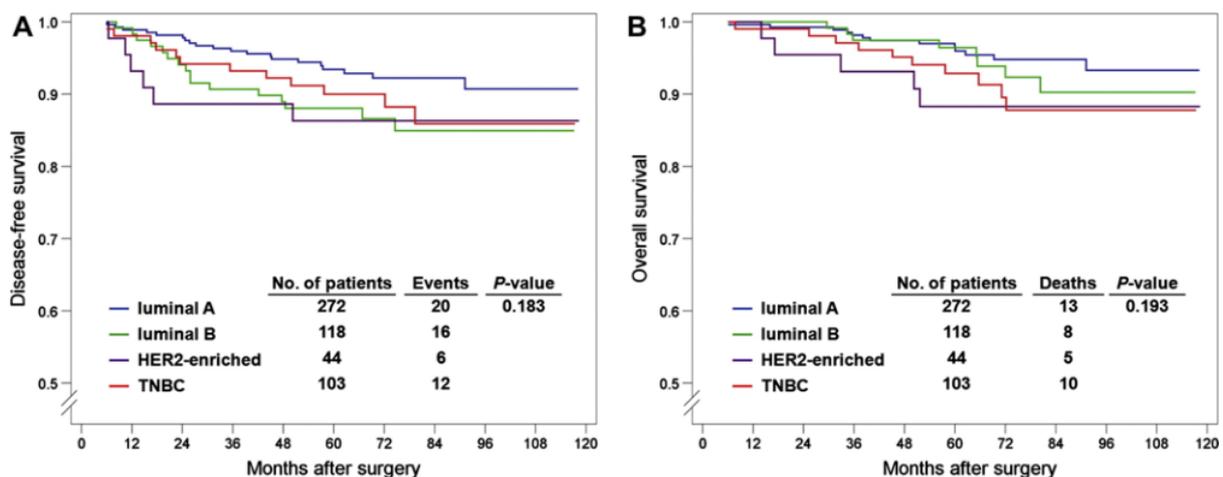


Abbildung 1.2: Kaplan-Meier-Überlebenskurven der Patientinnen mit verschiedenen Subtypen des Mammakarzinoms [12]. In (A) ist das Erkrankungs-freie Überleben (**Disease-free survival**) und in (B) das Gesamtüberleben (**Overall survival**) gegen die Monate nach der Operation (**Months after surgery**) aufgetragen. Die Subtypen Luminal A, Luminal B, *HER2-enriched* (HER2-positiv) und TNBC sind farblich gekennzeichnet.

Die höchste Überlebenswahrscheinlichkeit (*Erkrankungs-freies Überleben*, Abb. 1.2 (A) und *Gesamtüberleben*, Abb. 1.2 (B)) haben Patientinnen mit Luminal A Tumoren, gefolgt von Patientinnen mit Luminal B und *HER2*-positiven Tumoren [12]. Die höchste Mortalitätsrate wird dagegen für Patientinnen mit TNBC Mammakarzinom geschätzt (Abb. 1.2 (A) und (B)) [12]. Die hohe Überlebenswahrscheinlichkeit von Patientinnen mit Luminal A Tumoren beruht u.a. auf einem guten Ansprechen auf eine Radiotherapie, welche durch eine hohe Strahlenempfindlichkeit dieser Tumore bedingt ist [20, 21]. Trotzdem profitiert auch ein gewisser Prozentsatz dieser Patientinnen nicht von der Therapie und entwickelt ein Rezidiv [22]. Dabei ist insbesondere eine Veränderung des Subtyps des Ursprungstumors (Luminal A) zu einem Rezidiv mit Subtyp TNBC problematisch [22], welches in Abb. 1.3 anhand von Kaplan-Meier-Kurven dargestellt ist [22].

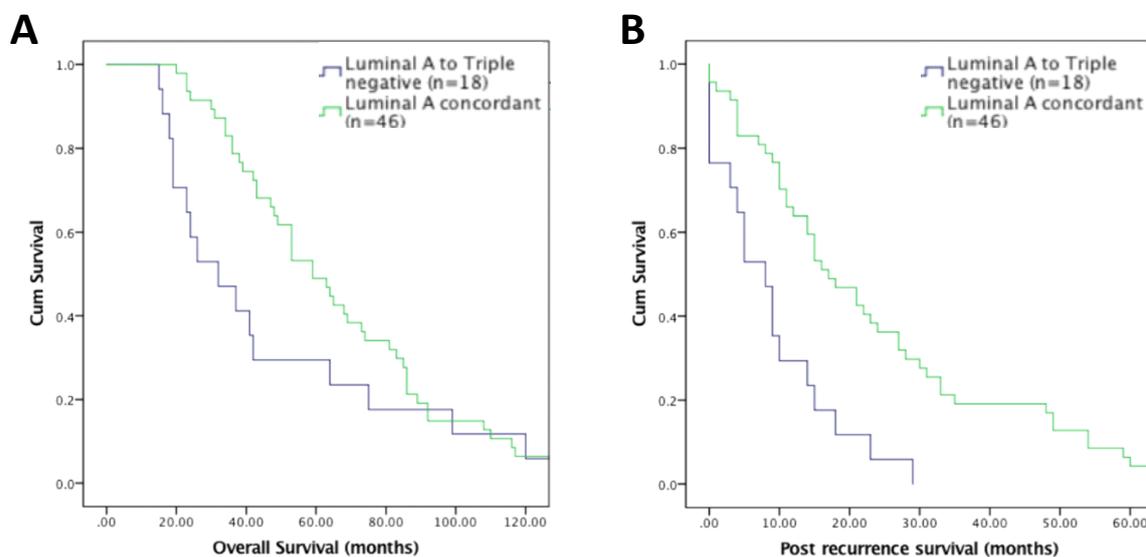


Abbildung 1.3: Kaplan-Meier-Überlebenskurven von Patientinnen mit einem Rezidiv (verändert von Luminal A zu TNBC) im Vergleich zu Patientinnen mit unverändertem Luminal A-Rezidiv [22]. In (A) ist das kumulative Überleben (**Cum Survival**) gegen das Gesamtüberleben in Monaten (**Overall Survival (months)**) aufgetragen und in (B) das kumulative Überleben (**Cum Survival**) gegen das Überleben nach Rezidiv in Monaten (**Post recurrence survival (months)**). Die Kurve „Luminal A to Triple negative“ ist in blau, der unveränderte Subtyp Luminal A („Luminal A concordant“) in grün gekennzeichnet.

Die Überlebenswahrscheinlichkeit (*Gesamtüberleben* in Abb. 1.3 (A) und *Überleben nach Ausbildung eines Rezidivs* in Abb. 1.3 (B)) reduziert sich drastisch für Patientinnen mit einem Rezidiv des TNBC Subtyps [22].

Daher besteht die Notwendigkeit bei allen Patientinnen mit Mammakarzinom, einschließlich derjenigen mit gut behandelbarem Subtyp Luminal A, das Überleben durch eine verbesserte Therapie zu erhöhen. Es ist daher wichtig, grundlegende Mechanismen zu identifizieren, die zur Resistenz beitragen und die Überlebenswahrscheinlichkeit beeinflussen. Danach sind zunächst die Entstehung des Mammakarzinoms und die genetischen Unterschiede zu betrachten.

1.1.2 Entstehung des Mammakarzinoms

Eine erbliche Ursache liegt bei etwa 10 % aller Mammakarzinome vor, wobei ein großer Teil davon auf Mutationen in den Genen *BRCA1* (engl. *breast cancer gene 1*) und *BRCA2* (engl. *breast cancer gene 2*) beruht [23]. Eine Keimbahnmutation in *BRCA1* oder *BRCA2* wird bei 3 bis 5 % aller Patientinnen als Hauptursache für die Entstehung eines Mammakarzinoms identifiziert [24]. Häufig werden diese mit der Entwicklung eines triple negativen Mammakarzinoms assoziiert: Etwa 70 bis 90 % der *BRCA1*- und 16 bis 23 % der *BRCA2*-Mutationsträgerinnen entwickeln ein TNBC [25], wobei die Daten je nach Studienkohorte variieren [26]. Aufgrund der häufigen Assoziation eines BRCA Status mit der Entwicklung eines TNBC Karzinoms wurde in früheren Studien angenommen, dass alle *BRCA1*-Mutationsträgerinnen an einem TNBC Mammakarzinom erkranken [27]. Diese Annahme wurde jedoch in einer Studie von Mavaddat et al., 2012 widerlegt, in der nicht nur ein Hormonrezeptor-negativer Subtyp (78 %) bei *BRCA1*-Mutationsträgerinnen gefunden wurde, sondern in geringem Umfang (12 %) auch die Subtypen Luminal A und B beobachtet wurden [28]. Weiterhin konnte bei der Betrachtung aller TNBC Mammakarzinome nur ein Anteil von 14 bis 20 % auf eine Keimbahnmutation in *BRCA1* oder *BRCA2* zurückgeführt werden [29, 30]. Von allen Luminal A Mammakarzinomen wurden 9 % durch eine Keimbahnmutation in *BRCA1* und 35 % durch eine Keimbahnmutation in *BRCA2* hervorgerufen [31].

Ein gemeinsames Merkmal von Mammakarzinomen ist ein allgemeiner Defekt in der Homologen Rekombination (HR), der neben Mutationen in *BRCA1* oder *BRCA2* auch durch Mutationen bzw. epigenetischen Veränderungen weiterer involvierter Gene verursacht werden kann [30, 29, 32, 33]. Zudem kann neben einer Mutation auch eine Methylierung des *BRCA1*-Promoters auftreten, welche in über 30 % der TNBC Mammakarzinome vorliegt [34]. Eine vorliegende HR-Defizienz kann unabhängig von einer *BRCA1*- oder *BRCA2*-Mutation über den sog. *HRD Assay* (engl. *homologous recombination deficiency*) [35] identifiziert werden, in welchem der Grad an genomischer Instabilität über verschiedene Merkmale erfasst wird [36, 37, 38].

Dementsprechend ist ein Defekt in der Homologen Rekombination ein Kennzeichen der Mammakarzinome und schließt den Subtyp Luminal A ein. Eine Mutation von *BRCA1* kann dabei in allen Subtypen auftreten und ist möglicherweise für die Aggressivität und Resistenzbildung von entscheidender Rolle. Die Bedeutung einer eingeschränkten und defekten HR mit dem Schwerpunkt auf Mutationen in *BRCA1* für die Entstehung des Mammakarzinoms und für das Therapieansprechen wird daher im Folgenden beschrieben.

1.2 Bedeutung der Homologen Rekombination für die Entstehung und Therapieantwort des Mammakarzinoms

Das häufige Auftreten einer *BRCA1*-Mutation beim Mammakarzinom (wie bereits in Abschnitt 1.1.2 erwähnt) verdeutlicht die wesentliche Funktion von *BRCA1* bei der Entstehung des Mammakarzinoms. Die Funktion von *BRCA1* im DNA-Reparaturweg der Homologen

Rekombination ist von großer Bedeutung für die Aufrechterhaltung der genomischen Integrität, um die Initiierung der Tumorgenese zu verhindern. Die Folgen eines *BRCA1*-Defekts beeinflussen nicht nur die Tumorgenese, sondern auch das Ansprechen auf eine nachfolgende Radio- und Chemotherapie. Die Homologe Rekombination und die Funktion von *BRCA1* in dieser werden daher im nächsten Abschnitt beschrieben.

1.2.1 Die Homologe Rekombination (HR) und *BRCA1* in der DNA-Reparatur

Die fehlerfreie Reparatur von DNA-Schäden ist für das Überleben und für die genomische Integrität eukaryotischer Zellen von entscheidender Bedeutung. DNA-Schäden können von inneren Faktoren wie dem Zellmetabolismus abhängig sein (*endogene DNA-Schäden*) oder auf äußere Einflüsse (*exogene DNA-Schäden*) zurückzuführen sein. Ein endogener DNA-Schaden kann während der Replikation auftreten und diese einschränken, z.B. durch Kollision der Replikationsgabel mit Einzelstrangbrüchen der DNA oder anderen Läsionen [39]. Im Gegensatz dazu führt ein exogener Schaden zu einer physikalischen oder chemischen Veränderung der DNA [40]. Dies geschieht z.B. durch ionisierende Strahlung [41] oder durch Chemotherapeutika [42].

Eine schwerwiegende Form der Schädigung stellt der DNA-Doppelstrangbruch (DSB, engl. *DNA double-strand break*) dar. Der DSB ist potenziell letal und kann zu Mutationen, Deletionen, Amplifikationen oder Translokationen führen, wenn er nicht oder nur unzureichend repariert wird [43]. Die Akkumulation dieser chromosomalen Veränderungen fördert die genomische Instabilität, die zur Seneszenz, Apoptose oder zur Entartung der Zelle führen kann, was der initiale Schritt in der Tumorentstehung ist [44].

Um genomische Instabilität zu vermeiden, ist die DNA-Schadensantwort (DDR, engl. *DNA damage response*) daher für die sofortige und effektive Reparatur von DNA-Schäden unerlässlich. In der DDR wird die Erkennung der DNA-Schäden, die induzierte Signalkaskade und die nachfolgende DNA-Reparatur zusammengefasst. Eine zentrale Rolle bei der Koordination der DDR spielen die zur Familie der Phosphoinositid-3-Kinasen (PI3K) gehörenden Serin/Theronin-Kinasen ATM (engl. *ataxia-telangiectasia mutated*) und ATR (engl. *ATM- and Rad3-related*) [45]. Diese Kinasen werden nach DNA-Schädigung aktiviert und zum Chromatin rekrutiert, wo sie weitere Faktoren der DDR aktivieren und auf diese Weise die DNA-Reparatur und den Zellzyklus-Arrest regulieren [46, 47].

ATM muss als inaktives Homodimer zunächst durch Autophosphorylierung zu aktiven Monomeren verändert werden [48]. ATR hingegen liegt als stabiler heterodimerer Komplex mit ATRIP (engl. *ATR interacting protein*) vor [49]. ATR und ATM aktivieren eine große Anzahl ihrer Zielproteine durch Phosphorylierung einer konservierten Aminosäure-Sequenz aus Serin/Theronin und Glutamin, dem sog. *SQ/TQ-Motif*, und können sich daher in ihren Funktionen kompensieren [50]. Trotz dieser Redundanz liegt ein wesentlicher Unterschied in den DNA-Schäden, welche zu der Aktivierung der Kinasen führen: Während ATM überwiegend nach strahlungsinduzierten DSBs aktiviert wird und in allen Zellzyklusphasen zur Verfügung steht [51], wird ATR vorwiegend nach Schädigung in der S-Phase während der Replikation aktiviert [52]. Zudem kommt es zum Wechsel der Kinasen am DSB, da nach Erkennung durch ATM dieser resiziert wird und dadurch ssDNA entsteht, welche über RPA (engl. *replication*

protein A) gebunden und durch ATR erkannt wird [51, 52].

In der Signalkaskade von ATM und ATR werden die jeweiligen *Downstream* Kinasen CHK1 (engl. *checkpoint kinase 1*) [53] und CHK2 (engl. *checkpoint kinase 2*) [54] aktiviert und rekrutieren weitere Faktoren in den Bereich des DSBs [55]. ATM phosphoryliert auch und aktiviert direkt andere Faktoren, die an der DNA-Reparatur beteiligt sind wie z.B. FANCD2 (engl. *fanconi anaemia group D2 protein*) [56], H2AX (engl. *H2A histone family member X*) [57] und BRCA1 [58].

Eine zentrale Rolle spielt die Phosphorylierung von der Histonvariante H2AX durch ATM, die die DNA-Reparatur einleitet. ATM phosphoryliert H2AX an Serin 139 zu H2AX^{S139p} (γ H2AX) [57], woraufhin weitere ATM-Moleküle rekrutiert werden und weitere Proteine der DNA-Reparatur akkumulieren [59, 60]. Nach Initiierung der DNA-Schadensantwort kann die Reparatur in der Zelle über wichtige DNA-Doppelstrang-Reparaturwege ablaufen: Über das *Non-Homologous Endjoining (NHEJ)*, über die *Homologe Rekombination (HR)* oder über das *Single-Strand Annealing (SSA)* [61]. Welcher der Reparaturwege initiiert wird, hängt von der Phase des Zellzyklus ab. In allen Phasen des Zellzyklus, vorzugsweise aber in der G1- und G2-Phase, kann die Reparatur über das NHEJ initiiert werden [62], während in der S- und G2-Phase die HR zur Verfügung steht [63]. Das SSA ist ein Reparaturmechanismus, der eingesetzt wird, wenn weder die HR, noch das NHEJ verfügbar sind [64]. Im Gegensatz zur HR zeichnen sich das NHEJ und das SSA jedoch durch eine hohe Fehleranfälligkeit aus [65]. Daher ist eine funktionsfähige HR für eine fehlerfreie Reparatur essenziell [65]. Der Ablauf der DNA-Reparatur über die HR lässt sich in drei Schritte unterteilen: Die Erkennung des DSBs, die Modifizierung des DSBs und die Rekrutierung von RAD51 (engl. *radiation 51*), dargestellt in Abb. 1.4 [55].

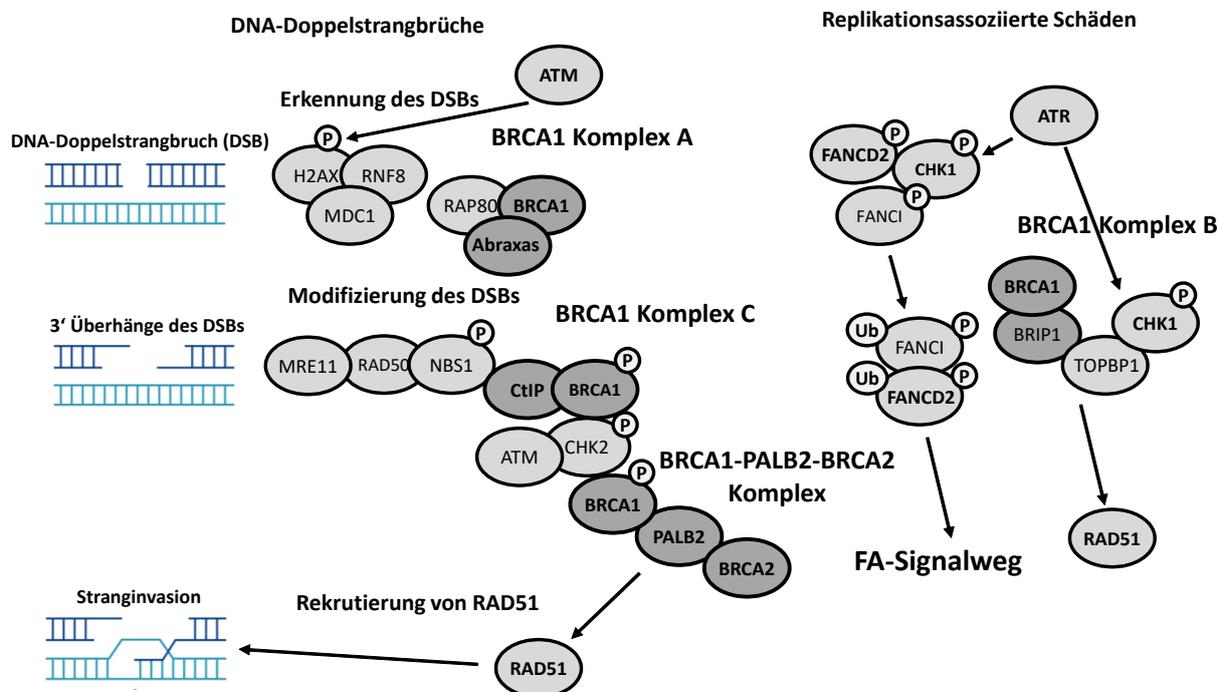


Abbildung 1.4: Schritte der Homologen Rekombination und involvierte BRCA1 Makrokomplexe und Überlappungen mit dem FA-Signalweg [modifiziert nach 55]. In die Erkennung des DSB (engl. *DNA double-strand break*) ist der *BRCA1 Komplex A* aus RAP80, Abraxas und BRCA1 involviert. Die Initiierung der Resektion des DSBs

erfolgt über *BRCA1 Komplex C* aus CtIP und BRCA1. Die Rekrutierung von RAD51 zum DSB erfolgt über den Komplex aus BRCA1, PALB2 und BRCA2. Der *BRCA1 Komplex B* besteht aus BRCA1, BRIP1 und TOPBP1 und ist essenziell für die DNA-Reparatur während der Replikation. Zudem können nach replikationsassoziierten Schäden über ATR und CHK1 die Proteine FANCI und FANCD2 phosphoryliert werden, was eine Monoubiquitinierung (Ub) dieses Komplexes initiiert und die Reparatur über den FA-Signalweg einleitet.

Der DSB wird zunächst durch den *BRCA1 Komplex A* aus BRCA1, Abraxas und RAP80 (engl. *receptor-associated protein 80*) erkannt, der mit ubiquitinierten Histonen in der Nähe des DSBs assoziiert [66, 59]. Die Assoziation des *BRCA1 Komplex A* hängt vom ATM-phosphoryliertem H2AX (γ H2AX) ab. Das Mediatorprotein MDC1 (engl. *mediator of DNA damage checkpoint protein 1*) kann über die BRCT-Domäne direkt an γ H2AX binden [67] und mit RNF8 (engl. *RING finger protein 8*) einen Komplex bilden [68]. In diesem Komplex interagiert MDC1 mit ATM über die FHA-Domäne [69]. Auf diese Weise kann ATM das Chromatin um den DSB erkennen und weitere Nukleosome mit H2AX-Histonen phosphorylieren, wodurch das Signal verstärkt wird [69]. Nach Erkennung des DSBs in der HR wird dieser zunächst in der *Präsynapsis* modifiziert, während in der *Synapsis* die Rekrutierung von RAD51 erfolgt und in der *Postsynapsis* die DNA-Reparatur abgeschlossen wird [65].

Die Präsynapsis. In der Präsynapsis wird der DSB modifiziert. Dies geschieht durch Entfernen von Nukleotiden der 5'-dsDNA-Enden des DSBs, um einzelsträngige DNA (ssDNA, engl. *single stranded DNA*) mit 3'-Überhängen zu erhalten, an die das Protein hSSB1 (engl. *single-strand DNA binding protein 1*) bindet [70] und mit dem Protein RPA (engl. *replication protein A*) interagiert [70]. Die Entfernung der 5'-dsDNA-Enden erfolgt durch die Interaktion des *BRCA1 Komplex C* aus BRCA1 und CtIP (engl. *CtBP interacting protein*) [71] zusammen mit dem MRN-Komplex aus MRE11 (engl. *meiotic recombination 11*), RAD50 (engl. *radiation 50*) und NBS1 (engl. *Nijmegen breakage syndrom 1*) [72]. Der MRN-Komplex kann über das DNA-Bindemotif von MRE11 direkt beide Enden des DSBs binden [73]. Durch die Aktivität der Nukleasen MRE11 und CtIP können nun die 5'-dsDNA-Enden entfernt werden, wobei MRE11 als 3'-5'-Exonuklease fungiert [74], während CtIP die Resektion fördert [75]. Anschließend lagert sich RPA an die 3'-ssDNA-Enden an, um sie vor nukleolytischen Abbau zu schützen und den Austausch durch RAD51 zu veranlassen [76]. RAD51 wird über den *BRCA1-PALB2-BRCA2 Komplex* zu den 3'-ssDNA-Enden rekrutiert und ersetzt schließlich RPA [77]. ATR stimuliert die Interaktion von BRCA1 und PALB2 und fördert die Lokalisation von PALB2 im Bereich des DSBs [78]. Der *BRCA1-PALB2-BRCA2 Komplex* fördert die Bindung von RAD51 an die ssDNA und damit die Bildung der sog. *RAD51-Nukleofilamente* [79, 80].

Synapsis und Stranginvasion. In der Synapsis findet die Invasion der RAD51-Nukleofilamente in den intakten DNA-Strang des Schwesterchromatids statt. Die Rekombinase und DNA-abhängige ATPase RAD51 [81, 82] sucht die homologe DNA-Sequenz auf dem Schwesterchromatid und bindet an den komplementären DNA-Strang, was zur Bildung des sog. *Heteroduplex-DNA-Komplexes* führt [65]. Dieser Komplex wird aufgrund der vorübergehenden Verdrängung des zweiten DNA-Strangs des Schwesterchromatids auch als *D-Loop* bezeichnet (engl. *displacement loop*, Verdrängungsschleife) [83].

Postsynapsis (Abschluss der Reparatur). Der DNA-Strang wird zuletzt in der Postsynapsis verlängert. Dafür dissoziiert RAD51 von der DNA und setzt die 3'OH-Enden, die als Primer dienen, für die DNA-Synthese frei. Die DNA-Synthese des komplementären DNA-Strangs erfolgt hauptsächlich durch die DNA-Polymerase δ [84]. Nach der Auflösung der *D-Loop* und Synthese der DNA ist die fehlerfreie Reparatur erfolgreich abgeschlossen [85].

1.2.2 Die Homologe Rekombination und BRCA1 in der replikationsassoziierten Reparatur

ATR und der *BRCA1 Komplex B* (aus BRCA1, BRIP1 (BACH1) und TOPBP1 (engl. *DNA topoisomerase II binding protein 1*)) sind in der Reparatur von replikationsassoziierten DNA-Schäden essenziell [86, 55]. Sekundäre DNA-Strukturen, wie z.B. viersträngige DNA (die sog. *G4 DNA*) mit einem hohen Guanin-Anteil, stören und beeinträchtigen die Replikation [87]. Diese Strukturen werden von der Helikase BRIP1 (BACH1) aufgelöst, nachdem diese von BRCA1 in dem *BRCA1 Komplex B* phosphoryliert wurde [86, 88]. Dieser Komplex kann zudem den Kontrollpunkt der S-Phase aktivieren, um die Reparatur der DNA-Schäden sicherzustellen [86, 89, 90]. Wenn die Replikationsgabel auf solche DNA-Strukturen trifft, stoppt sie zuerst, woraufhin RPA den Schutz gewährleistet und ATR aktiviert wird [91]. Die Interaktion mit RPA führt ATR in einem heterodimeren Komplex mit ATRIP [49] durch und phosphoryliert andere Proteine, wie die *Downstream* Kinase CHK1 [91] und das Histon H2AX [92], um eine Reparatur über die HR zu induzieren.

1.2.3 Der FA/HR Signalweg in der Reparatur von replikationsassoziierten DNA-Schäden

Replikationsassoziierte Schädigungen können nach Läsionen wie ICLs (engl. *interstrand cross links*) auftreten und den FA (engl. *fanconi anaemia*) Signalweg aktivieren, der aufgrund überlappender Funktionen mit der HR auch als *FA/HR Signalweg* [93] bezeichnet wird (siehe Abb. 1.4). Eine Aktivierung dieses Signalweges findet während der Replikation und daher vorzugsweise in der S-Phase statt [93]. DNA-Schäden, wie z.B. ICLs, stellen ein Hindernis während der Replikation dar, da die kovalent verbundenen DNA-Stränge nicht getrennt werden können, woraufhin die Replikationsgabel angehalten wird. Diese Strukturen werden durch den FA/HR Signalweg erkannt und stabilisiert [93]. Für die Stabilisierung sind die HR-Proteine RAD51, BRCA1 und BRCA2 ebenfalls wichtig [94]. Die Bindung von RPA an die ssDNA führt zur Aktivierung von CHK1 über ATR [91]. ATR phosphoryliert zudem und aktiviert direkt FANCI (engl. *fanconi anaemia group I protein*) und FANCD2 (ID2-Komplex) [95], die den Wechsel zum FA/HR Signalweg vermitteln [96]. Dieses Ereignis fördert die Monoubiquitinierung des ID2-Komplexes, indem es die Dissoziation vom ID2-Komplex induziert [96, 97]. Der FA-Komplex besteht aus der E3 Ubiquitinligase *FANCL* (engl. *fanconi anaemia group L protein*) [98] und einem E2 Ubiquitin-verbindenden Enzym *UBE2T/FANCDT* (engl. *fanconi anaemia group T protein*), welche die Monoubiquitinierung des ID2-Komplexes aus FANCI und FANCD2 nach ICLs katalysieren [99]. Dabei wird FANCD2 an Lysin 561 monoubiquitiniert [100]. Nach Aktivierung durch Monoubiquitinierung akkumuliert der ID2-Komplex an dem ICL und co-lokalisiert weitere *Downstream* FA/HR Proteine [101]. In diesem Schritt spielt BRCA1, auch FANCS (engl. *fanconi anaemia group S protein*) genannt, eine wichtige Rolle, indem BRCA1 das Fortschreiten der CMG (engl. *Cdc45-Mcm-GINS*) Helikase zu

den angehaltenen Replikationsgabeln verhindert [102]. Darüber hinaus kann monoubiquitiniertes FANCD2 mit BRCA1 und RAD51 in Foci akkumulieren und die Reparatur einleiten [103]. Bei niedrigem replikativem Stress kann nicht-ubiquitiniertes FANCD2 zudem unabhängig von FANCI mit dem BLM (engl. *bloom*) Helikase-Komplex interagieren und diesen rekrutieren, um einen Neustart der Replikationsgabel zu ermöglichen und die Aktivierung weiterer, neuer Replikationsursprünge zu verhindern [104]. Daher ist der FA/HR Signalweg wichtig für die Stabilisierung und den Neustart angehaltener Replikationsgabeln.

Die Beteiligung von BRCA1 an allen wesentlichen Schritten der HR, sowohl bei der Reparatur von DSBs als auch von replikationsassoziierten DNA-Schäden im FA/HR Signalweg, verdeutlicht die wichtige Funktion von BRCA1. Für die Aufrechterhaltung der genomischen Stabilität umfassen die Funktionen von BRCA1 jedoch nicht nur die DNA-Reparatur, sondern auch die Regulierung des Zellzyklus.

1.2.4 Die Funktion von BRCA1 im Zellzyklus

BRCA1 erfüllt verschiedene Aufgaben bei der Regulierung des Zellzyklus, um die genomische Integrität zu erhalten. Nach DNA-Schäden wird BRCA1 durch ATM, ATR und CHK1 phosphoryliert, was die Reparatur von Schäden vor Eintritt in die Mitose (M-Phase) erlaubt und das Überleben der Zelle sichert [105, 106, 107, 108]. Ferner aktiviert und reguliert BRCA1 verschiedene Kontrollpunkte des Zellzyklus: So initiiert BRCA1 den G2 (*Gap2*-Phase)/M-Kontrollpunkt nach Behandlung mit Anti-Mikrotubuli-Agenzien wie z.B. Taxol [109] und nach Aktivierung von CHK1 als Reaktion auf DNA-Schädigung [110]. Außerdem induziert BRCA1 den Spindelkontrollpunkt und kontrolliert die Bildung der mitotischen Spindel [111] sowie den Arrest in der G2/M- und in der S-Phase zusammen mit MDC1 [112] und γ H2AX [113].

Für die Funktionen von BRCA1 bei der Aufrechterhaltung der genomischen Stabilität über die HR und die Zellzyklusregulierung verfügt BRCA1 über funktionelle Domänen. Diese ermöglichen die Bildung der Makrokomplexe und die Interaktion mit anderen Proteinen. Daher wird im Folgenden auf den Aufbau des BRCA1-Proteins eingegangen. Ferner wird auf Bereiche des *BRCA1* Gens eingegangen, die durch eine hohe Mutationsrate gekennzeichnet sind.

1.3 Das Brustkrebsgen *BRCA1*

1.3.1 Das *BRCA1* Gen und Aufbau des BRCA1-Proteins

BRCA1 ist als erstes Hochrisikogen für familiäre Mamma- und Ovarialkarzinome im Frühstadium identifiziert worden [114]. Das *BRCA1* Gen besteht aus 24 Exons, ist auf Chromosom 17 lokalisiert [115] und kodiert ein Protein aus 1863 Aminosäuren mit primärer Lokalisation im Nukleus [114, 116]. Verschiedene funktionelle Domänen und Strukturmotife ermöglichen es BRCA1, vielfältige Aufgaben als pleiotropes Protein bei der DNA-Reparatur (HR) [117], der Zellzyklusregulierung [109] und als Transkriptionsfaktor zu erfüllen [118]. Einige Domänen und Motife des BRCA1-Proteins sind beispielhaft in Abb. 1.5 dargestellt.

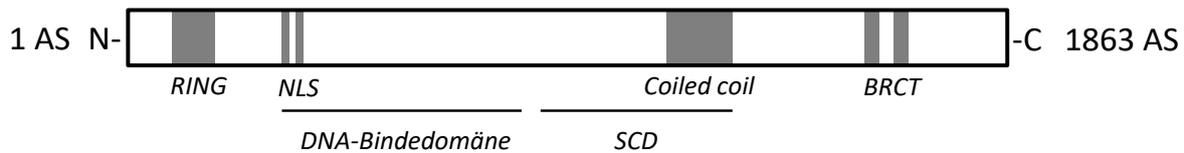


Abbildung 1.5: Beispielhafte Domänen des BRCA1-Proteins [Quellen im Text]. Nahe des Amino-Terminus (N) befinden sich die *RING finger* Domäne und zwei Kernlokalisierungssignale (NLS). In der Nähe des Carboxy-Terminus (C) sind das Proteinstrukturmotiv *Coiled coil* und die BRCT-Domänen lokalisiert (alle grau unterlegt). Zwischen der NLS und dem *Coiled coil* Strukturmotiv ist die DNA-Bindedomäne lokalisiert; die SCD Domäne schließt das *Coiled coil* Strukturmotiv ein.

Abkürzungen: AS: Aminosäure; N: Amino-Terminus, *RING* (engl. *really interesting new gene*), *NLS* (engl. *nuclear localisation signal*, Kernlokalisierungssignal), *SCD* (engl. *serine containing domain*), *BRCT* (engl. *BRCA1 C-terminus*) und C: Carboxy-Terminus.

In der N-terminalen Region von BRCA1 ist eine *RING finger* Domäne (engl. *really interesting new gene*) lokalisiert, die eine Zink-bindende Region mit einem konservierten Histidin-Motif und sieben Cystein-Motifen aufweist [119]. Unter Verwendung der *RING finger* Domäne interagiert BRCA1 mit BARD1, um einen heterodimeren Komplex mit E3 Ubiquitinligase-Aktivität zu bilden [120, 121]. Dieser Komplex vermittelt die Poly-Ubiquitinierung von BRCA1 selbst, die die Bindung von BRCA1 an die DNA erhöht [122, 123], sowie die des Faktors CtIP, der an der Entfernung der Enden beteiligt ist [124]. Das BRCA1-Protein besitzt zudem zwei Kernlokalisierungssignale (NLS, engl. *nuclear localisation signal*), welche die Translokation von BRCA1 über das Importin-System in den Zellkern vermitteln [116]. Die Bindung an die DNA erfolgt über die DNA-Bindedomäne von BRCA1 [125]. BRCA1 interagiert mit PALB2 über das Strukturmotiv *Coiled coil*, das seinerseits mit BRCA2 interagiert und einen Komplex bildet [126]. Das *Coiled coil* Strukturmotiv befindet sich in der SCD Domäne (engl. *serine containing domain*), die wichtige Serinreste für Phosphorylierungen durch ATM und ATR enthält [105, 58, 127, 128]. ATM kann die Serinreste an den Positionen S1387, S1423 und S1524 von BRCA1 phosphorylieren, um die Aktivierung des G2/M- (S1423) und des Intra-S-Kontrollpunkts (S1387) zu regulieren; im Gegensatz dazu werden die Serinreste an den Positionen S1423, S1524 und S1457 durch ATR teilweise redundant phosphoryliert [105, 128, 58, 127]. In der Nähe des C-Terminus sind zwei BRCT-Domänen (engl. *BRCA1 C-terminus*) lokalisiert, die die Bindung von BRCA1 an durch ATM phosphorylierte Proteine an Serin in *SXXF-Motifen* ermöglichen [129]. Zu diesen Proteinen gehören CtIP [130], ABRAXAS (CCDC98) [131] und BRIP1 [86, 129]. Diese Interaktionspartner bilden die Grundlage für die BRCA1 Makrokomplexe: *BRCA1 Komplex A*, *BRCA1 Komplex B* und *BRCA1 Komplex C*, wie in Abb. 1.4 gezeigt und in Abschnitt 1.2.1 erwähnt. Mutationen in *BRCA1*, die diese Regionen verändern, haben einen erheblichen Einfluss auf die Bildung der Makrokomplexe und damit auf die HR. Die Auswirkungen einer *BRCA1*-Mutation und einer veränderten DNA-Reparatur auf die Tumorentwicklung und auf das Therapieansprechen werden daher im Folgenden erläutert.

1.3.2 Folgen einer *BRCA1*-Mutation für die Entstehung des Mammakarzinoms

Das Auftreten einer Keimbahnmutation in *BRCA1* stellt ein hohes Risiko von bis zu 80 % für die Entwicklung von Mamma- oder Ovarialkarzinomen dar [114, 132]. Eine dysfunktionale Reparatur fördert daher die Tumorentwicklung und charakterisiert *BRCA1*-mutierte Tumore.

Neben seiner Funktion bei der DNA-Reparatur und der Aufrechterhaltung der genomischen Stabilität ist *BRCA1* daher ein wichtiges Tumorsuppressor-Gen, das in seiner intakten Form die Entstehung von Tumoren, insbesondere des Mammakarzinoms, verhindert.

1.3.3 Hohe Mutationsraten in Regionen des *BRCA1* Gens

Mutationen im *BRCA1* Gen sind in verschiedenen Regionen konzentriert und variieren in ihrer Häufigkeit. Abhängig vom veränderten Exon können dabei verschiedene Domänen des BRCA1-Proteins betroffen sein. In Abb. 1.6 ist das 24 Exon lange *BRCA1* Gen dargestellt und die Exons mit einer hohen Mutationsrate sowie die betroffenen Proteindomänen gekennzeichnet [modifiziert nach 133].

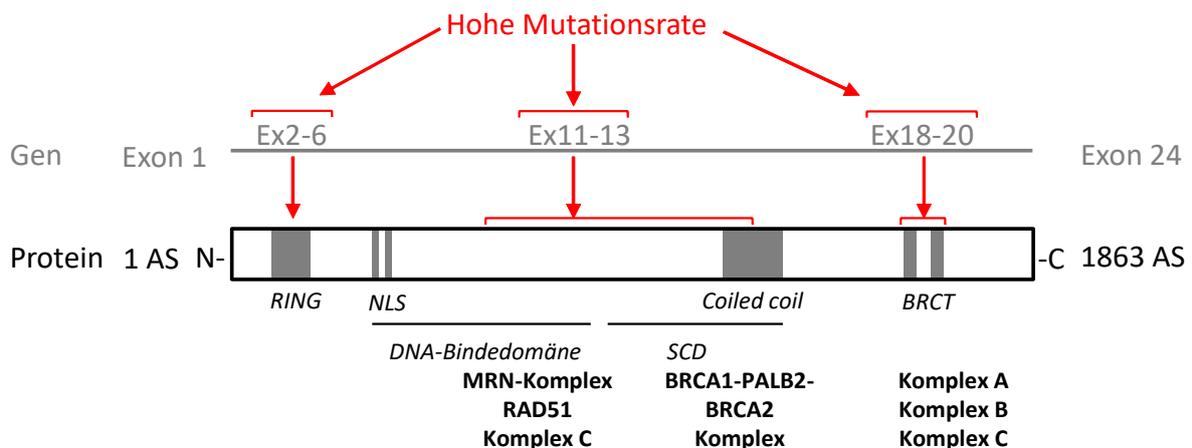


Abbildung 1.6: Mutationsraten der verschiedenen Exons des *BRCA1* Gens und betroffene Proteindomänen [modifiziert nach 133, 55]. Dargestellt ist das *BRCA1* Gen aus 24 Exons und die drei Bereiche (Ex2-6, Ex11-13, Ex18-20) mit hohen Mutationsraten. Unter dem *BRCA1* Gen ist das BRCA1-Protein mit den jeweiligen Domänen gezeigt, sowie die betroffenen BRCA1 Komplexe und Interaktionspartner.

Abkürzungen: AS: Aminosäure; N: Amino-Terminus, Ex: Exon, *RING* (engl. *really interesting new gene*), *NLS* (engl. *nuclear localisation signal*, Kernlokalisierungssignal), MRN (Komplex aus MRE11, RAD50 und NBS1) *SCD* (engl. *serine containing domain*), *BRCT* (engl. *BRCA1 C-terminus*) und C: Carboxy-Terminus.

Die Region von Exon 2 bis Exon 6 ist durch eine hohe Mutationsrate gekennzeichnet und kodiert die *RING finger* Domäne von BRCA1 [134, 133]. Eine ebenfalls hohe Mutationsrate betrifft die Region von Exon 11 bis Exon 13, welche die DNA-Bindedomäne und die NLS kodiert [125]. Diese sind wichtig für die Interaktion mit dem MRN-Komplex [72] und regulieren indirekt die Interaktion mit RAD51 und sind für die Interaktion mit p53 von Bedeutung [135] (nicht gezeigt in Abb. 1.6). Regionen des *Coiled coil* Strukturmotifs und der SCD-Domäne werden ebenfalls von diesen Exons kodiert [133]. Dabei befinden sich 60 % der Proteinkodierenden Sequenz in Exon 11 [114]. Darüber hinaus ist häufig die Region von Exon 18 bis Exon 20 von Mutationen betroffen, welche die BRCT-Domänen kodieren [114, 136, 134, 133]. Die Bereiche mit hohen Mutationsraten kodieren demnach Domänen des BRCA1-Proteins, die für die Ausbildung der BRCA1 Makrokomplexe wichtig sind. Mutationen in Exon 11 bis Exon 13 beeinflussen die Bildung des *BRCA1 Komplex C*, die Interaktion mit dem MRN-Komplex und mit RAD51, während Mutationen in den BRCT-Domänen einen Einfluss auf die *BRCA1 Komplexe A, B* und *C* sowie den *BRCA1-PALB2-BRCA2 Komplex* haben (siehe Abb. 1.6).

1.3.4 Therapie-Optionen für Patientinnen mit *BRCA1*-Mutation bzw. HR-Defekt

Mutationen in *BRCA1* fördern nicht nur die Tumorgenese des Mammakarzinoms, sondern beeinflussen auch das Ansprechen auf eine Radio- oder Chemotherapie nach Tumorentwicklung. Deshalb ist es wichtig zu differenzieren, dass eine Mutation in *BRCA1* zunächst die Entartung der Zelle initiiert, aber aufgrund einer dysfunktionalen DNA-Reparatur eine höhere Radio- und Chemo-Sensitivität des späteren Tumors verursachen kann. Obwohl für *BRCA1*-Mutationsträgerinnen eine höhere Sensitivität gegenüber platinbasierten DNA-schädigenden Agenzien (z.B. Cisplatin, Carboplatin) beschrieben wurde, sind damit keine verbesserten Überlebenschancen assoziiert [137, 138, 139]. Insbesondere für den TNBC Subtyp ist zu berücksichtigen, dass neben einer *BRCA1*-Mutation häufig eine Mutation in *TP53* (engl. *tumor protein 53*) auftritt, die das Ansprechen auf die Therapie und die Überlebenschancen verschlechtert [140]. Um das Überleben dieser Patientinnen zu verbessern, wurden daher therapeutische Ansätze entwickelt, deren Wirksamkeit auf dem *BRCA1*-Defekt beruhen.

Einen therapeutischen Ansatz bei *BRCA1*-mutierten Mammakarzinomen ist der Einsatz von PARP-Inhibitoren [141, 142, 143]. Die Polymerase PARP1 (engl. *poly ADP-ribose polymerase 1*) erkennt Einzelstrangbrüche der DNA (SSB, engl. *single-strand break*) [144], woraufhin PARP1 polymere Ketten von ADP-Ribose (engl. *adenosine diphosphate*) für die Rekrutierung anderer Einzelstrangreparatur-Proteine synthetisiert [145], wie XRCC1 (engl. *x-ray cross complementing 1*), die die SSBs stabilisieren, so dass die DNA-Polymerase β die komplementären Basen synthetisieren und die DNA Ligase III, die die DNA-Enden miteinander verbinden kann [146].

Einer der ersten PARP-Inhibitoren ist Olaparib (KU0059436) [142], der die enzymatische Aktivität von PARP1 durch Inhibition der Auto-Poly-ADP-Ribosylierung und durch Halten von PARP1 auf dem DNA-Strang (engl. *trapping*) hemmt [147]. Dadurch wird die Rekrutierung weiterer Reparaturproteine in den Bereich der Schädigung verhindert, wodurch nach Kollision mit der Replikationsgabel ein ein-endiger Doppelstrangbruch entsteht [142, 148]. Für die Reparatur dieses Schadens und Auflösung der Blockierung, damit der Zellzyklus fortgesetzt werden kann, wird eine funktionsfähige HR benötigt [149].

Daher zeigt die Kombination von PARP-Inhibitoren wie Olaparib mit einer HR-Defizienz, z.B. durch einen *BRCA1*- oder *BRCA2*-Verlust, die Wirkung der synthetischen Letalität [141, 142, 143]. Die synthetische Letalität bezeichnet die genetische Interaktion zwischen PARP1 und BRCA: ein individueller Verlust des einzelnen Gens hat keine letale Wirkung, während der gleichzeitige Verlust jedoch zum Zelltod führt [150]. Die Monotherapie mit PARP1-Inhibition durch Olaparib oder Talazoparib zeigte vielversprechende Resultate in Kohorten von Patientinnen mit Mammakarzinom und Keimbahnmutationen in *BRCA1* oder *BRCA2* [151, 152]. Großangelegte Phase III-Studien haben die Wirksamkeit von Olaparib erwiesen und eine verbesserte Überlebensrate bei BRCA-Patientinnen mit fortgeschrittenem und metastasiertem Mammakarzinom bestätigt [153]. Die Wirkung von PARP-Inhibition wurde sogar in präklinischen Studien unabhängig von einer *BRCA1*- oder *BRCA2*-Mutation in Mammakarzinomzelllinien beobachtet [143, 153]. Tumore können daher unabhängig von

einer *BRCA1*- oder *BRCA2*-Mutation eine HR-Defizienz, die sog. *BRCAness*, aufweisen [154]. Chopra et al., 2020 beobachteten eine *BRCAness* bei 69 % der untersuchten TNBC Mammakarzinome [155]. Ursachen für diese können dabei Mutationen in HR-relevanten Genen wie in *PALB2*, *BARD1*, *BRIP1* etc. sein [30].

Die hohe Wirksamkeit der PARP1-Inhibitoren wurde in weiteren Studien mit Immuncheckpoint-basierten Therapien kombiniert (NCT03025035) [156]. Immuncheckpoint-Therapien basieren auf Veränderungen der intrazellulären und adaptiven Immunantwort und finden auch Anwendung als Monotherapie bei Tumoren mit HR-Defizienz, womit sich das nächste Kapitel befasst.

1.4 Folgen einer HR-Defizienz für die adaptive und intrazelluläre Immunantwort

1.4.1 Folgen einer HR-Defizienz für die adaptive Immunantwort

Eine HR-Defizienz beeinflusst nicht nur die Tumorentstehung und das Ansprechen auf die Therapie, sondern kann auch die Reaktion des Immunsystems auf den Tumor verändern. Normalerweise erkennt das Immunsystem den Tumor und reagiert auf ihn. Diese Reaktion kann jedoch durch die Expression immunogener Neo-Antigene auf den Tumorzellen unterdrückt werden und so die adaptive Immunantwort beeinflussen [157]. Immunogene Neo-Antigene beziehen sich auf Rezeptoren und Transmembranproteine auf Tumorzellen, welche die Immunantwort modellieren können [157]. Eine hohe Rate dieser wurde in TNBC Tumoren festgestellt, die in *BRCA1*-mutierten Tumoren höher, aber nicht signifikant, war [158].

Bei der Immunreaktion wirken diese Rezeptoren und Transmembranproteine als Immuncheckpoint-Komponenten und werden daher auf verschiedenen Immunzellen [159, 160] wie z.B. T-Lymphozyten exprimiert, wodurch sie eine pro- oder anti-inflammatorische Wirkung haben können [161]. Das Transmembranprotein PD-L1 (engl. *programmed cell death protein ligand 1*) gehört zu den Immuncheckpoint-Komponenten und kann auf Tumorzellen exprimiert werden [162, 163]. Normalerweise induzieren T-Zellen die Expression von PD-L1 und infiltrieren während der Immunreaktion das Gewebe, wo sie Interferone freisetzen [164]. Die Bindung von PD-L1 an den Rezeptor PD-1 (engl. *programmed cell death protein 1*) oder CD80-Rezeptoren auf aktivierten T-Zellen führt schließlich zur anti-inflammatorischen Reaktion, indem die Immunreaktion unterdrückt wird [165].

Daher ermöglicht die Expression von PD-L1 oder PD-1 auf Tumorzellen die direkte Interaktion mit T-Zellen und verhindert die Erkennung der entarteten Zelle und die Auslösung der Immunreaktion. Eine erhöhte Expression von Immuncheckpoint-Komponenten, wie z.B. PD-L1 bei TNBC-Tumoren [166], erlaubt weitere Ansatzpunkte für zielgerichtete Therapien und den Einsatz von sog. *Immuncheckpoint-Inhibitoren* in der Tumorbehandlung. Liganden (PD-L1) [167] oder Rezeptoren (PD-1) [168] können über monoklonale Antikörper blockiert werden und so das anti-inflammatorische Signal des Tumors unterdrücken, wodurch eine

Immunreaktion über aktivierte T-Zellen eingeleitet werden kann. Die Anwendung von Immuncheckpoint-Inhibitoren gegen Moleküle, wie z.B. CTLA-4 (engl. *cytotoxic T lymphocyte antigen-4*), PD-1 und PD-L1, die auf Tumorzellen und Immunzellen exprimiert werden, wurde in zahlreichen Studien bei Patientinnen mit Mammakarzinom untersucht, welche sich in einer frühen Phase befinden [169, 170, 171, 172, 173, 174]. Eine hohe Ansprechrate auf diese Agenzien wurde bei Patientinnen mit metastasierenden Tumoren wie dem TNBC [170] und PD-L1-positiven Tumoren [169, 174] beobachtet.

Bei Patientinnen mit Mammakarzinom wurde nicht nur die Anwendung als Monotherapie von Immuncheckpoint-Inhibitoren untersucht, sondern auch die Kombination mit PARP-Inhibition analysiert. Gegenwärtig wird die Kombination von anti-PD-L1 und PARP-Inhibition bei Patientinnen mit TNBC Mammakarzinom und/oder *BRCA1*- oder *BRCA2*-Mutationen in laufenden Studien (NCT03101280 und NCT03330405) untersucht [175]. Die kombinierte Anwendung zeigte jedoch bereits im Mausmodell einen Effekt, indem Olaparib die intrazelluläre und adaptive Immunantwort stimuliert und die Wirkung von Immuncheckpoint-Inhibitoren ermöglicht [176, 177].

1.4.2 Folgen einer HR-Defizienz für die intrazelluläre Immunantwort

Eine HR-Defizienz beeinträchtigt nicht nur die adaptive Immunantwort, sondern verändert auch die intrazelluläre Immunantwort. Infolge einer defekten HR und erhöhten genomischen Instabilität kommt es zu DNA-Schäden, die als ssDNA- und dsDNA-Fragmente über bisher unbekannte Mechanismen in das Cytosol freigesetzt werden, wo sie akkumulieren und die intrazelluläre Immunantwort über cGAS-STING (cGAS, engl. *cyclic GMP-AMP synthase*; STING, engl. *stimulator of interferon genes*) aktivieren [178, 179, 163].

cGAS erkennt die cytosolische dsDNA [180] und katalysiert die Produktion von cGAMP (engl. *cyclic guanosine monophosphate-adenosine monophosphate*) [181]. cGAMP stimuliert die Konformationsänderung von STING von einem inaktiven Monomer zu einem aktiven Dimer [182, 183]. Anschließend aktiviert STING die Kinase TBK1 (engl. *TANK-binding kinase 1*), die den Faktor IRF3 (engl. *interferon regulatory transcription factor 3*) phosphoryliert und die Genexpression von Typ 1 Interferonen hochreguliert [184]. Die Expression von Typ 1 Interferonen führt schließlich im Organismus zur Aktivierung diverser Immunzellen wie beispielsweise T-Lymphozyten [185, 186] und zur Stimulierung oder Modulation der Immunantwort.

In verschiedenen Tumorentitäten wurde nach Aktivierung von STING eine erhöhte Expression von Immuncheckpoint-Komponenten wie z.B. PD-1, die die adaptive Immunantwort beeinflussen, beobachtet [187, 188]. Daher beeinflusst ein HR-Defekt direkt die intrazelluläre und adaptive Immunantwort. Eine funktionelle HR verhindert eine Aktivierung der Immunreaktion nicht nur durch die Reparatur von DNA-Schäden, sondern auch durch den Schutz neu replizierter DNA vor nukleolytischer Degradation durch Endo- und Exonukleasen wie MRE11 [189, 94]. Auf diese Weise wird eine Akkumulation cytosolischer DNA-Fragmente durch eine intakte HR verhindert. Diese Funktion wurde von Bhattacharya et al., 2017 bestätigt, die den Abbau neu replizierter genomischer DNA durch MRE11 in Abwesenheit von RAD51 beobachteten sowie die Freisetzung dieser ins Cytosol, woraufhin die intrazelluläre

Immunantwort induziert wurde [190]. Neben der Schutzfunktion vor nukleolytischem Abbau verhindern HR-Proteine durch ihre sequenz-unspezifische DNA-Bindung auch direkt die Freisetzung von DNA-Fragmenten in das Cytosol [191]. Aufgrund ihrer Funktionen bei der DNA-Reparatur und dem Schutz während der Replikation befinden sich HR-Proteine hauptsächlich im Zellkern [192]. In einem geringen Anteil kann jedoch eine zusätzliche Lokalisation im Cytosol vorliegen, wo diese Proteine über cGAS-STING direkt die intrazelluläre Immunantwort aktivieren können [192]: So kann cytosolisch lokalisiertes MRE11 dsDNA im Cytosol direkt erkennen und den cGAS-STING Signalweg induzieren [193].

Eine HR-Defizienz fördert daher die Aktivierung der intrazellulären Immunantwort, die wiederum die adaptive Immunantwort stimuliert. Der Einsatz von Immuncheckpoint-Inhibitoren liegt daher bei Tumoren mit einer HR-Defizienz nahe, die eine aktivierte intrazelluläre Immunantwort und eine erhöhte Expression immunogener Neo-Antigene zeigen. Trotz dieser therapeutischen Ansätze bei HR-defizienten Mammakarzinomen ist die Entstehung von Resistenzen gegen PARP-Inhibition [194] und Immuncheckpoint-Inhibition ein Problem [195]. Liu et al., 2017 beobachteten Resistenzen gegen PARP-Inhibition bei *BRCA1*-defizienten Mammakarzinomen [194]. Bei TNBC Mammakarzinomen zeigten sich Resistenzen gegen Immuncheckpoint-Inhibition ebenfalls als problematisch [195]. Generell stellt die Chemo- und Radioresistenz von Tumorzellen die Hauptursache für das Fehlschlagen einer Therapie und die Entwicklung eines Rezidivs dar [196]. Verschiedene Mechanismen können zur Entwicklung von Resistenzen führen. Resistenzen gegen PARP-Inhibition basierten auf der zellulären Verfügbarkeit des Inhibitors, dem Einfluss auf die Aktivität oder Häufigkeit der PAR-Ketten, der Reaktivierung der HR und dem Einfluss des Schutzes der Replikationsgabel [197]. Außerdem identifizierten Liu et al., 2017 in *BRCA1*-mutierten TNBC Zelllinien mit Resistenzen gegenüber PARP-Inhibition eine Population resistenter Zellen, die sog. *Tumorstammzellen* [194]. Die Bedeutung der DNA-Reparatur über die HR bei der Resistenzvermittlung von Tumorstammzellen wird daher im nächsten Kapitel näher ausgeführt.

1.5 Bedeutung der HR für die Therapieresistenz von Tumorstammzellen

1.5.1 Problematik von Therapieresistenzen

Das größte Hindernis bei der Therapie des Mammakarzinoms ist unter anderem die Entwicklung von Chemo- und Radioresistenzen, von der ein großer Teil der Patientinnen betroffen ist. Eine kleine Zellpopulation, die sog. *Tumorstammzellen* (CSCs, engl. *cancer stem cells*), ist für die Entwicklung von Chemo- [194] und Radioresistenz [198, 199] verantwortlich. Diese Zellpopulation ist in der Lage, das Tumorstammwachstum nach der Therapie zu reinitiiieren und weist ein hohes Metastasierungspotenzial auf [200, 201]. Es wird angenommen, dass CSCs durch die Therapie selektiert werden und in der Folge durch die Entwicklung eines Rezidivs eine schlechte Prognose verursachen [202]. Der Grund, warum Tumorstammzellen zur Resistenz beitragen und einen neuen Tumor initiieren können, liegt in ihren charakteristischen Eigenschaften, wie z.B. in einer erhöhten DNA-Reparaturkapazität [203].

1.5.2 Eigenschaften der Tumorstammzellen

Das Tumorgewebe zeichnet sich durch eine hohe Heterogenität aus und setzt sich aus verschiedenen Zellpopulationen zusammen [3, 202]. Eine dieser Zellpopulationen sind die Tumorstammzellen, die das heterogene Tumorgewebe erhalten [3, 202]. Tumorstammzellen sind aufgrund ihrer Fähigkeit, sich selbst zu erhalten, und ihres hohen Differenzierungspotenzials in der Lage, diesen Prozess zu bewältigen [204, 202]. Im hierarchischen Modell der CSC-Hypothese wird davon ausgegangen, dass nur Tumorstammzellen diese einzigartigen Eigenschaften besitzen [206, 205]. Deshalb sind nur diese Zellen fähig, sich durch asymmetrische Zellteilung in nicht-tumorigene Tumorzellen zu differenzieren und die Tumormasse zu erhalten [205], wie in Abb. 1.7 dargestellt [206, 205]. Im Gegensatz dazu können die Tumorzellen der Tumormasse nur über symmetrische Zellteilung den gleichen differenzierten Zelltyp hervorbringen und haben daher ein begrenztes Differenzierungspotenzial (siehe Abb. 1.7).

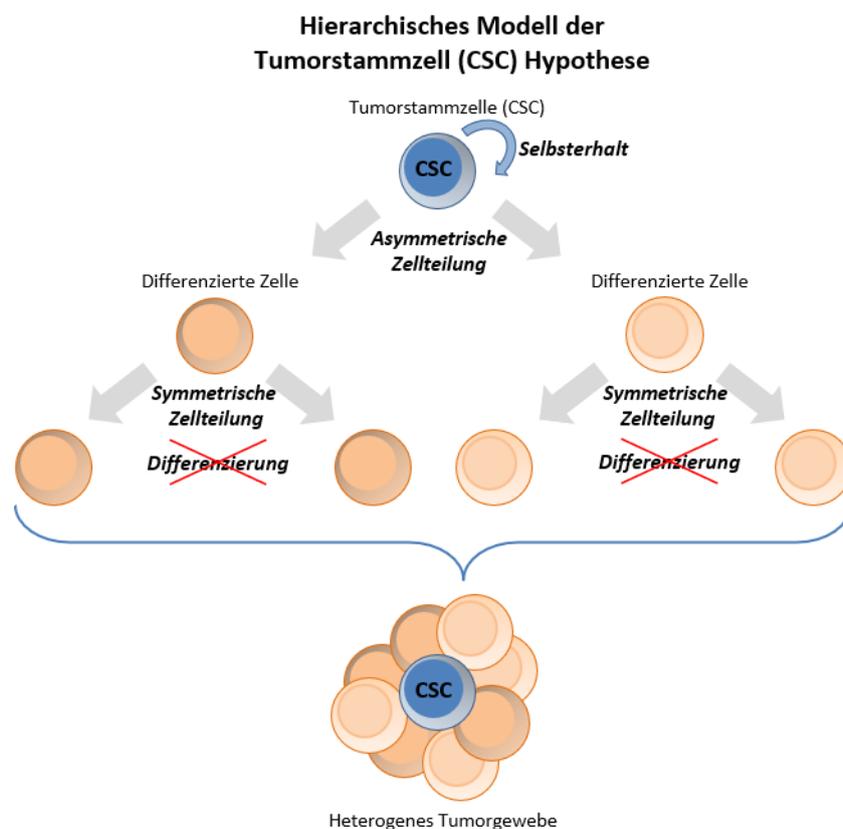


Abbildung 1.7: Hierarchisches Modell der CSC-Hypothese [modifiziert nach 206, 205]. Tumorgewebe zeichnet sich durch eine hohe Heterogenität mit verschiedenen Zellpopulationen aus. Dabei existieren Tumorstammzellen (CSC, engl. *cancer stem cell*), welche sich über eine asymmetrische Zellteilung selbsterhalten können und differenzierte Zellen hervorbringen können. Differenzierte Zellen wiederum können über eine symmetrische Zellteilung nur den gleichen Zelltyp hervorbringen und nicht in andere Zelltypen differenzieren.

Die Existenz von Tumorstammzellen wurde in verschiedenen Entitäten bestätigt, und diese Zellen wurden anhand vielfältiger Marker charakterisiert und identifiziert [207, 208, 209, 210]. Beim Mammakarzinom wurden CSCs (BCSCs, engl. *breast cancer stem cells*) erstmals von Al-Hajj et al., 2003 beschrieben [207]. In dieser Studie wurden BCSCs aus humanen

Mammakarzinomen über den Nachweis der Oberflächenproteine CD44^(+, high) und CD24^(-, low) isoliert [207]. Bei der Initiierung von CD44^(+, high)/CD24^(-, low)-Zellen in NOD/SCID-Mäusen zeigten die BCSCs ein höheres tumorigenes Potenzial als die anderen Zellen der Tumormasse [207]. Folglich können die BCSCs durch die Expression von CD44 [207] und durch die Abwesenheit oder geringe Expression von CD24 [207] charakterisiert werden. Darüber hinaus können BCSCs durch die Expression des Rezeptors CD133 [211] identifiziert werden. Eine weitere Eigenschaft von BCSCs und CSCs ist die Bildung von Tumorsphären in *in vitro*-Experimenten, wie Laranjo et al., 2020 gezeigt haben [212]. Ein universelles und unabhängiges Merkmal stellt jedoch die hohe Expression und Aktivität der ALDH (engl. *aldehyde dehydrogenase*) dar [213, 194]. Die Aktivität der ALDH1 wird sogar als prognostischer Biomarker für ein verschlechtertes Gesamtüberleben bei verschiedenen Tumorentitäten verwendet [214, 215]. Tumorstammzellen tragen zu einem verschlechterten Überleben bei, weil sie – neben ihrer Fähigkeit, die Tumormasse zu erhalten – ein hohes Metastasierungspotenzial besitzen [201] und mit Therapieresistenzen [194, 198, 199] assoziiert sind [200].

Für den Metastasierungsprozess muss die Tumorstammzelle die sog. *Epitheliale zu Mesenchymale Transition* (EMT, engl. *epithelial-to-mesenchymal transition*) durchlaufen, um sich zunächst vom Primärtumor abzulösen und als zirkulierende Tumorzelle über den Blutkreislauf oder das Lymphgefäßsystem an den Ort der Metastase zu gelangen [216]. Die EMT bezieht sich auf einen biologisch determinierten Prozess, bei dem sich eine Zelle mit einem epithelialen Phänotyp in einem dynamischen, reversiblen Übergang zu einem mesenchymalen Phänotyp verändert, erstmals von Elizabeth Hay in Prozessen der Embryogenese und Organogenese beschrieben [217, 218]. Sie ist wichtig bei normalen und pathophysiologischen Prozessen wie der Entwicklung/ Differenzierung [217, 218], Wundheilung [219] und Geweberegeneration sowie bei Organfibrosen [220] und bei der Tumorprogression [221]. Im Prozess der EMT werden drei Phänotypen unterschieden: der *epitheliale*, der *mesenchymale* und der „*Hybrid*“-Phänotyp, die charakteristische Merkmale aufweisen. Dieser Übergang wird über verschiedene Transkriptionsfaktoren wie z.B. TWIST1 oder ZEB1 reguliert [222]. Der Grad der Stammzellartigkeit variiert je nach Phänotypen und je nachdem, ob es sich bei der Zelle um eine normale Zelle in der Entwicklung/Differenzierung oder um eine Tumorzelle handelt [223].

Der epitheliale Phänotyp weist die Expression von E-Cadherin, EpCAM (engl. *epithelial cell adhesion molecule*) und Cytokeratin auf und zeigt eine apical/ basale Zellpolarität [216]. In diesem Phänotyp bildet Aktin ein dichtes, festes und kortikales Netzwerk aus [223]. Zellen mit einem epithelialen Phänotyp sind durch enge Zellverbindungen gekennzeichnet und daher nicht invasiv [221]. In der Entwicklung ist dieser Zelltyp mit einem hohen stammzellähnlichen Charakter assoziiert; wurde aber in Tumorzellen als stammzellähnlicher oder nicht-stammzellähnlicher Phänotyp beschrieben [221].

Der „*Hybrid*“-Phänotyp befindet sich zwischen dem epithelialen und mesenchymalen Phänotyp [222]. Dieser Phänotyp kann daher sowohl epitheliale Marker wie E-Cadherin, EpCAM, Cytokeratin, als auch mesenchymale Marker wie Vimentin, N-Cadherin und Fibronectin exprimieren [222]. Die Polarität dieser Zellen kann „apical/basal“ oder

„vorn/hinten“ sein [222], wobei Aktin ein festes und dichtes Netzwerk oder auch filamentös sein kann [223]. Die zellulären Verbindungen des „Hybrid“-Phänotyps sind eher locker, was einen invasiven Phänotyp erlaubt [223]. In der Entwicklung wird der „Hybrid“-Phänotyp mit einem Verlust des Stammzellcharakters beschrieben, aber ist in Tumorzellen mit dem Erwerb von Stammzelleigenschaften assoziiert [223].

Der mesenchymale Phänotyp zeigt eine hohe Expression von Vimentin, N-Cadherin und Fibronectin, während die Zellpolarität „vorn/hinten“ ist [216]. Aufgrund des filamentös strukturierten Aktins und der individuellen Zellverbindungen ist dieser Phänotyp hoch-invasiv [223]. In der Entwicklung ist der mesenchymale Phänotyp nicht mit Stammzelleigenschaften assoziiert, aber in Tumorzellen ist er mit stammzellähnlichen Merkmalen verknüpft [223]. Ein mesenchymaler Phänotyp weist jedoch nicht ausschließlich auf einen Tumorstammzellcharakter hin: Es wurde beobachtet, dass Tumorzellen keinen vollständigen Prozess der EMT durchlaufen müssen, sondern häufig einen „Hybrid“-Phänotyp aufweisen, der für die Adaption während der Metastasierung essenziell ist [224], weshalb Tumorstammzellen auch epitheliale Eigenschaften besitzen können. Dieser Phänotyp verdeutlicht die hohe Plastizität und Dynamik der EMT-Zustände [225].

Tumorstammzellen können daher, unabhängig von ihrer Stammzellartigkeit, unterschiedliche EMT-Zustände aufweisen, um eine hohe Anpassungsfähigkeit zu erhalten, welche Metastasierungsprozesse und Resistenzmechanismen ermöglicht [222, 224]. Tumorstammzellen mit mesenchymalen Eigenschaften wurden für die Rezidiventwicklung nach Therapie verantwortlich gemacht, da diese Zellen die Therapie als freigesetzte Tumorzellen überlebten [226]. Therapieresistenzen in Verbindung mit Tumorstammzellen wurden auch bei Mammakarzinomzellen beobachtet, da Zellen mit Tumorstammzelleigenschaften die neoadjuvante Chemotherapie überlebten [227]. Die EMT trägt somit als Faktor zur Resistenz von Tumorstammzellen bei. Ein weiterer Resistenzmechanismus ist die veränderte DNA-Reparatur in Tumorstammzellen.

1.5.3 Hochregulierte DNA-Reparatur als Resistenzmechanismus in Tumorstammzellen

Eine Ursache für die Chemo- und Radioresistenz von Tumorstammzellen ist die hochregulierte DNA-Reparatur, insbesondere eine hochregulierte HR [203]. Eine erhöhte RAD51 Expression wurde mit einer Resistenz in CSCs von *BRCA1*-mutierten TNBC assoziiert [194]. Bei anderen Tumorentitäten, wie z. B. dem Pankreaskarzinom, wurde im Vergleich zu den anderen Tumorzellen eine erhöhte Expression von *BRCA1* und *RAD51* in CSCs gefunden [228]. In einer anderen Studie wurde in einem Mausmodell ebenfalls eine hohe Expression von *BRCA1* und anderen an der HR beteiligten Genen in Tumorstammzellen beobachtet [229]. Aufgrund ihrer erhöhten Reparaturkapazität zeigen CSCs eine erhöhte Toleranz gegenüber endogenen DNA-Schäden wie Replikationsstress [203] und zeigen daher eine verbesserte Überlebensrate im Fall von zusätzlichen exogenen DNA-Schäden durch Chemo- oder Radiotherapie. Weiterhin beschreiben andere Studien *BRCA1* als einen negativen Regulator in normalen [230] und malignen Stammzellen [231].

1.5.4 Funktion von BRCA1 in normalen und malignen Stammzellen

BRCA1 reguliert die Differenzierung sowohl von normalen Stammzellen des epithelialen Brustgewebes [230] als auch von Tumorstammzellen des Mammakarzinoms [231]. BRCA1 induziert die Differenzierung von Östrogenrezeptor (ER, engl. *estrogen receptor*) -negativen Stammzellen oder Vorläufer-Zellen zu ER-positiven, luminalen Zellen im normalen Brustgewebe, wie Liu et al., 2008 anhand von *in vitro* Systemen und humanisierten NOD/SCID-Mausmodellen zeigten [230]. Die Differenzierung wird durch die EMT reguliert, die BRCA1 über den Transkriptionsfaktor *TWIST* unterdrückt und so die Dedifferenzierung zu einem mesenchymalen Phänotyp während der normalen und malignen Entwicklung verhindert [232]. Eine hochregulierte Expression dieser EMT-Faktoren wurde bereits in CSCs des Mammakarzinoms beobachtet, was die Fähigkeit zur Invasion und Kolonisierung unterstützt [233]. BRCA1 ist an zahlreichen Signalwegen der Differenzierung u.a. im Mammakarzinom beteiligt [234, 235, 236]. Zudem wurde eine erhöhte Expression des Stammzellmarkers ALDH in *BRCA1*-mutierten Mammakarzinomen beobachtet, was auf einen hohen Anteil an CSCs hinwies [237]. Ein Defekt oder gar Verlust des *BRCA1* Gens hat daher schwerwiegende Folgen für die Differenzierung und führt bei normalen und malignen Zellen zum Stammzellcharakter, weshalb *BRCA1*-defiziente Tumorzellen einen erhöhten Stammzellcharakter aufweisen. Dies bestätigt die Funktion von BRCA1 als negativer Regulator bei der Differenzierung von Stammzellen. Die teils kontroversen Beobachtungen, dass eine *BRCA1*-Defizienz den Tumorstammzellanteil erhöht [194], andererseits aber eine erhöhte BRCA1 Expression [228] und DNA-Reparaturkapazität in Tumorstammzellen [203] gefunden wurden, sollen in der vorliegenden Arbeit aufgeklärt werden.

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Auswirkungen einer veränderten Homologen Rekombination und BRCA1 Expression wurden in Bezug auf Überexpression – teilweise in Tumorstammzellen – nachgewiesen [203]. Zum anderen wurden bisher die Folgen eines HR-Defekts mit *Knockout*-Zelllinien hinsichtlich der Akkumulation cytosolischer dsDNA und der intrazelluläre Immunantwort untersucht [190] und die Auswirkungen haploider Zustände auf die genomische Stabilität analysiert [238]. Es fehlt jedoch an geeigneten, stabilen und isogenen Zellsystemen, um die Folgen einer reduzierten Expression von BRCA1 auf die Tumorstammzellfraktion und die intrazelluläre Immunantwort und damit auf die Strahlenempfindlichkeit zu untersuchen. Daher soll in der vorliegenden Arbeit die folgende Frage beantwortet werden:

„Welchen Einfluss haben eine reduzierte BRCA1 Expression und DNA-Reparatur auf den Tumorstammzellanteil und die intrazelluläre Immunantwort, und damit auf die Strahlenempfindlichkeit in der Mammakarzinomzelllinie MCF7 (engl. Michigan Cancer Foundation 7) des Subtyps Luminal A?“

Um diese Frage zu klären, sollte zunächst ein isogenes Zellsystem mit unterschiedlichen Expressionsniveaus von BRCA1 etabliert werden.

2 Material und Methoden

Der folgende Abschnitt beinhaltet im ersten Teil eine Erfassung über das verwendete Material (2.1 *Material*) und beschreibt im zweiten Teil die durchgeführten Methoden (2.2 *Methoden*) für die Etablierung eines isogenen Zellsystems in MCF7 und für die Analyse der MCF7-Klone hinsichtlich DNA-Reparatur, Tumorstammzeleigenschaften und intrazellulärer Immunantwort.

2.1 Material

In diesem Abschnitt sind die verwendeten Materialien gelistet und zusammengefasst.

2.1.1 Zelllinien

Es wurde mit zwei Brustkrebszelllinien (siehe Tab. 2.1) und mit CRISPR/Cas9 (CRISPR, engl. *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*; Cas9, engl. *CRISPR-associated 9*)-modifizierten Mammakarzinomzelllinien (siehe Tab. 2.2) gearbeitet.

Tabelle 2.1: Übersicht über die verwendeten Tumorzelllinien. Abkürzungen: MCF7: engl. *Michigan Cancer Foundation 7*; Lum A: Luminal A, TNBC: engl. *triple-negative breast cancer*

Zelllinie	Ursprung	Subtyp	Etabliert von
MCF7	Pleuraerguss	Lum A	[239]
HCC1937	Primäres duktales Karzinom	TNBC	[240]

Tabelle 2.2: Übersicht über die CRISPR/Cas9-modifizierten Zelllinien

Kodierung	Ursprungszelllinie	CRISPR/Cas9 Modifikation
Klon 9.1	MCF7	<i>BRCA1</i> - Exon 9
Klon 9.2	MCF7	<i>BRCA1</i> - Exon 9
Klon 9.3	MCF7	<i>BRCA1</i> - Exon 9
Klon 9.4	MCF7	<i>BRCA1</i> - Exon 9
Klon 9.5	MCF7	<i>BRCA1</i> - Exon 9
Klon 14.1	MCF7	<i>BRCA1</i> - Exon 14
Klon 14.2	MCF7	<i>BRCA1</i> - Exon 14
Klon 14.3	MCF7	<i>BRCA1</i> - Exon 14

2.1.2 Plasmide

Zur CRISPR/Cas9-Modifikation wurde das Plasmid PX458 (siehe Tab. 2.3) verwendet; die Plasmidkarte ist im Anhang in Abb. A.1 gezeigt.

Tabelle 2.3: Verwendete Plasmide

Plasmid	Erhalten von	Größe	Resistenz
PX458	Addgene #48138	9.300 bp	Ampicillin
pDR-GFP	Addgene #26475	8.646 bp	Ampicillin
pEGFP-N1	Addgene #6085-1	4.733 bp	Kanamycin, Ampicillin

2.1.3 single guide RNAs

Zur CRISPR/Cas9-Modifikation des *BRCA1* Gens wurden verschiedene *sgRNAs* (engl. *single guide RNA*) gegen unterschiedliche Exons des *BRCA1* Gens in den Vektor (siehe Tab. 2.4) kloniert. Die verwendeten *sgRNAs* wurden mithilfe des Online-Tools *crispr.mit.edu* ermittelt und sind in Tab. 2.4 aufgeführt.

Tabelle 2.4: Verwendete single guide RNAs

sgRNA (<i>BRCA1</i>)	Sequenz (5' → 3')
Exon 9 <i>forward</i>	CACCGTTGTTACAAATCACCCCTCA
Exon 9 <i>reverse</i>	AAACTGAGGGGTGATTTGTAACAAC
Exon 14 <i>forward</i>	CACCGCCATCATTAGATGATAGG
Exon 14 <i>reverse</i>	AAACCCTATCATCTAATGATGGGC

2.1.4 Primer

Für die primäre PCR-Analyse wurden die nachfolgend aufgeführten Primer (siehe Tab. 2.5) verwendet.

Tabelle 2.5: Verwendete Primer. Abkürzungen: Tm: engl. *melting temperature* (Anlagerungstemperatur der Primer)

Primer	Tm [°C]	Sequenz (5' → 3')	Erwartete Fragmentlänge bei
Exon 9 <i>short forward</i>	58,9	TTCCCTATAGTGTTGGGAGATCA	101 bp (<i>BRCA1</i> , Exon 9 <i>short</i>)
Exon 9 <i>short reverse</i>	54,7	CAAACCTTGCCATTACCCTTTT	
Exon 9 <i>long forward</i>	55,3	CCACACCCAGCTACTGACCT	494 bp (<i>BRCA1</i> , Exon 9 <i>long</i>)
Exon9 <i>long reverse</i>	55,3	CTCTTCCAGCTGTTGCTCCT	
Exon 14 <i>short forward</i>	55,9	CGATGGTTTTCTCCTTCCATT	169 bp (<i>BRCA1</i> , Exon 14 <i>short</i>)
Exon 14 <i>short reverse</i>	55,3	TTGCTCCTCCACATCAACAA	
Exon 14 <i>long forward</i>	61,4	CCACACCCAGCTACTGACCT	419 bp (<i>BRCA1</i> , Exon 14 <i>long</i>)
Exon 14 <i>long reverse</i>	59,4	CTCTTCCAGCTGTTGCTCCT	

Für die *Quantitative Echtzeit-PCR* wurden folgende Primer (siehe Tab. 2.6) verwendet.

Tabelle 2.6: Verwendete Primer. Abkürzungen: IL-6: Interleukin 6, TLR-9: engl. *toll-like receptor 9*, CXCR4: engl. *C-X-C motif chemokine receptor type 4*, GAPDH: engl. *glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*, Tm: engl. *melting temperature* (Anlagerungstemperatur der Primer)

Primer	Tm [°C]	Sequenz (5' → 3')
<i>IL-6 reverse</i>	53,7	GCATTTGTGGTTGGGTCA
<i>IL-6 forward</i>	61,8	CCTTCGGTCCAGTTGCCTTCT
<i>TLR-9 reverse</i>	65,7	CGGGGTGCTGCCATGGAGAAG
<i>TLR-9 forward</i>	67,6	CGCCCTGCACCCGCTGTCTCT
<i>CXCR4 reverse</i>	59,4	CCAGAAGGGAAGCGTGATGA
<i>CXCR4 forward</i>	61,8	TGACGGACAAGTACAGGCTGC
<i>GAPDH reverse</i>	60,6	GGCTGTTGTCATACTTCTCATGG
<i>GAPDH forward</i>	59,8	GGAGCGAGATCCCTCCAAAAT

2.1.5 Antikörper

Die verwendeten Antikörper mit den dazugehörigen Herstellern und verwendeten Verdünnungen sind in der Tab. 2.7 aufgelistet. Die im Western Blot verwendeten Antikörper wurden in *Odyssey Blocking Buffer* (Li-Cor, Nebraska, USA) angesetzt. Für die Immunfluoreszenz wurden die Antikörper in *Waschlösung 1* angesetzt (siehe Tab. 2.22).

Tabelle 2.7: Verwendete Erstantikörper für die Detektion im Western Blot. Abkürzungen: ALDH1A1: engl. *aldehyde dehydrogenase 1A1*, CHK1: engl. *checkpoint kinase 1*, FANCD2: engl. *fanconi anemia group D2*, HSC70: engl. *heat shock 70*, RAD51: engl. *radiation 51*, ZEB1: engl. *Zinc finger E-box homeobox 1*

Antikörper	Hersteller	Nummer	Verdünnung
Anti-ALDH1A1 (A-6), Maus, monoklonal	Santa Cruz Biotechn., Heidelberg	#sc398578	1:1000 4 °C über Nacht
Anti-CHK1 (2G1D5), Maus, monoklonal	CellSignalling Techn. [®] , Denver, USA	#2360	1:750 4 °C über Nacht
Anti-E-Cadherin (H-108), Maus, monoklonal	Santa Cruz Biotechn., Heidelberg	#sc8426	1:1000 4 °C über Nacht
Anti-FANCD2 (FI17), Maus, monoklonal	Santa Cruz Biotechn., Heidelberg	#sc20022	1:2000 4 °C über Nacht
Anti-HSC70, Maus, monoklonal	Santa Cruz Biotechn., Heidelberg	#sc7298	1:1000 4 °C über Nacht
Anti-RAD51(AB-1), Kanninchen, polyklonal	Merck, Darmstadt	#PC130	1:1000 4 °C über Nacht
Anti-ZEB1, Kanninchen, polyklonal	Bethyl, Montgomery, Texas, USA	#A301-922A	1:2000 4 °C über Nacht

Tabelle 2.8: Verwendete Zweitantikörper für die Detektion im Western Blot. Abkürzungen: RT: Raumtemperatur

Antikörper	Hersteller	Nummer	Verdünnung
IR-Dye®800CW Goat-Anti-Mouse IgG, Maus, monoklonal	LI-COR, Nebraska, USA	#926-32210	1:7500 1 h bei RT
IR-Dye®680RD Goat-Anti-Mouse IgG, Maus, polyklonal	LI-COR, Nebraska, USA	#926-68070	1:7500 1 h bei RT
IR-Dye®680RD Goat-Anti-Rabbit IgG, Känninchen, polyklonal	LI-COR, Nebraska, USA	#926-68070	1:7500 1 h bei RT

Tabelle 2.9: Verwendete Erstantikörper für die Immunfluoreszenz (RAD51, γ H2AX). Abkürzungen: RAD51: engl. *radiation 51*, γ H2AX (engl. *phosphorylated (γ) H2A histone family member X*)

Antikörper	Hersteller	Nummer	Verdünnung
Anti-RAD51(AB-1) Känninchen, polyklonal	Merck, Darmstadt	#PC130-100UL	1:1000 4 °C über Nacht
Anti- γ H2AX (Ser139) Maus, monoklonal	Merck, Darmstadt	#05-636	1:2000 4 °C über Nacht

Tabelle 2.10: Verwendete Zweitantikörper für die Immunfluoreszenz (RAD51, γ H2AX). Abkürzungen: RAD51: engl. *radiation 51*, γ H2AX: engl. *phosphorylated (γ) H2A histone family member X*, RT: Raumtemperatur

Antikörper	Hersteller	Nummer	Verdünnung
Alexa Fluor®488, Goat anti-Rabbit IgG (H+L), Ziege, polyklonal	Thermo Fischer Scientific, Schwerte	#A32723	1:500 1 h bei RT
Alexa Fluor®647, Goat anti-Mouse IgG (H+L), Ziege, polyklonal	Thermo Fischer Scientific, Schwerte	#A32728	1:600 1 h bei RT

Tabelle 2.11: Verwendete Erstantikörper für die Immunfluoreszenz (cytosolische dsDNA, COX IV). Abkürzungen: COX IV: engl. *cytochrome c oxidase 4*, RT: Raumtemperatur

Antikörper	Hersteller	Nummer	Verdünnung
Anti-dsDNA (Klon AE-2) Maus, monoklonal	Merck-Millipore, Darmstadt	#MAB1293	1:100 4 °C über Nacht
Anti-COX IV (mitochondrial loading control) Känninchen, polyklonal	Abcam, Cambridge, UK	#AB 16056	1:200 1 h bei RT

Tabelle 2.12: Verwendete Zweitantikörper für die Immunfluoreszenz (cytosolische dsDNA, COX IV).
Abkürzungen: RT: Raumtemperatur

Antikörper	Hersteller	Nummer	Verdünnung
Goat anti-Mouse IgG Antibody, Cy3 conjugate, Ziege, polyklonal	Merck-Millipore, Darmstadt	#AP124C	1:400 1 h bei RT
Alexa Fluor®488, Goat anti-Rabbit IgG (H+L), Ziege, polyklonal	Thermo Fischer Scientific, Schwerte	#A32723	1:200 1 h bei RT

2.1.6 Chemikalien

Tabelle 2.13: Chemikalien (verwendet am UKE in Hamburg)

Bezeichnung	Hersteller
<i>Agarose, For Routine Use</i>	Sigma-Aldrich, Steinheim, #A9539-500G
<i>Ampicillin sodium salt</i>	Sigma-Aldrich, Steinheim, #A0166-5G
<i>AmpliSize™ Molecular Ruler (50-2.000 bp) Ladder</i>	Bio-Rad Laboratories, München, #170-8200
Bakterien (<i>One Shot TOP10 E. coli</i>)	Thermo Fisher Scientific, USA
<i>Bovine Serum Albumin (BSA)</i>	Sigma-Aldrich, Steinheim, #A7030
<i>Coulter® Isoton® II Lösung</i>	Beckmann Coulter GmbH, Krefeld, #8448011
<i>Cytochalasin B from Drechslera dematioidea</i>	Sigma-Aldrich, Steinheim, #C6762
Diamidinophenylindole (DAPI)	Merck, Darmstadt, #124653100
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Steinheim, #D2650
Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Merck, Darmstadt, #106586
Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich, Steinheim, #43816
<i>DNase I recombinant, RNase-free</i>	Merck, Darmstadt, #4716728001
<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)</i>	Sigma-Aldrich, Steinheim, #10938025
Entellan	Merck, Darmstadt, #107960
Ethanol	Merck, Darmstadt, #100983
<i>Ethidium bromide solution</i>	Sigma-Aldrich, Steinheim, #E1510-10ML
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Serva, Heidelberg, #11280
Formaldehyd (37 % (wt/vol))	Merck, Darmstadt, #104002
Formamid (>99,0%) 2,5 L	VWR, Darmstadt, #24311.320
Giemsa's Azur-Eosin-Methylenblaulösung	Merck, Darmstadt, #109204
Glycerin	Roth, Karlsruhe, #3783
<i>Goat Serum</i>	Sigma-Aldrich, Steinheim, #G9023-10ML
Immersionsöl	Zeiss, Göttingen, #444969-0000-000
Isopropanol	Merck, Deutschland, # 928-4000
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt, #104936
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Merck, Darmstadt, #104873
Kanamycin	Sigma-Aldrich, Steinheim, #K4378
Kristallviolett	Merck, Darmstadt, #115940
Kupfer(II)-Sulfat-Lösung	Sigma-Aldrich, Steinheim, #C2284
<i>MACS® Bleach Solution 1000 ml</i>	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, #130-093-663

Bezeichnung	Hersteller
<i>MACSQuant® Calibration Beads 100 tests</i>	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, #130-093-607
<i>MACSQuant®Running Buffer 1500 ml</i>	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, #130-092-747
<i>MACSQuant®Storage Solution 1500 ml</i>	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, #130-092-748
<i>MACSQuant® Washing Solution 1500 ml</i>	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, #130-092-749
<i>MegaCell™ RPMI-1640 Medium</i>	Sigma-Aldrich, Steinheim, #M3817-500ML
β -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Steinheim, #M3148
Methanol	J.T.Bakker, Pleasant Prairie, #8045
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Sigma-Aldrich, Steinheim, #M8266
Mitomycin C (MMC)	Medac, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	Sigma-Aldrich, Steinheim, #S6150
Natriumhydroxid (NaOH)	Sigma-Aldrich, Steinheim, #S8045
<i>Novex™ MagicMark™ XP Western Protein Standard, ungefärbt</i>	Thermo Fischer Scientific, Schwerte, #LC5602
<i>Odyssey® Blocking Solution</i>	Li-COR, Nebraska, USA, #927-40000
Olaparib (AZD2281, Ku-0059436)	Selleckchem, München, #S1060
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS), 1 x	Thermo Fisher, USA
Propidiumiodid (PI)	Merck, Deutschland
Ribonuklease A (RNase A)	Serva, Heidelberg, #34388
Saponin	Sigma-Aldrich, Steinheim, #47036-50G-F
<i>SeeBlue® Plus2 Pre-stained Protein Standard</i>	Life Technologies, Carlsbad, USA, #LC5925
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Sigma-Aldrich, Steinheim, #L4509
Tris-Base	Sigma-Aldrich, Steinheim, #T1503
Tris-Borat-EDTA	Sigma-Aldrich, Steinheim, #93290
Tris-EDTA	Sigma-Aldrich, Steinheim, #T9285
Tris-HCl	Sigma-Aldrich, Steinheim, #T3253
Triton X-100	Sigma-Aldrich, Steinheim, #T8787
Trypsin-EDTA, 0,05 %	Life Technologies, Carlsbad, USA, #25300054
<i>Tween®20</i>	Sigma-Aldrich, Steinheim, #P1379
<i>UltraPure™ Distilled Water</i>	Life Technologies, Carlsbad, USA, #10977
<i>Vectashield® Mounting Medium</i>	Vector Laboratories, Burlingame, USA, #H-1000

Tabelle 2.14: Chemikalien (verwendet am FLI in Jena)

Bezeichnung	Hersteller
Ampicillin-Natrium-Salz	Carl Roth, Karlsruhe
Bacto Agar	Difco Laboratories, Detroit, MI, USA
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Carl Roth, Karlsruhe
Ethanol	Carl Roth, Karlsruhe
Isopropanol	Carl Roth, Karlsruhe
2xYT-Medium (Yeast / Trypton-Medium)	Sigma-Aldrich, Steinheim

2.1.7 Puffer und Lösungen

Tabelle 2.15: Fertige Lösungen (verwendet am FLI in Jena)

Bezeichnung	Hersteller
Elektroporationslösung <i>Ingenio</i> TM	Mirus Bio LLC, Madison, WI, USA
T4-Ligase-Reaktionspuffer (10x)	Thermo Scientific, Rockford, IL, USA

Tabelle 2.16: Medien für die Kultivierung von Bakterien (verwendet am FLI in Jena)

Substanz	Zusammensetzung
LB-Agar <i>Lysogeny broth</i>	20 g/l Agar, 5 g/l Hefeextrakt, 5 g/l NaCl, 10 g/l Trypton, pH 7,4 (autoklaviert für 20 min bei 121 °C)
LB-Medium <i>Lysogeny broth</i>	5 g/l Hefeextrakt, 5 g/l NaCl, 10 g/l Trypton, pH 7,4 (autoklaviert für 20 min bei 121 °C)
2YT-Medium <i>Yeast/Trypton</i>	10 g/l Hefeextrakt, 5 g/l NaCl, 16 g/l Trypton, pH 7 (autoklaviert für 20 min bei 121 °C)

Tabelle 2.17: Selektionsantibiotika für die Kultivierung von Bakterien (verwendet am FLI in Jena)

Antibiotikum	Stammlösung	Verwendete Konzentration
Ampicillin	100 mg/ml in ddH ₂ O	100 µg/ml

Tabelle 2.18: Medien und Lösungen für die Zellkultivierung (verwendet am FLI in Jena)

Substanz	Hersteller
<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> , ohne L-Glutamin und Natriumpyruvat, 4,5 g/l Glucose (DMEM)	PAN-Biotech, Aidenbach
<i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline</i> , 1 x (PBS)	PAA Laboratories, Cölbe
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Carl Roth, Karlsruhe
Fötale Kälberserum (FKS)	PAN-Biotech, Aidenbach
L-Glutamin (200 mM)	Lonza, Verviers, Belgien
Natriumpyruvat (100 mM)	PAN-Biotech, Aidenbach
Trypsin (2,5 %, 10x)	c.c.pro, Oberdorla

Tabelle 2.19: Zusammensetzung der Medien für die Zellkultivierung (verwendet am UKE in Hamburg)

Bezeichnung	Gehalt	Substanz
DMEM	10 %	FKS
	2 %	Glutamin
	100 U/ml	Penicillin (ggf.)
	100 µg/ml	Streptomycin (ggf.)
Kryomedium	90 %	FKS
	10 %	DMSO
1x PBS, pH 7,4	137 mM	NaCl
	10 mM	Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O
	2,7 mM	KCl
	2 mM	KH ₂ PO ₄
RPMI	10 %	FKS
	2 %	Glutamin
	100 U/ml	Penicillin (ggf.)
	100 µg/ml	Streptomycin (ggf.)

Tabelle 2.20: Puffer und Lösungen für die Agarose-Gelelektrophorese

Bezeichnung	Gehalt	Substanz
10 x TBE	27 g	Tris
	10,8 g	Borsäure
	1,9 g	EDTA
	ad 250 ml	bidest. Wasser

Tabelle 2.21: Puffer für Western Blot und Proteinextraktion

Bezeichnung	Gehalt	Substanz
Puffer A	20 mM	Hepes
	450 mM	NaCl
	50 mM	NaF
	0,2 mM	EDTA
	0,5 mM	DTT
	0,5 µg/ml	Leupeptin
	0,5 µg/ml	Pepstatin A
	1,0 µg/ml	Trypsin-Inhibitor
	0,5 µg/ml	Aproptinin
	40 µg/ml	Bestatin
	137 mM	NaCl
Phenylmethylsulfonylfluorid	200 mM	
5x Probenpuffer nach	50 mM	Tris-HCl, pH 6,8
Laemmli	100 mM	DTT
	2 %	SDS
	0,1 %	Bromphenolblau
Laufpuffer	10 %	10 x TG-Puffer
	10 %	SDS
SDS	10 %	
10 x Tris-Glycin (TG)-Puffer	1,92 M	Glycin
	250 mM	Tris Base
	150 mM	NaCl
10 x TBS-T	TBS	
	0,05 %	<i>Tween20</i>
	10 %	TG-Puffer
1 x Transferpuffer	10 %	10 x TG-Puffer
	10 %	Methanol

Tabelle 2.22: Lösungen für die Zellzyklus-Analyse (DNA-Gehalt)

Bezeichnung	Gehalt	Substanz
Propidiumiodid-Färbelösung	10 µg/ml	PI-Lösung
	1 %	RNase
	0,1 %	Triton X-1000

Tabelle 2.23: Puffer und Lösungen für die Immunfluoreszenz (RAD51, γ H2AX)

Bezeichnung	Gehalt	Substanz
Blockierungslösung	1 x	PBS
	3 %	BSA
Fixierungslösung	1 x	PBS
	4 %	PFA

Bezeichnung	Gehalt	Substanz
1 x PB-Puffer	100 mM	100 mM KAc
	30 mM	KCl
	10 mM	Na ₂ HPO ₄
	1 mM	MgCl ₂
PB-DTT	1 x	PB-Puffer
	1 mM	DTT
PB-T	1 x	PB-Puffer
	0,5 %	<i>Tween 20</i>
Waschlösung 1	1 x	PBS
	1,5 %	BSA
	0,1 %	<i>Tween 20</i>
Waschlösung 2	1 x	PBS
	0,5 %	<i>Tween 20</i>

Tabelle 2.24: Puffer und Lösungen für die Immunfluoreszenz (cytosolische dsDNA, COX VI)

Bezeichnung	Gehalt	Substanz
Lösung für Antikörper	1 x	PBS
	1 %	BSA
	2 %	<i>Goat serum</i>
	0,1 %	Saponin
Blockierungslösung	1 x	PBS
	1 %	BSA
	2 %	<i>Goat serum</i>
Fixierungslösung	1 x	PBS
	4 %	PFA
1 x PBT	1 x	PBS
	0,1 %	<i>Tween 20</i>
Triton-X in PBS	1 x	PBS
	0,2 %	Triton-X
50 % Formamid	1 x	PBS
	50 %	Formamid
1 x TBS	1 x	TBS

Tabelle 2.25: Puffer und Lösungen für den Mikrokern-Nachweis

Bezeichnung	Gehalt	Substanz
4 % Giemsa-Lösung	1 x	PBS
	4 %	Giemsa's Azur-Eosin-Methylenblaulösung

Tabelle 2.26: Puffer und Lösungen für den Kolonietest

Bezeichnung	Gehalt	Substanz
Fixierlösung	70 %	Ethanol
Färbelösung	0,1 % (in H ₂ O)	Kristallviolett

2.1.8 Enzyme

Tabelle 2.27: Verwendete Enzyme (verwendet am UKE in Hamburg)

Bezeichnung	Hersteller
T4-DNA-Ligase	Thermo Scientific, Rockford, IL, USA

Tabelle 2.28: Verwendete Enzyme (verwendet am FLI in Jena)

Bezeichnung	Hersteller
I-SceI Restriktionsenzym	New England BioLabs, USA

2.1.9 Bakterienstämme

Tabelle 2.29: Verwendete Bakterienstämme (verwendet am FLI in Jena)

Bezeichnung	Eigenschaften
<i>Escherichia coli</i> DH5 α	F ⁻ , endA1, recA ⁻ , gyrA96, hsdR

2.1.10 Kits

Tabelle 2.30: Inhalt vom *GeneJET Plasmid Mini Prep Kit*: 250 Reinigungen, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA, #K0503 (verwendet am FLI in Jena)

Bezeichnung	Volumen bzw. Menge
<i>Resuspension Solution</i>	70 ml
<i>Lysis Solution</i>	70 ml
<i>Neutralization Solution</i>	100 ml
<i>Wash Solution (concentrated)</i>	100 ml
RNase A (10 mg/ml)	0.7 ml
<i>Elution Buffer</i> (10 mM Tris-HCl, pH 8.5)	30 ml
<i>GeneJET Spin Columns</i>	250 Stück
<i>Collection Tubes</i> (2 ml)	250 Stück

Tabelle 2.31: Inhalt vom *Plasmid Miniprep Kit 1, peqGOLD*: 50 Reinigungen, VWR international, Pennsylvania, USA, #12-6945-01

Bezeichnung	Volumen bzw. Menge
<i>Perfect Bind DNA Columns</i>	50 Stück
<i>2,0 ml Collection Tubes</i>	50 Stück

Bezeichnung	Volumen bzw. Menge
<i>Solution I</i>	30 ml
<i>Solution II</i>	30 ml
<i>Solution III</i>	40 ml
<i>PW Plasmid Buffer</i>	30 ml
<i>DNA Wash Buffer (concentrated)</i>	40 ml
<i>RNase A</i>	100 µl
<i>Elution Buffer (10 mM Tris-HCl, pH 9.0)</i>	15 ml

Tabelle 2.32: Inhalt vom GeneJET Plasmid Maxiprep Kit: 25 Reinigungen, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA, #K0492 (verwendet am FLI in Jena)

Bezeichnung	Volumen bzw. Menge
<i>Resuspension Solution</i>	180 ml
<i>Lysis Solution</i>	180 ml
<i>Neutralization Solution</i>	180 ml
<i>Endotoxin Binding Reagent</i>	24 ml
<i>Wash Solution I (concentrated)</i>	180 ml
<i>Wash Solution II (concentrated)</i>	180 ml
<i>RNase A Solution</i>	6 x 1.2 ml
<i>Elution Buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.5)</i>	45 ml
<i>GeneJET Maxi Purification Columns pre-assembled with collection tubes (50 ml)</i>	25 Stück
<i>Collection tubes (50 ml)</i>	25 Stück

Tabelle 2.33: Inhalt vom QIAGEN Plasmid Plus Maxi Kit (25): Qiagen, Venlo, Niederlande, #12963

Bezeichnung	Volumen bzw. Menge
<i>QIAGEN Plasmid Plus Spin Columns</i>	25 Stück
<i>QIAfilter Maxi Cartridges</i>	25 Stück
<i>Caps for QIAfilter</i>	25 Stück
<i>Tube Extenders (20 ml)</i>	25 Stück
<i>Collection Tubes (2 ml)</i>	25 Stück
<i>Buffer P1</i>	250 ml
<i>Buffer P2</i>	250 ml
<i>Buffer S3</i>	3 x 70 ml
<i>Buffer ETR</i>	25 ml
<i>Buffer BB</i>	2 x 70 ml
<i>Buffer PE (concentrate)</i>	6 ml
<i>Buffer EB</i>	15 ml
<i>RNase A</i>	25 mg
<i>LyseBlue</i>	250 µl

Tabelle 2.34: Inhalt vom Applied Biosystems™ Big Dye™ Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit: Applied Biosystems™, Foster City, Kalifornien, USA #15869786

Bezeichnung	Volumen bzw. Menge
<i>BigDye®Terminator v1.1 Ready Reaction Mix</i>	200 µl
<i>M13 (-21) Primer</i>	1 Tube
<i>pGEM Control DNA</i>	1 Tube
<i>5 x Sequencing Buffer</i>	1 Tube

Tabelle 2.35: Inhalt vom DNeasy Blood & Tissue Kit (50): Qiagen, Venlo, Niederlande, #69504

Bezeichnung	Volumen bzw. Menge
<i>DNeasy Mini Spin Columns (colorless) in 2 ml</i>	50 Stück
<i>Collection Tubes (2ml)</i>	100 Stück
<i>Buffer ATL</i>	10 ml
<i>Buffer AL</i>	12 ml
<i>Buffer AW1 (concentrate)</i>	19 ml
<i>Buffer AW2 (concentrate)</i>	13 ml
<i>Buffer AE</i>	22 ml
<i>Proteinase K</i>	1,25 ml

Tabelle 2.36: Inhalt vom High-Performance GoTaq® G2 DNA Polymerase with Mg-Free Buffer System: Promega, Fitchburg, USA, #M7806

Bezeichnung	Volumen bzw. Menge
MgCl ₂	15 x 1,2 ml
<i>GoTaq®G2 Flexi DNA Polymerase</i>	5 x 500 U
<i>5 X Colorless GoTaq®Flexi Buffer</i>	20 x 1 ml
<i>5 X Green GoTaq®Flexi Buffer</i>	20 x 1 ml

Tabelle 2.37: Inhalt vom dNTP Mix, PCR Grade: 10 mM each, 1 x 200 µl, Qiagen, Venlo, Niederlande, #201900. Abkürzungen: dATP: engl. *deoxyadenosine triphosphate*; dCTP: engl. *deoxycytosine triphosphate*; dGTP: engl. *deoxyguanosine triphosphate*; dTTP: engl. *deoxythymidine triphosphate*

Bezeichnung	Volumen
<i>Mix containing 10 mM each of dATP, dCTP,</i>	1 x 200 µl

Tabelle 2.38: Inhalt vom Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System: Promega, Fitchburg, USA, #A9282

Bezeichnung	Volumen bzw. Menge
<i>Membrane Binding Solution</i>	100 ml
<i>Membrane Wash Solution (concentrated)</i>	75 ml
<i>Nuclease-free Water</i>	13 ml
<i>Wizard®SV Minicolumns</i>	250 Stück
<i>Collection Tubes (2 ml)</i>	250 Stück

Tabelle 2.39: Inhalt vom Click-iT®EdU imaging Kit: Life-Technologies, Carlsbad, USA, #C10340. Abkürzungen: EdU: engl.: 5-ethynyl-2'-deoxyuridine

Bezeichnung	Volumen bzw. Menge
<i>EdU</i>	5 mg
<i>Alexafluor® Azide 594</i>	1 Ampulle
<i>DMSO</i>	4 ml
<i>Click-iT® Edu-reaction buffer</i>	4 ml
<i>CuSO₄</i>	1 Ampulle
<i>Click-iT® Edu buffer additive</i>	400 mg

Tabelle 2.40: Inhalt vom ALDEFLUOR™-Kit: STEMCELL Technologies SARL, Grenoble, Frankreich, #01700

Bezeichnung	Volumen bzw. Menge
<i>Dry ALDEFLUOR™ Reagent</i>	50 µg
<i>DEAB-Reagent</i>	1 ml
<i>HCl</i>	1,5 ml
<i>DMSO</i>	1,5 ml
<i>ALDEFLUOR™-Assay Buffer</i>	4 x 25 ml

Tabelle 2.41: Inhalt vom NE-PER™ Extraction Kit: Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA, #78833

Bezeichnung	Volumen
<i>Cytoplasmic Extraction Reagent I (CER I)</i>	10 ml
<i>Cytoplasmic Extraction Reagent II (CER II)</i>	550 µl
<i>Nuclear Extraction Reagent (NER)</i>	5 ml

Tabelle 2.42: Inhalt vom Quant-iT™ PicoGreen™ dsDNA Assay-Kit: Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA, #P11496

Bezeichnung	Volumen
<i>Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA reagent</i>	1 ml
<i>20 x TE (Component B)</i>	25 ml
<i>Lambda DNA standard (Component C)</i>	1 ml

Tabelle 2.43: Inhalt vom RNeasy Mini Kit (250): Qiagen, Venlo, Niederlande, #74106

Bezeichnung	Volumen bzw. Menge
<i>RNeasy Mini Spin Columns (pink)</i>	250 Stück
<i>Collection Tubes (1,5 ml)</i>	250 Stück
<i>Collection Tubes (2 ml)</i>	250 Stück
<i>Buffer RLT</i>	220 ml
<i>Buffer RW1</i>	220 ml
<i>Buffer RPE (concentrate)</i>	55 ml
<i>RNase-Free Water</i>	50 ml

Tabelle 2.44: Inhalt vom *Quanti[®]Tect Reverse Transcription Kit (200)*: Qiagen, Venlo, Niederlande, #205313

Bezeichnung	Volumen bzw. Menge
<i>gDNA Wipeout Buffer, 7 x</i>	4 x 100 µl
<i>Quantiscript[®]Reverse Transcriptase</i>	4 x 50 µl
<i>Quantiscript RT Buffer, 5 x</i>	4 x 200 µl
<i>RT Primer Mix</i>	4 x 50 µl
<i>RNase-free Water</i>	4 x 1,9 ml

Tabelle 2.45: Inhalt vom *AccuPower[®]2xGreenStar[™]qPCR Master Mix*: Bioneer, Korea, #K-6251

Bezeichnung	Volumen bzw. Menge
<i>2 x Master Mix</i>	4 x 0,625 ml
<i>DEPC-D.W.</i>	1 x 1,2 ml
<i>ROX dye (80 x)</i>	1 x 0,6 ml

2.1.11 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2.46: Verbrauchsmaterialien (verwendet am FLI in Jena)

Bezeichnung	Hersteller
Durchflusszytometrie-Röhrchen (5 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Einmalspritzen (5 ml, 2 ml)	Braun, Melsungen
Küvetten <i>Ingenio[™]</i> (0,2 cm)	Mirus Bio LLC, Madison, WI, USA
Multilochplatten (6 well)	Becton Dickenson, Heidelberg
Multilochplatten (24 bzw. 96 well)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Pasteurpipetten (Glas, 2 ml)	Carl Roth, Karlsruhe
Pipettenspitzen	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Pipettenspitzen <i>Multi Flex</i> (0,5 – 200 µl)	Carl Roth, Karlsruhe
Reaktionsgefäße (0,2 ml)	Brand, Wertheim
Reaktionsgefäße (1,5 ml und 2 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Reaktionsröhrchen (15 ml und 50 ml; Falcon)	Becton Dickenson, Heidelberg
Serologische Pipetten (2 ml, 50 ml; Falcon)	Becton Dickenson, Heidelberg
Serologische Pipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Zellkulturflaschen (25 cm ² , 75 cm ²)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Zellzählkammern <i>SD100 Nexcelom</i>	Bioscience, Lawrence, MA, USA

Tabelle 2.47: Verbrauchsmaterialien (verwendet am UKE in Hamburg)

Bezeichnung	Hersteller
<i>Black 96 well plate</i>	Phenix Research Products Inc., Kalifornien, USA, #MPG-655076
<i>Boyden Chamber</i>	Thermo Fisher, USA, #140656
<i>Criterion™ Precast Tris-HCl Gel, 4-15 %</i>	Bio-Rad Laboratories, München, #345-0028
Deckgläschen, 15 mm	Roth, Karlsruhe, #P232.1
Erlenmeyerkolben 2000 ml WH	Roth, Karlsruhe, #X742.2
Erlenmeyerkolben 1000 ml WH	Roth, Karlsruhe, #X741.2
Filterpapier <i>Criterion™ Blotter</i>	Bio-Rad Laboratories, München, #170-4085
Handschuhe, <i>Micro-Touch® Nitra-Tex® Size Small</i>	Ansell, Yarra City, Australien, #700112
Kulturflasche T-25	Sarstedt, Nümbrecht, #83.3910
Kulturflasche T-75	Sarstedt, Nümbrecht, #83.3911
Messzylinder, 250 ml	Roth, Karlsruhe, #K259.2
Messzylinder, 500 ml	Roth, Karlsruhe, #K260.2
Objektträger Superfrost	Roth, Karlsruhe, #1880.1
Odyssey Nitrozellulose Membran	LI-COR, Nebraska, USA, #926-31092
Pipette serolog., 1 ml steril	Sarstedt, Nümbrecht, #86.1251.001
Pipette serolog., 2 ml steril	Sarstedt, Nümbrecht, #86.1252.001
Pipette serolog., 5 ml steril	Sarstedt, Nümbrecht, #86.1253.001
Pipette serolog., 10 ml steril	Sarstedt, Nümbrecht, #86.1254.001
Pipette serolog., 25 ml steril	Sarstedt, Nümbrecht, #86.1685.001
Pipette serolog., 50 ml steril	Sarstedt, Nümbrecht, #86.1689.001
Pipettenspitzen, 0,5-20 µl	Eppendorf AG, Hamburg, #0030000.854
Pipettenspitzen, 50-1000 µl	Eppendorf AG, Hamburg, #0030000.919
Reaktionsgefäß 1,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht, #72.690.001
Reaktionsgefäß 15 ml	Sarstedt, Nümbrecht, #62.554.502
Reaktionsgefäß 50 ml	Sarstedt, Nümbrecht, #62.554.501
Realtime PCR-Platten (<i>Hard-Shell® PCR Plates, 96-well, thin-well</i>)	Bio-Rad Laboratories, München, #HSP9601
Realtime PCR-Platten-Folie (<i>Microseal®, B'seal™ Seals</i>)	Bio-Rad Laboratories, München, #MSB1001
Röhrchen 5 ml, 75 x 12 mm (<i>Flow Cytometry</i>)	Sarstedt, Nümbrecht, #55.1579
<i>Safeguard</i> , Filter Pipettenspitzen, 20 µl	PEQLAB Biotechnologie GmbH Biotechnik, Erlangen, #81-1020
<i>Safeguard</i> , Filter Pipettenspitzen, 200 µl	PEQLAB Biotechnologie GmbH Biotechnik, Erlangen, #81-1011
<i>Safeguard</i> , Filter Pipettenspitzen, 1000 µl	PEQLAB Biotechnologie GmbH Biotechnik, Erlangen, #81-050
<i>TipStack Pack</i> , 0,5-10 µl	Sarstedt, Nümbrecht, #70.113.600
<i>TipStack Pack</i> , 0,5-100 µl	Sarstedt, Nümbrecht, #70.760.451
Transferpipetten, 3,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht, #86.1171.001
<i>Uvette®</i> (220 - 1600 nm)	Eppendorf AG, Hamburg, # 952010051
Zellkulturplatte (6-well)	Sarstedt, Nümbrecht, #83.3920

Bezeichnung	Hersteller
Zellkulturplatte (12-well)	Sarstedt, Nümbrecht, #83.3921
Zellkulturplatte (24-well)	Sarstedt, Nümbrecht, #83.3922

2.1.12 Geräte

Tabelle 2.48: Geräte (verwendet am FLI in Jena)

Bezeichnung	Hersteller
Autoklav VE-150	Systemec, Wettengel
Bioanalyzer Aligent 2100	Agilent Technologies, Waldbronn
Brutschrank Kelvitron®t	Heraeus Instruments, Hanau
Durchflusszytometer FACS Aria	BD Bioscience, San Jose, USA
Eismaschine MF 36	Scotsman-FRIMONT S.P.A., Mailand, Italien
Elektroporationsgerät Nucleofector®II	Amaxa Biosystems, Gaithersburg, MD, USA
Flüssigkeits-Absaugsystem BVC 1	Vakuumbrand, Wertheim
Heizblock Thermomixer® comfort	Eppendorf, Hamburg
Kleinschüttler Vortex Genie 2	Scientific Industries, Bohemia, NY, USA
Pipettensatz Pipetman	Gilson, Middletown, WI, USA
Pipettierhilfe Pipetboy acu	Integra Biosciences, Zizers, Schweiz
Reinstwasseranlage Milli-Q®Advantage A10	Millipore, Schwalbach am Taunus
Schüttelinkubator Multitron 2	Infors, Bottmingen, Schweiz
Spark®Multimode Microplate Reader	Tecan Group AG, Männedorf, Schweiz
Spektrophotometer NanoDrop 1000	Thermo Scientific, Wilmigton, DE, USA
Sterilwerkbank NU-437-400E	Integra Biosciences, Fernwald
Thermocycler C1000TM	Bio-Rad, München
Tischzentrifuge 5415 C	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge Heraeus Fresco 21	Thermo Scientific, Wilmigton, DE, USA
Tischzentrifuge Sprout®Mini-Zentrifuge	Heathrow Scientific, Vernon Hills, IL, USA
Zellkultur-Inkubator MCO-18AIC	Sanyo, San Diego, CA, USA
Zellzähler Cellometer Auto T4	Nexcelom Bioscience, Lawrence, MA, USA
Zentrifuge 1LR	Heraeus Instruments, Hanau
Zentrifuge 3K15 Sigma	Laborzentrifugen, Osterode

Tabelle 2.49: Geräte (verwendet am UKE in Hamburg)

Bezeichnung	Hersteller
Accu-jet Pro	Brand, Deutschland
Autoklav	Mediatech, Norderstedt
Brutschrank (CO ₂ Inkubator)	SANYO Medical, Bad Nenndorf
Brutschrank Heracell 240	Heraeus, Deutschland
Blot-Kammer Criterion Precast	Bio-Rad, München
CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System	Bio-Rad, München
Coulter Counter Z2	Beckman Coulter, Krefeld
Durchflusszytometer (BD FACS Canto)	Becton Dickson, Biosciences, Franklin Lakes, NJ

Bezeichnung	Hersteller
Eismaschine <i>FM-120DE-50</i>	Hoshizaki Europe, Amsterdam
FACS Gerät <i>MACSQuant[®]X and MACSQuant</i>	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Fluoreszenzmikroskop <i>Axionvision Observer Z1</i>	Carl Zeiss, Microscopy GmbH, Göttingen
Gefrierschrank	Kryotec, Deutschland
Gelelektrophoresekammer <i>CriterionCell</i>	Bio-Rad, München
Heizblock <i>Thermostat 5320</i>	Eppendorf AG, Hamburg
Kamerasysteme	AxioCamMRm, Zeiss, Göttingen
Kolbenhubpipetten 0,5 - 10 µl	Eppendorf AG, Hamburg
Kolbenhubpipetten 10 - 100 µl	Eppendorf AG, Hamburg
Kolbenhubpipetten 100 - 1000 µl	Eppendorf AG, Hamburg
Konfokalmikroskop <i>Leica TCS SP8 X</i>	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar
Lichtmikroskop <i>ECHO, REB-01</i>	ECHO, #REB-01-0160, San Diego, USA
Magnetrührer	Ikameg Ret, IKA Labortechnik, Staufen
MediPan-Gerät <i>AKLIDES[®]</i>	MEDIPAN GmbH, Dahlewitz
<i>NanoDrop ONE^c</i>	Thermo Fischer Scientific, Massachusetts, USA
Netzgeräte	Consort E455, Fröbel Laborgeräte, Lindau
	Consort E802, Fröbel Laborgeräte, Lindau
pH-Meter	Beckman Coulter, Krefeld
Photometer (Bio-Photometer)	Eppendorf AG, Hamburg
Röntgenröhre <i>RS225</i>	Gulmay, Surrey, UK
Schüttler	Edmund Bühler, Johanna Otto GmbH,
	Mini-Shaker, Modell Kühner, Braun, Melsungen
	Polymax 1040, Heidolph, Schwabach
Sterile Werkbank <i>HeraSafe</i>	Heraeus, Hanau
Thermocycler <i>Primus 25 advanced[®] Thermocycler</i>	Peqlab, VWR, Pennsylvania, USA
Vakuumpumpe	Oerlikon LeyboldVacuum, Pfäffikon, CH
Vortexer <i>Vortex-Genie[®] 2</i>	Scientific Industries, Bohemia, USA
Waagen	P1200, Mettler Toledo, Giessen
	AE160, Mettler Toledo, Giessen
	New Classic MS, Mettler Toledo, Giessen
Wärmeschrank	Memmert, Schwabach
Wasserbäder	Haake W19/D3, Karlsruhe
	Lauda, Lauda-Königshofen
Zentrifugen	Biofuge 15 R, Heraeus, Hanau
	Labofuge 400 R, Heraeus, Hanau
	Microfuge R, BeckmanCoulter, Krefeld
	Megafuge 1.0R, Heraeus, Hanau

2.1.13 Software

Tabelle 2.50: Eingesetzte Software (verwendet am FLI in Jena)

Software	Hersteller
<i>Cellometer Auto X4 software</i>	Nexcelom Bioscience, Lawrence, MA, USA
<i>Chromas Lite 2.01</i>	Technelysium, South Brisbane, Australien
<i>NanoDrop 1000 3.7.0</i>	PEQLAB Biotechnologie, Erlangen

Tabelle 2.51: Eingesetzte Software (verwendet am UKE in Hamburg)

Software	Hersteller
<i>Aklides Nuk 10160418</i>	MEDIPAN GmbH, Dahlewitz
<i>Axio-Vision Rel. 4.7</i>	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Göttingen
<i>BD FACS DIVA™ Software 6.1.2.</i>	Becton Dickson Biosciences, Franklin Lakes, NJ
<i>CFX Manager™ Software #1845000</i>	Bio-Rad, München
<i>FlowLogic™, Flow Cytometry Analysis Software</i>	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
<i>GraphPadPrism 6 bzw. 8</i>	GraphPad Software Inc, CA, San Diego
<i>Image J</i>	Wayne Rasband
<i>Imaris x64 7.6.1.</i>	Oxford Instruments, Abingdon, England
<i>ModFit LTTM Software 3.2.</i>	Verity Software House, Inc.
<i>Odyssey® Infrared Imaging System</i>	LI-COR, Nebraska, USA

2.2 Methoden

Die nachfolgend beschriebenen Methoden wurden teilweise im Leibniz-Institut für Alternsforschung - Fritz-Lipmann-Institut (FLI) in Jena, teilweise im Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf (UKE) in Hamburg durchgeführt.

2.2.1 Generierung von MCF7 Zellen mit CRISPR/Cas9-veränderten *BRCA1* Allelen

Für die Herstellung von MCF7-Zellen mit stufenweise reduzierter *BRCA1* Expression wurde wie nachfolgend beschrieben vorgegangen. Es wurde die humane Mammakarzinomzelllinie *MCF7* verwendet, welche drei Genkopien (Allele) von *BRCA1* trägt. Um MCF7-Klone mit unterschiedlicher Anzahl ausgeschalteter *BRCA1* Allele zu erhalten, wurden zunächst geeignete *single guide RNAs* gegen Exon 9 und Exon 14 des *BRCA1* Gens entwickelt. Nach Klonierung geeigneter *guide*-Sequenzen in den Cas9-Vektor (Ligation), erfolgte die Transfektion in MCF7 Zellen (siehe *Transfektion von humanen Zellen durch Elektroporation (FLI, Jena)*). Eine erfolgreiche Einbringung des Vektors in die Zellen konnte über die Expression von GFP (engl. *green fluorescent protein*) überprüft werden. Daraufhin wurden GFP-positive MCF7 Zellen mithilfe eines Durchflusszytometers (FACS, engl. *fluorescence-activated cell sorting*) vereinzelt und sortiert (siehe Abschnitt *Durchflusszytometrie (FLI, Jena)*). Als Einzelzell-Kolonien wurden die GFP-positiven MCF7 Zellen in einer Vertiefung einer 96-Lochplatte kultiviert, expandiert und auf eine erfolgreiche Modifikation in einer primären Analyse in der PCR (engl. *polymerase chain reaction*) bzw. im *Bioanalyzer* untersucht.

Entwicklung von sgRNAs gegen Exon 9 bzw. Exon 14 des *BRCA1* Gens (FLI, Jena)

Mithilfe des Online-Tools *crispr.mit.edu* wurden *single guide RNAs* (sgRNAs) gegen Exon 9 bzw. Exon 14 von *BRCA1* ermittelt (siehe Tab. 2.4).

Ligation (FLI, Jena)

Die Ligation der Oligonukleotide (sgRNAs, siehe Tab. 2.4) mit einem aufbereiteten, linearisierten Vektor (zur Verfügung gestellt von Isabell Vetterlein, siehe Tab. 2.3) erfolgte mithilfe der T4-DNA-Ligase im dazugehörigen Ligasepuffer bei 16 °C über Nacht (siehe Tab. 2.52).

Tabelle 2.52: Zusammensetzung eines einfachen Ligationsansatzes

Reagenz	Volumen bzw. Menge
Linearisierter Vektor	0,1 µg
Oligonukleotid	1 µg
T4-Ligasepuffer (10 x)	2 µl
T4-Ligase	2 µl (5 U)
ddH ₂ O	Auf 20 µl auffüllen

Transformation (FLI, Jena)

Das Plasmid mit ligierter sgRNA wurde über *E. coli* Bakterien des Stammes DH5α (siehe Tab. 2.29) vermehrt. Das Konstrukt wurde hierbei durch Hitzeschock in die bereits chemisch

kompetenten *E. coli* Bakterien eingebracht. Je Ansatz wurde dafür ein Aliquot von 100 µl kompetenter DH5α (Lagerung bei – 80 °C) langsam auf Eis aufgetaut und vorsichtig mit 5 µl des Ligationsansatzes (siehe Tabelle 2.52) gemischt. Es folgte eine 30-minütige Inkubation auf Eis, anschließend der Hitzeschock für 2 min bei 42 °C. Die Transformationsansätze wurden danach für 5 min auf Eis gelagert, bevor sie in 600 µl vorgewärmten 2 x TY-Medium für 1 h bei 37 °C schüttelnd inkubiert wurden. Daraufhin wurde der Transformationsansatz auf LB-Agarplatten mit Ampicillin als Selektionsantibiotikum ausplattiert und die Bakterienkulturen über Nacht bei 37 °C im Inkubator kultiviert.

Anzucht von Bakterienkulturen (FLI, Jena)

Die transformierten DH5α-Bakterienkulturen wurden auf LB-Agar-Platten mit Ampicillin ausplattiert und über Nacht bei 37 °C im Inkubator kultiviert. In der Mini-Präparation sollte die Ligation auf ihren Erfolg überprüft werden. Dazu wurden Einzelkolonien ausgewählt und in 4 ml LB-Medium mit Ampicillin in ein steriles 15 ml Falcon-Röhrchen übertragen. Diese wurden bei 170 rpm im Schüttelinkubator über Nacht bei 37 °C inkubiert. Für die Vermehrung und spätere Reinigung in der Maxi-Präparation wurden auf gleiche Weise vorgegangen.

Analytische Mini-Präparation des Plasmids plus ligierter sgRNA (FLI, Jena)

Für die Analyse kleinerer Mengen von Plasmid-DNA wurde diese über eine Mini-Präparation unter Verwendung des *GeneJET Plasmid Mini Prep Kits* (siehe Tab. 2.30) extrahiert. Dafür wurden von einer Übernacht-Schüttelkultur 4 ml verwendet und diese schrittweise in einem 2 ml-Reaktionsgefäß zentrifugiert bei $>16.000 \times g$ für 1 min bei 4 °C und der Überstand verworfen. Danach wurde das Pellet in 250 µl *Resuspension Solution* gelöst und resuspendiert. Die Zellen wurden lysiert über die Zugabe von 250 µl *Lysis Solution* und vorsichtigem Invertieren. Anschließend wurden zu der Probe 250 µl *Neutralisationspuffer* gegeben, dieses gemischt und für 2 bis 5 min bei RT inkubiert. Nun folgte ein Zentrifugationsschritt bei $>18.000 \times g$ für 10 min bei 18 °C. Nach Überführung des Überstands in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß, wurde dieser mit 800 µl Ethanol (99 %, reinst.) gemischt und für 20 min bei –20 °C inkubiert. Das DNA-Pellet wurde bei $>18.000 \times g$ für 10 min bei 18 °C zentrifugiert und der Überstand entfernt, um die DNA zu präzipitieren. Das DNA-Pellet wurde anschließend mit 200 µl 75 % Ethanol gewaschen und erneut bei $>18.000 \times g$ für 2 bis 3 min bei 18 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und die DNA bei RT an der Luft getrocknet, danach in 20 µl ddH₂O aufgenommen und bis zur Analyse bei –20 °C gelagert.

Aufreinigung von DNA durch Isopropanol- oder Ethanol-Präzipitation

Für die Verwendung der präparierten DNA-Fragmente aus dem vorherigen Abschnitt für eine Sequenzierung oder Transfektion in humane Zellen, war ein hoher Reinheitsgrad der Nukleinsäuren erforderlich. Daher wurden Rückstände von Salz oder Puffer entfernt, indem die in Lösung befindliche DNA ausgefällt wurde. Die DNA-Probe (erhalten aus der Mini-Präparation) wurde mit 25 µl eiskaltem 96 % Ethanol versetzt. Anschließend folgte ein Zentrifugationsschritt bei 14.000 rpm für 40 min bei 4 °C, der Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde in 50 µl 80 % Ethanol resuspendiert. Nun wurde die DNA-Probe bei

14.000 rpm für 15 min bei 4 °C zentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Pellet getrocknet. Die gereinigten DNA-Fragmente wurden in 20 bis 50 µl ddH₂O aufgenommen und bis zur weiteren Analyse bei -20 °C gelagert.

Sequenzierung zur Bestätigung der Ligation (FLI, Jena)

Für die Bestätigung, dass die Ligation der sgRNA mit dem Vektor erfolgreich war, wurde dieses Konstrukt in der Sequenzierung nach Sanger überprüft.

DNA-Sequenzierung

Mithilfe der Sequenzierung über die *Didesoxy- oder Kettenabbruchmethode* nach Sanger [241] kann die exakte Abfolge der Nukleotide ermittelt werden. Zur Überprüfung der Ligation des Vektors *PX458* mit der entsprechenden sgRNA (gegen Exon 9 bzw. Exon 14 von *BRCA1*) wurde daher eine Sanger-Sequenzierung durchgeführt. Dazu wurden zuvor in der Masterarbeit von I. Vetterlein 2016 [242] optimale Sequenzierungsprimer konstruiert. Die Reaktionen für die Sequenzierung wurden unter Verwendung des *Big Dye Kits* angesetzt. Der dazugehörige Ansatz ist in Tab. 2.53 gezeigt, das im *Thermocycler C1000TM* verwendete Programm in Tab. 2.54.

Tabelle 2.53: Ansatz für Sequenzierung

Ansatz für Sequenzierung	Volumen
Plasmid-DNA (200 – 400 ng/µl)	1 µl
Sequenzierungspuffer	1,5 µl
Sequenzierungsprimer (10 µM)	0,5 µl
<i>BigDye</i> -Mix	1 µl
ddH ₂ O	6 µl

Tabelle 2.54: PCR-Programm für Sequenzierung

Schritt	Temperatur [°C]	Zeit [s]	Zyklus-Anzahl
1	95	300	1
2	95	30	25
	55	10	
	60	240	
3	12	> 0	1

Die in der Sequenzierungs-PCR erhaltenen Produkte wurden mit 30 µl eiskaltem 99 % Ethanol versetzt, gemischt und 20 min bei RT inkubiert. Die auf diese Weise ausgefällten DNA-Fragmente wurden bei >18.000 x *g* für mind. 25 min bei 18 °C zentrifugiert und dadurch präzipitiert, der Überstand wurde verworfen. Der entstandene Niederschlag wurde mit 100 µl 75 % Ethanol gewaschen, bei >18.000 x *g* für 5 bis 6 min bei 18 °C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Im Anschluss wurden die Proben unter Ausschluss von Licht bei RT getrocknet. Die Proben wurden in 20 µl ddH₂O aufgenommen und auf eine Platte für die

Sequenzierung gegeben. Die Sequenzierung erfolgte in der Abteilung *Genomanalyse* des FLI in Jena. Die erhaltenen Rohdaten wurden mithilfe des Programms *Chromas Lite 2.01* (Technelysium) gelesen und über die *BLAST-Analyse* (blastn) ausgewertet, indem die Sequenzen (Vektorsequenz und sgRNA gegen Exon 9 bzw. Exon 14) geprüft wurden.

Maxi-Präparation des Plasmids plus ligierter sgRNA (FLI, Jena)

Um größere Mengen Plasmid-DNA (hier des CRISPR-Cas9-Vektors *PX458* mit ligierter sgRNA gegen Exon 9 bzw. Exon 14 aus der vorangegangenen Mini-Präparation) für analytische Zwecke zu extrahieren, wurde eine Maxi-Präparation mit dem *GeneJET Plasmid Maxiprep Kit* (siehe Tab. 2.32) durchgeführt. Dazu wurden 250 ml einer Übernacht-Schüttelkultur $5.000 \times g$ für 10 min abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Anschließend wurde das Pellet in 6 ml *Resuspension Solution* aufgenommen. Der Zellaufschluss erfolgte nach Zugabe von 6 ml *Lysis Solution* durch vorsichtiges Invertieren (vier- bis sechsmal). Anschließend erfolgte ein Inkubationsschritt für 3 min bei RT. Nun wurde die Probe mit 6 ml *Neutralization Solution* versetzt und fünf- bis achtmal invertiert. Zur Probe wurden 0,8 ml *Endotoxin Binding Reagent* zugegeben, fünf- bis achtmal invertiert und für 5 min bei RT inkubiert. Dieser Ansatz wurde bei $4.000 - 5.000 \times g$ für 20 min bei RT zentrifugiert. Der Überstand wurde sauber und rückstandsfrei in ein neues 50 ml Reaktionsgefäß überführt, zu diesem wurde die gleiche Menge 96 % Ethanol gegeben und sofort fünf- bis sechsmal invertiert. Ein Teil der Probe (ca. 20 ml) wurden auf die *Column* übertragen, welche anschließend für 3 min bei $2.000 \times g$ zentrifugiert wurde, der Durchfluss wurde verworfen und die *Column* zurück in das *Collection tube* gegeben. Dieser Schritt wurde wiederholt. Daraufhin wurden 8 ml der *Wash Solution I* (zu welcher vorher Isopropanol hinzugegeben wurde) auf die *Column* gegeben. Es folgte eine Zentrifugation bei $3.000 \times g$ für 2 min, der Durchfluss wurde verworfen und die *Column* zurück in das *Collection tube* platziert. Nun wurden 8 ml der *Wash Solution II* (zu welcher vorher Ethanol hinzugegeben wurde) auf die *Column* gegeben. Anschließend wurde bei $3.000 \times g$ für 2 min zentrifugiert, der Durchfluss verworfen und die *Column* in das *Collection tube* platziert. Dieser Schritt (mit *Wash Solution II*) wurde wiederholt. Nun wurde bei $3.000 \times g$ für 5 min zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Die *Column* wurde in ein neues 50 ml *Collection tube* platziert und 1 ml des *Elution Buffer* auf die Membran in der *Column* gegeben, für 2 min bei RT inkubiert und bei $3.000 \times g$ für 5 min zentrifugiert, um die Plasmid-DNA zu eluieren. Optional konnte die Ausbeute der DNA um 20 bis 30 % gesteigert werden, indem ein zusätzlicher Eluierungs-Schritt erfolgte mit 0,5 ml. Die *Column* wurde verworfen und die gereinigte Plasmid-DNA bis zur weiteren Analyse bei $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ gelagert.

Kultivierung humaner Zellen (FLI, Jena und UKE, Hamburg)

Das Passagieren der humanen, adhärent wachsenden Mammakarzinomzelllinien (siehe Tab. 2.1 und Tab. 2.2) wurde unter einer sterilen Werkbank durchgeführt. Alle verwendeten Puffer und Lösungen wurden mit ddH₂O hergestellt und vor Gebrauch autoklaviert bzw. steril filtriert. Die Kultivierung der eingesetzten Zelllinien erfolgte in DMEM-Medium mit 10 % FKS, 2 % Glutamin und ggf. 1 % Penicillin-Streptomycin im Brutschrank bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$, 5 % CO₂-Atmosphäre und 100 % Luftfeuchtigkeit in Zellkulturflaschen. Für die Versuche und Analysen

wurden Zelllinien in den Passagen 10 bis 30 verwendet. Alle 3 bis 7 Tage wurden die Zellen passagiert. Hierzu wurde das Medium abgesaugt und der Zellrasen mit 1 x PBS zur Entfernung von Mediumsresten gespült. Anschließend wurde abhängig von der Größe der Zellkulturflasche (T-25 oder T-75), 1 ml oder 3 ml 0,25 %-ige Trypsinlösung auf die Zellen gegeben, um den Zellrasen abzulösen. Nach 2 bis 3 min Inkubation bei 37 °C wurden die Zellen in 5 ml (T-25) oder 10 ml (T-75) Medium resuspendiert. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mittels Zellzählgerät (*Coulter-Counter*[®]) in isotonischer Lösung (*Coulter-Beckman solution*[®]). Im Anschluss wurden die Zellen verdünnt in neue Zellkulturflaschen gegeben oder für Analysen verwendet. Für die Kryolagerung der Zellen in flüssigem Stickstoff und bei -196 °C wurde entsprechendes Kryomedium aus 90 % FKS und 10 % DMSO verwendet.

Transfektion von humanen Zellen durch Elektroporation (FLI, Jena)

Bei der Transfektion wird fremde DNA in eukaryotische Zellen eingebracht. Bei der transienten Transfektion wird die DNA nicht stabil, sondern lediglich vorübergehend ins Wirtsgenom integriert. Um die MCF7 Zellen zu transfizieren, wurden diese von ein bis drei Zellkulturflaschen mit 50 bis 70 % konfluenten Zellen durch Trypsin gelöst, in 7 ml serumhaltigen Medium resuspendiert und in einem 15 ml Falcon-Röhrchen überführt. Für die Bestimmung der Zellzahl wurden 20 µl der Zellsuspension auf eine Zählkammer (*Nexcelom*) aufgetragen und die Zellzahl mittels Zellzähler *Cellometer Auto X4* bestimmt. Nach Zentrifugation bei 200 x g für 5 min bei RT wurde das überstehende Kulturmedium abgenommen und das Zellpellet in PBS aufgenommen. Es wurden pro Transfektionsansatz 1 x 10⁶ Zellen verwendet. Das jeweilige Volumen an Zellsuspension wurde kalkuliert und in ein steriles 1,5 ml-Reaktionsgefäß pipettiert und bei 200 x g für 4 min bei RT zentrifugiert und das PBS entfernt. Die Zellen wurden nun in 100 µl Elektroporationslösung *Ingenio*TM aufgenommen und mit 2 µg Plasmid-DNA gemischt. Diese Suspension wurde unverzüglich in eine *Ingenio*TM-Küvette (0,2 cm; *Mirus*) überführt, in das Elektroporationsgerät *Amaxa* (*Biosystems*) eingesetzt und das entsprechende Programm für die MCF7-Zelllinie (nach Herstellerangaben von *Lonza*) gestartet. Danach wurde der gesamte Ansatz auf zwei Vertiefungen einer 6-Lochplatte mit je 2 ml Kulturmedium verteilt. Diese wurden für zwei Tage kultiviert, bevor sie in der Durchflusszytometrie sortiert wurden (siehe nächsten Abschnitt).

Durchflusszytometrie (FLI, Jena)

In der vorliegenden Arbeit wurde das Durchflusszytometer *FACS Aria*TM (BD Bioscience) der *FACS Core Facility* des FLI in Jena verwendet, um die CRISPR/Cas9-Genomeditierung (nach Transfektion von Cas9-Vektor mit ligierter sgRNA) der MCF7 Zellen nachzuweisen. Die GFP-positiven MCF7 Zellen wurden einzeln und unabhängig in die Vertiefungen einer 96-Lochplatte über die Durchflusszytometrie ausgesät (engl. *sorting*). Für die Vorbereitung der Durchflusszytometrie wurden die transfizierten Zellen nach 24-stündiger Expression geerntet, zweimal mit 1 x PBS gewaschen und in einem Medium aus 1 x PBS + max. 2 % FKS gelöst. Des Weiteren wurden pro Vertiefung einer 96-Lochplatte 200 µl Medium vorgelegt. Die anschließende experimentelle Durchführung sowie die Auswertung der FACS-Analyse und Sortierung der Zellen in die 96-Lochplatten wurden von Mitarbeitern der *FACS Core Facility*

des FLI in Jena durchgeführt.

Expansion der einzelnen MCF7-Klone

Zunächst wurden die einzelnen Zellen der 96-Lochplatten kultiviert und schrittweise auf größere Zellkulturgefäße expandiert: 24-Lochplatte, 12-Lochplatte und 6-Lochplatte, bevor diese in T-25-Zellkulturflaschen kultiviert wurden.

Primäres PCR-Analyse der MCF7-Klone mit veränderten *BRCA1* Allelen

Die Veränderungen (Genomeditorierung über CRISPR/Cas9) der *BRCA1* Allele in Exon 9 bzw. Exon 14 der MCF7-Klone wurden über eine primäre PCR-Analyse validiert und überprüft. Dazu wurde zunächst die genomische DNA isoliert und in der PCR unterschiedliche große Bereiche um die Cas9-Schnittstelle amplifiziert. Daher wurde ein langes Fragment (*long*) und ein kurzes Fragment (*short*) untersucht, um unterschiedlich große Modifikationen zu erfassen (siehe Tab. 2.5).

Isolierung genomischer DNA

Zunächst wurden 1×10^6 Zellen pro Vertiefung einer 6-Lochplatte ausgelegt und die DNA der Zellen am nachfolgenden Tag über das *DNeasy Blood & Tissue Kit* (siehe Tab. 2.35) isoliert. Dazu wurde die Zellsuspension (maximal 5×10^6 Zellen) in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und für 5 min bei RT und $300 \times g$ zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde anschließend in 200 μ l 1 x PBS aufgenommen, resuspendiert und 20 μ l Proteinkinase K hinzugefügt. Danach wurden 200 μ l *Buffer AL* ohne Ethanol hinzugefügt, der Ansatz gemischt und bei 56 °C für 10 min inkubiert. Nun wurden 200 μ l Ethanol (96 – 100 %) dazu gegeben und gemischt, um eine homogene Lösung zu erhalten. Dieser Ansatz wurde auf eine *DNeasy Mini spin column* in einem *Collection tube* gegeben und bei $>6.000 \times g$ für 1 min zentrifugiert; der Durchfluss wurde verworfen. Nun wurden 500 μ l *Buffer AW1* auf die Säule gegeben und es folgte eine Zentrifugation bei $>6.000 \times g$ für 1 min; der Durchfluss wurde entfernt. Anschließend wurden 500 μ l *Buffer AW2* auf die Säule gegeben und der Ansatz bei $20.000 \times g$ für 3 min zentrifugiert, um die *DNeasy Membran* zu trocknen. Die *DNeasy Mini spin column* wurde in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß platziert und direkt auf die *DNeasy Membran* 200 μ l *Buffer AE* gegeben. Nach einer 1-minütigen Inkubation folgte eine Zentrifugation bei $>6.000 \times g$ für 1 min, um die DNA zu eluieren. Die Konzentration (ng/ μ l) wurde über den Spektrophotometer *NanoDrop ONE*^c bestimmt.

PCR-Analyse

Die erzeugten genetischen Veränderungen der *BRCA1* Allele wurden in der PCR untersucht und validiert. Dazu wurde ein kürzerer bzw. längerer Bereich um 50 bp bzw. 200 bp, die Cas9-Schnittstelle flankierend, bestimmt und entsprechende Primer verwendet (siehe Tab. 2.5). Diese Bereiche wurden für Exon 9 und Exon 14 von *BRCA1* in der PCR amplifiziert. Der Ansatz für die PCR war wie folgt zusammengesetzt (siehe Tab. 2.55).

Tabelle 2.55: Zusammensetzung des Mastermix für die PCR

Ansatz für PCR	Volumen <i>Exon 9 short</i>	Volumen <i>Exon 9 long</i>	Volumen <i>Exon 14 short</i>	Volumen <i>Exon 14 long</i>
Buffer	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl
MgCl ₂ (25 mM)	1 µl (Ziel: 1 mM)	1 µl (Ziel: 1 mM)	1 µl (Ziel: 1 mM)	1 µl (Ziel: 1 mM)
dNTPs (20 mM)	2,5 µl (Ziel: 0,2 mM)	2,5 µl (Ziel: 0,2 mM)	2,5 µl (Ziel: 0,2 mM)	2,5 µl (Ziel: 0,2 mM)
Primer <i>forward</i> (100 pmol/µl)	1 µl (1:10 Verdünnung, 10 pmol/µl) (Ziel: 0,2 pmol/µl)	0,5 µl (1:10 Verdünnung, 10 pmol/µl) (Ziel: 0,2 pmol/µl)	1 µl (1:10 Verdünnung, 10 pmol/µl) (Ziel: 0,2 pmol/µl)	0,5 µl (1:10 Verdünnung, 10 pmol/µl) (Ziel: 0,2 pmol/µl)
Primer <i>reverse</i> (100 pmol/µl)	1 µl (1:10 Verdünnung, 10 pmol/µl) (Ziel: 0,2 pmol/µl)	0,5 µl (1:10 Verdünnung, 10 pmol/µl) (Ziel: 0,2 pmol/µl)	1 µl (1:10 Verdünnung, 10 pmol/µl) (Ziel: 0,2 pmol/µl)	0,5 µl (1:10 Verdünnung, 10 pmol/µl) (Ziel: 0,2 pmol/µl)
ddH ₂ O	13,35 µl	14,35 µl	13,35 µl	14,35 µl
Taq-Polymerase	0,15 µl	0,15 µl	0,15 µl	0,15 µl

Insgesamt wurden 24 µl des Mastermix und 1 µl der genomischen DNA (100 ng Gesamt-DNA) auf Eis zusammengeführt. Dazu wurde das nachfolgende PCR-Programm für Exon 9 bzw. Exon 14 verwendet (siehe Tab. 2.56) und die PCR im *Primus 25 advanced® Thermocycler* durchgeführt.

Tabelle 2.56: PCR-Programm für Exon 9 *short* und *long*; Exon 14 *short* und *long*

Schritt	Temperatur [°C]	Zeit [s]	Zyklus-Anzahl
1	95	120	1
2	95	30	35
	54	30	
	72	50	
3	72	300	1
4	4	unendlich	1

Gelelektrophoretische Auftrennung

Für die Ermittlung der DNA-Fragmente, welche in der vorangegangenen PCR amplifiziert wurden, wurden diese in der Agarose-Gelelektrophorese nach ihrer Größe aufgetrennt. Es wurde ein 2 %-iges Agarosegel verwendet. Dafür wurden 5 g Agarose in 250 ml 1 x TBE (10 x TBE aus Tab. 2.20 wurde 1:10 verdünnt) durch Erhitzen gelöst und anschließend 3 µl Ethidiumbromid hinzugefügt. Vor Auftragen der Proben in die Taschen des Gels wurden zu diesen DNA-Ladepuffer (6x) gegeben. Neben den Proben wurde in eine Geltasche ein Längenstandard (*AmpliSize™Molecular Ruler, 50-2.000 bp Ladder*) gegeben. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte in 1 x TBE-Puffer und bei 120 V für 30 bis 45 min. Die DNA-Banden wurden unter UV-Licht visualisiert und dokumentiert. Die erhaltenen DNA-Fragmente wurden mit den Fragmentlängen der unveränderten, *wildtyp* MCF7-Zelllinie verglichen.

Untersuchungen im *Bioanalyzer Aligent 2100* (FLI, Jena)

Für die Analyse im *Bioanalyzer Aligent 2100* wurden die Bereiche wie im Abschnitt *PCR-Analyse* über eine PCR amplifiziert und elektrophoretisch im *Bioanalyzer Aligent 2100* in einer Mikrokapillare aufgetrennt. Die Analyse im *Bioanalyzer Aligent 2100* sowie die Aufbereitung der Daten wurden von Mitarbeitern der Abteilung *Bioinformatik* am FLI in Jena durchgeführt.

2.2.2 Analyse der Proteinexpression in den MCF7-Klonen

Die Expression von BRCA1 und die Expression weiterer in der DNA-Reparatur relevanten Proteine, aber auch Proteine der EMT wurden im Western Blot in den MCF7-Klonen analysiert. Die einzelnen Schritte des Proteinnachweises sind nachfolgend verfasst.

Proteinextraktion

Die Proteine wurden aus ganzen Zellen extrahiert. Dafür wurde das Medium von den Zellen abgenommen, diese mit 1 x PBS gespült, mit Trypsin gelöst und in DMEM-Medium mit 10 % FKS aufgenommen. Die anschließenden Schritte erfolgten auf Eis, um eine Degradation der Proteine zu vermeiden. Die Zellsuspension wurde in ein 15 ml-Reaktionsgefäß überführt und bei 1.200 rpm für 5 min bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und das Zellpellet in 10 ml eiskaltem 1 x PBS aufgenommen und der Zentrifugationsschritt wiederholt. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und das Zellpellet in 1 ml eiskaltem 1 x PBS aufgenommen und in ein steriles 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Es folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt bei 1.200 rpm für 5 min und bei 4 °C, der Überstand wurde vorsichtig entfernt. Anschließend wurde zu dem Zellpellet in einem Volumen von 1:1 Extraktionspuffer, welcher 146 µl Puffer A, 5 µl PMSF und 50 µl Glycerol beinhaltetete, gegeben. In diesem Puffer wurde das Zellpellet gelöst und das 1,5 ml-Reaktionsgefäß im Wechsel für je 1 min in flüssigem Stickstoff eingefroren und danach für 1 min in einem 37 °C warmen Wasserbad erhitzt. Dieser Schritt wurde dreimal wiederholt. Danach wurde das 1,5 ml-Reaktionsgefäß bei 11.000 rpm für 10 min bei 4 °C zentrifugiert, um Zellreste und Zelltrümmer abzusetzen. Der Überstand wurde abgenommen und in ein steriles 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Für die Bestimmung der Proteinkonzentration wurden von diesem Extrakt 2 µl entnommen. Die Lagerung des Extraktes erfolgte bei -80 °C.

Bestimmung der Proteinkonzentration mithilfe der BCA-Methode

Die Proteinkonzentration des extrahierten Proteins wurde über die BCA-Methode (BCA, engl. *bicinchoninic acid*) ermittelt. Die BCA-Methode basiert auf der *Biuret-Reaktion*. In dieser werden Kupfer-Ionen (Cu^{2+}) durch die Aldehydgruppen der Proteine zu Cu^+ -Ionen reduziert. Diese Ionen können dann einen Komplex mit BCA bilden und Licht der Wellenlänge 562 nm absorbieren. In Abhängigkeit der Proteinmenge/ Konzentration steigt die Absorption linear an (zwischen 20 und 2.000 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Das Photometer wurde zunächst mit sechs Verdünnungen von BSA kalibriert, um einen Standard zu erhalten.

Es wurden Bicinchoninsäure-Lösung (Reagenz A) und Kupfer-(II)-Sulfat-Lösung (Reagenz B) verwendet. Zuerst wurden 2 μl des Proteinextraktes 1:25 in 48 μl ddH₂O verdünnt. In der Leerprobe (engl. *blank*) wurden 2 μl Extraktionspuffer und 48 μl ddH₂O verwendet. Die Färbereagenz war aus 50 Teilen Reagenz A und einem Teil Reagenz B zusammengesetzt. Von dieser wurden zu den verdünnten Proteinextrakten und des *blanks* je 1 ml hinzugegeben. Die Ansätze wurden anschließend gemischt und für 30 min bei 37 °C in einem Wasserbad inkubiert. Die Extinktion der Proben wurde im Photometer bei einer Wellenlänge von 562 nm und als Duplikate gemessen.

SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese

In der SDS-PAGE (engl. *sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis*) werden Proteine nach ihrer Größe in einem Gradienten-Tris-HCl-Polyacrylamid-Gel (4-15 %) elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Es wurde eine Gesamtproteinmenge von 40 μg eingesetzt, die Proben mit 5 x Laemmli-Puffer und ddH₂O in einem 1,5 ml-Reaktionsgefäß angesetzt, ein maximales Volumen von 30 μl wurde dabei nicht überschritten. Dieser Ansatz wurde zunächst zentrifugiert, die Proteine für 5 min bei 95 °C im Heizblock denaturiert und erneut zentrifugiert.

Das Gradienten-Tris-HCl-Polyacrylamid-Gel (4-15 %) wurde mit ddH₂O und Laufpuffer gespült und in die Elektrophoresekammer eingesetzt. Die Reservoirs der Kammer wurden mit Laufpuffer gefüllt, der Kamm des Gels entfernt und die Geltaschen ebenfalls mit Laufpuffer gespült. Anschließend wurden mögliche Luftblasen unterhalb des Gels entfernt.

Das gesamte Volumen der Proben wurde in die entsprechenden Geltaschen mit einer Pipette gegeben. Außerdem wurde in eine Geltasche der Größenstandard *SeeBlue® Plus2 Pre-stained Protein Standard* aufgetragen, in eine weitere Geltasche der Größenstandard *Novex™ MagicMark™ XP*. Verbliebene Geltaschen wurden mit 5 x Probenpuffer befüllt. Die Gelelektrophorese erfolgte für 10 min bei 100 V (die sog. *Sammelphase*) und für 80 min bei 200 V (die sog. *Trennphase*) auf Eis.

Western Blot

Nachdem die Proteine in der SDS-PAGE elektrophoretisch im *Criterion™ Blotter* aufgetrennt wurden, sollten sie im Western Blot auf eine Nitrozellulosemembran übertragen werden, um einen anschließenden immunologischen Nachweis über fluoreszenzgekoppelte Antikörper zu ermöglichen.

Zunächst wurde die Nitrozellulosemembran für 10 s in Wasser aktiviert und für 15 min in Transferpuffer äquilibriert. Die Apparatur für den Western Blot wurde nach den Herstellerangaben zusammengesetzt. Der Proteintransfer erfolgte zunächst für 1 h bei 100 V, gefolgt von 30 V über Nacht unter ständigem Umwälzen des Transferpuffers bei 4 °C im Kühlraum. Nach erfolgreichem Transfer wurde die Membran kurz mit 1 x TBS gespült und mindestens für 6 h in *Odyssey Blocking Buffer* inkubiert, um unspezifische Bindestellen für den Antikörper zu blockieren.

Proteindetektion

Für die Proteindetektion wurde das *LI-COR*-System und fluoreszenzmarkierte Zweitantikörper (siehe Tab. 2.8) verwendet. Zunächst wurden bestimmte Erstantikörper (siehe Tab. 2.7), welche in *Odyssey Blocking Buffer* entsprechend verdünnt wurden, unter Schwenken über Nacht bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde die Nitrozellulosemembran dreimal mit 1 x TBS-T für jeweils 10 min gewaschen, um überschüssige Antikörperreste zu entfernen. Alle nachfolgenden Schritte erfolgten im Dunkeln. Die entsprechenden sekundären, fluoreszenzgekoppelten Antikörper (siehe Tab. 2.8) wurden in *Odyssey Blocking Buffer* angesetzt, und die Nitrozellulosemembranen für 1 h unter Schwenken bei RT darin inkubiert. Daraufhin erfolgten drei Schritte, in denen die Membran mit 1 x TBS-T für 10 min gespült wurde. Die Detektion der Proteine erfolgte mit dem *Odyssey CLX 289* detektiert, die Quantifizierung mit dem Programm *Odyssey® Infrared Imaging System*. Die Hintergrundsignale wurden vom System automatisch herausgerechnet und ein Wert für die Intensität (entspricht der Proteinmenge) ausgegeben.

Auswertung der Proteinexpression

Zur Ermittlung der endogenen und absoluten Proteinmenge wurde das gemessene Proteinsignal auf das Proteinsignal der Ladekontrolle (HSC70) normalisiert.

$$\text{Absolute Proteinmenge} = \frac{\text{Gemessenes Proteinsignal}}{\text{Gemessenes HSC70 Signal}} \quad (2-1)$$

Der Vergleich der Proteinexpression der MCF7-Klone zur unveränderten MCF7 erfolgte über die Normierung der Proteinexpression der MCF7 auf 1 und die Berechnung der Proteinexpression der MCF7-Klone relativ zur MCF7.

$$\text{Relative Proteinexpression} = \frac{\text{Absolutes Protein}}{\text{Absolute Proteinexpression MCF7}} \quad (2-2)$$

2.2.3 Bestimmung der Proliferationsrate

Zur Ermittlung der Proliferationsrate wurde zunächst in einer Doppelbestimmung je 1×10^5 Zellen in 5 ml Medium in einer T-25-Zellkulturflasche ausgelegt. Insgesamt wurden pro Zelllinie 20 Zellkulturflaschen ausgelegt. Nach 24 h erfolgte die Zählung der ersten zwei Zellkulturflaschen. Dazu wurde das Medium abgenommen, die Zellen kurz mit $1 \times$ PBS gespült, mit Trypsin gelöst und die Zellzahl bestimmt. Dieses erfolgte alle 2 Tage bis hin zu 8 Tagen.

Auswertung der Verdopplungszeit (Generationsrate)

Zur Bestimmung der Verdopplungszeit (Generationsrate) in Stunden (h) wurde zunächst die Anzahl an **Zellteilungen n** bestimmt. Dazu wurde von dem Logarithmus der Zellzahl am letzten Tag der Logarithmus der Zellzahl am ersten Tag subtrahiert.

$$\text{Zellteilungen } n = \log(\text{Zellzahl am letzten Tag}) - \log(\text{Zellzahl am ersten Tag}) \quad (2-3)$$

Anschließend wurde die **Teilungsrate v (Tagen = d)** bestimmt, indem die **Zellteilungen n** durch die **Gesamtzahl an Tagen** dividiert wurde.

$$\text{Teilungsrate } v (d) = \frac{\text{Zellteilungen } n}{\text{Gesamtzahl an Tagen } (d)} \quad (2-4)$$

Daraufhin wurde die **Teilungsrate v** in Stunden (h) umgerechnet.

$$\text{Teilungsrate } v (h) = \frac{\text{Teilungsrate } v (d)}{168} \quad (2-5)$$

Die **Verdopplungszeit** (Generationsrate) in (h) wurde wie folgt berechnet.

$$\text{Verdopplungszeit } (h) = \frac{1}{\text{Teilungsrate } v (h)} \quad (2-6)$$

Die Verdopplungszeit entspricht der Proliferationsrate der untersuchten Zelllinien und wurde zum Vergleich der Zelllinien untereinander und zur MCF7 verwendet.

2.2.4 Analyse des Zellzyklus

Die Zellzyklusphasen wurden über den DNA-Gehalt (X) innerhalb der Zellen ermittelt (Für die G1-Phase: $X=1$; S-Phase: $1 \leq X \leq 2$ und G2-Phase: $X=2$). Dazu wurden $2,5 \times 10^5$ Zellen in 5 ml Medium in einer T25-Zellkulturflasche ausgelegt und bei Erreichen einer Konfluenz von 60 bis 70 % gelöst und bei 1.200 rpm für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, die Zellen in $1 \times$ PBS gespült und erneut bei 1.200 rpm für 5 min zentrifugiert und in 1 ml $1 \times$ PBS aufgenommen. Nun wurden die Zellen fixiert, in dem die Zellsuspension unter Mischen in

4 ml Ethanol (80 % und eiskalt) getropft. Bis zur Färbung wurden die Zellen bei - 20 °C gelagert. Die DNA der Zellen wurde über Propidiumiodid (PI) gefärbt, ein Farbstoff, welcher in die DNA interkaliert. Dafür wurden die Zellen bei 1.200 rpm für 5 min zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 1 ml 0,1 % *Tween20* in 1 x PBS gewaschen. Dieser Ansatz wurde erneut bei 1.200 rpm für 5 min zentrifugiert, der Überstand abgenommen und die Zellen in 0,5 ml PI-Färbelösung (siehe Tab. 2.22) aufgenommen. Nun folgte eine Inkubation für 30 min unter Lichtausschluss bei RT.

Bestimmung des DNA-Gehaltes in der Durchflusszytometrie

Der DNA-Gehalt wurde durchflusszytometrisch bestimmt. Dazu wurden die gefärbten Zellen über Gaze vor der Analyse vereinzelt. In der Messung wurde über den FSC (engl. *Forward-Scatter*) die Zellgröße ermittelt, über den SSC (engl. *Sideward-Scatter*) die Granularität, über die PE-A (engl. *PE-Area*) der DNA-Gehalt und über die PE-W (engl. *PE-Width*) Dubletten ausgeschlossen. Pro Messung wurden 20.000 Zellen untersucht. Die Auswertung der jeweiligen Zellzyklusphasen erfolgte über das Programm *ModFIT LT (Version 3.2)*.

2.2.5 Bestimmung der relativen HR-Kapazität im Plasmid-Rekonstruktionsassay

Die relative HR-Kapazität wurde über den Plasmid-Rekonstruktionsassay bestimmt.

Transfektion der Zellen

Dazu wurden pro Loch einer 12-Lochplatte 1×10^5 Zellen ausgesät. Nach 24 h folgte ein Waschschrift mit 1 x PBS und der Austausch mit Antibiotika-freiem Medium (1 ml/Loch). Nun folgte die Transfektion des linearisierten Plasmids *pDR-GFP* (siehe Anhang, Abb. A.2) und zur Kontrolle die des Plasmids *pEGFP-N1* (siehe Anhang Abb. A.3). Die Plasmide wurden in einer Konzentration von $1 \mu\text{g}/10^5$ Zellen eingesetzt und als Transfektionsagens *Fugene[®] HD* (Promega) verwendet nach Angaben von *Promega*. Es folgte eine Inkubation für 48 h bei 37 °C.

Vermehrung des Plasmids

Die Plasmidvermehrung erfolgte wie in Abschnitt 2.2.1 beschrieben und es wurden für das Plasmid *pDR-GFP* Ampicilin (50 mg/l), für das Plasmid *pEGFP-N1* Kanamycin (50 mg/l) und die Bakterien (*One Shot TOP10. E.coli*) verwendet und über die Isolation über Maxi-Präparation (siehe Abschnitt 2.2.1).

Linearisierung des *pDR-GFP*-Plasmids

Vor Transfektion erfolgte die Linearisierung des *pDR-GFP*-Plasmids über das Restriktionsenzym I-SceI. Dazu wurden 40 μg Plasmid und 40 U I-SceI (Ursprungskonzentration: 5.000 U/ml) verwendet und für 6 bei 37 °C inkubiert. Dieser Ansatz wurde auf ein 1%-iges Agarosegel für 5 h bei 100 V elektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend wurde mittels Skalpells die Bande mit dem linearisierten Plasmid ausgeschnitten und über das Kit *Wizard[®] S Gel and PCR Clean-Up System Kit* von *Promega* nach Herstellerangaben isoliert.

Bestimmung der HR-Kapazität in der Durchflusszytometrie

Die relative HR-Kapazität wurde in der Durchflusszytometrie bestimmt. Zellen, die fähig sind, die HR anzuwenden, können den artifiziell induzierten DNA-Doppelstrangbruch im linearisierten *pDR-GFP*-Plasmid mithilfe des Bereiches mit dem verkürzten GFP-Protein reparieren, wodurch ein intaktes GFP entsteht. Zellen mit einer HR-Defizienz sind dagegen nicht fähig, diese Reparatur durchzuführen, weshalb kein funktionales GFP-Protein generiert wird.

Für die durchflusszytometrische Analyse wurden die Zellen über Trypsin gelöst, zweimal mit 1 x PBS gespült und in 500 µl 1 x PBS aufgenommen. Die Zellen wurden zudem über Gaze vor der Messung vereinzelt und auf Eis unter Ausschluss von Licht gelagert. In der Durchflusszytometrie wurden über FITC (Fluorescein Isothiocyanat) die grüne Fluoreszenz des GFP gemessen und über PE (Phycoerythrin) die Autofluoreszenz der Zellen bestimmt. Pro Messung wurden 30.000 Zellen untersucht. Die anschließende Auswertung erfolgte über die *BD FACS DIVA™* Software.

2.2.6 Erzeugung von DNA-Schäden

Mitomycin C

Das bifunktionale Alkylans MMC (engl. *mitomycin C*) verursacht Vernetzungen von Guanosinresten und zu einem kleineren Anteil (bis 13 %) Vernetzungen gegenüberliegender DNA-Stränge (engl. *interstrand crosslinks*) sowie zu einem großen Anteil Mono-Addukte, zu einem geringeren Anteil Vernetzungen auf dem gleichen DNA-Strang (engl. *intrastrand crosslinks*) [243, 244].

Für die Herstellung der MMC-Stammlösung (0,3 mM) wurden die 2 mg MMC (entspricht einer Flasche) in 20 ml sterilem Wasser gelöst und lichtgeschützt bei 200 rpm für 30 min bei 37 °C inkubiert. Die Stammlösung wurde, abhängig von der Anwendung unterschiedlich verdünnt und lichtgeschützt für 1 h auf die Zellen gegeben. Die Stabilität von MMC in Lösung konnte für 6 h gewährleistet werden.

Olaparib

Olaparib [142, 141] ist ein Inhibitor des Enzyms PARP1 (engl. *poly-ADP-ribose polymerase 1*), einem wichtigen Enzym der Einzelstrangreparatur (SSB, engl. *single-strand breaks*). Wird PARP1 über Olaparib an der Replikationsgabel gehalten (engl. *trapping*) kommt es zur Kollision mit der Replikationsgabel in der S-Phase und aus einem SSB entsteht ein ein-endiger DNA-Doppelstrangbruch (engl. *double-strand break*). Da diese Schadensart, wenn fehlerfrei, über die HR repariert werden muss, bewirkt PARP-Inhibition in HR-defizienten Zellen synthetische Letalität [141, 142, 143].

Für die Herstellung der Stammlösung (10 mM) wurden 5 mg Olaparib in 1,15 ml DMSO gelöst und diese bei -80 °C gelagert. Bei Verwendung wurde die Stammlösung 1:1000 mit DMSO verdünnt (100 µM).

Ionisierende Strahlung

Ionisierende Strahlung verursacht vielfältige DNA-Schäden. 1 Gy ionisierende Strahlung induziert etwa 3000 bis 4000 Basenschäden, 1000 SSBs und 20 bis 40 DSBs. Außerdem verursacht ionisierende Strahlung Vernetzungen zwischen Proteinen und DNA und den beiden DNA-Strängen (ca. 200 bis 400 pro Zelle pro Gy) [245]. Die Bestrahlung der Zellen erfolgte bei RT mit einer Röntgenröhre RS225 bei 200 kV und 15 mA mit einer Dosisrate von 1,2 Gy/min (0,5 mm Cu- und 0,8 mm Be-Filter).

2.2.7 Analyse des zellulären Überlebens im Koloniebildungstest

Der Koloniebildungstest ermöglicht es, die Empfindlichkeit der Zellen gegenüber verschiedenen DNA-schädigenden Agenzien zu bestimmen. Dazu wurden 250 Zellen in jede Vertiefung einer 6-Lochplatte in 1,5 ml Medium ausgesät. Auf diese Weise konnte die Klonalität einzelner Zellen ermittelt werden. Die nach der Behandlung überlebenden Zellen können innerhalb von 7 bis 14 Tagen Kolonien ausbilden. Das Medium wurde abgenommen und die Zellen für 5 min mit 70 %-igem Ethanol fixiert und anschließend getrocknet. Die Färbung erfolgte mit 0,1 %-igem Kristallviolett für 5 bis 10 min. Das Kristallviolett wurde abgenommen und überschüssige Reste mit Leitungswasser entfernt und die Platte getrocknet. Kolonien aus mehr als 50 Zellen wurden gezählt und quantifiziert. Das zelluläre Überleben der Zellen bei unterschiedliche Behandlungspunkten wurde anhand der Anwachsrate (Plattierungseffizienz, engl. *plating-efficiency*, *PE*) bestimmt und auf die unbehandelte Kontrolle normiert.

Analyse des zellulären Überlebens nach MMC

Für die Bestimmung der zellulären Empfindlichkeit gegenüber MMC, wurden 250 Zellen in jede Vertiefung einer 6-Lochplatte ausgesät und über Nacht bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Im Anschluss wurde MMC in den Konzentrationen von 0 µg/ml; 0,5 µg/ml und 1,0 µg/ml auf die Zellen gegeben und diese für 1 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Das Medium wurde abgenommen, die Zellen zweimal mit 1 x PBS gespült und frisches Medium hinzugegeben. Die Zellen wurden für 7 bis 14 Tage im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert.

Analyse des zellulären Überlebens nach Olaparib

Für die Bestimmung der zellulären Empfindlichkeit gegenüber Olaparib wurden 250 Zellen in jede Vertiefung einer 6-Lochplatte ausgesät und über Nacht bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Im Anschluss wurden 0 µM bis 3,0 µM Olaparib auf die Zellen gegeben und diese für 24 h im Brutschrank inkubiert. Das Medium wurde abgenommen, die Zellen zweimal mit 1 x PBS gespült und frisches Medium hinzugegeben. Die Zellen wurden für 7 bis 14 Tage im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert.

Analyse des zellulären Überlebens nach ionisierender Strahlung

Für die Bestimmung der zellulären Strahlenempfindlichkeit wurden 250 Zellen in jede Vertiefung einer 6-Lochplatte ausgesät und über Nacht bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen mit 0 Gy bis 6 Gy bestrahlt. Das Medium wurde abgenommen,

die Zellen zweimal mit 1 x PBS gespült und frisches Medium hinzugegeben. Die Zellen wurden für 7 bis 14 Tage im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert.

2.2.8 Nachweis von RAD51 Foci und γ H2AX Foci in der Immunfluoreszenz

Behandlung der Zellen

Pro Vertiefung einer 12-Lochplatte wurden 1 x 10⁵ Zellen auf einem Deckgläschen ausgelegt und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 30 min mit EdU (engl. *5-ethynyl-2'-deoxyuridine*) inkubiert, das Medium abgenommen, einmal mit 1 x PBS gespült und frisches Medium, sowie 0,5 µg/ml MMC auf die Zellen gegeben und diese für 1 h bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Danach wurde das Medium abgenommen, zweimal mit 1 x PBS gespült, frisches Medium auf die Zellen gegeben und diese für 6 h bzw. 24 h bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Unbehandelte, ebenfalls EdU-markierte Zellen dienten als Kontrolle.

Präextraktion und Fixierung

Nachdem die Zellen im Brutschrank inkubiert wurden, wurde das Medium abgenommen und der Zellrasen zweimal mit kaltem (4 °C) 1 x PBS gespült, die 12-Lochplatte wurde anschließend auf Eis gestellt. Nicht-Chromatin-gebundenes Protein wurde extrahiert, indem die Zellen mit 0,5 ml kaltem (4 °C) PB-DTT pro Vertiefung gespült wurden, die Lyse der Zellen erfolgte durch 0,5 ml kaltem (4 °C) PB-T pro Vertiefung auf Eis, wobei die Platte gelegentlich leicht geschüttelt wurde. Das PB-T wurde vorsichtig entfernt und die lysierten Zellen mit 0,5 ml kaltem (4 °C) PB-DTT pro Vertiefung gespült. Dieser Schritt erfolgte für 3 min auf Eis und ebenfalls unter gelegentlichem, vorsichtigem Schütteln. Anschließend wurden die Zellen fixiert, indem 300 µl 4 %-igem Paraformaldehyd (PFA) pro Vertiefung hinzugegeben wurde und die Zellen für 10 min bei RT inkubiert wurden. Das PFA wurde abgenommen, die Zellen dreimal mit 1 x PBS gespült und bis zur Färbung bei 4 °C im Kühlschrank gelagert.

Färbung über Immunfluoreszenz

Die Zellen wurden für mindestens 3 h in Blockierungslösung inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Dann wurde der primäre Antikörper, angesetzt in *Waschlösung 1* (siehe Tab. 2.23) inkubiert. Dafür wurde 50 µl der Antikörperlösung auf Para-Film vorgelegt und auf diese das Deckgläschen mit der Zellseite gelegt. Die Zellen wurden in einer feuchten Kammer über Nacht bei 4 °C inkubiert. Es folgten drei Waschschriffe der Deckgläschen für 10 min in *Waschlösung 2* (siehe Tab. 2.23). Die nachfolgenden Schritte wurden unter Lichtausschluss durchgeführt. Der sekundäre Antikörper wurde zusammen mit DAPI (1:1.000) in *Waschlösung 1* angesetzt. Von dieser Lösung wurden 50 µl auf Para-Film gegeben und die Deckgläschen mit der Zellseite auf die vorgelegte Antikörperlösung gelegt und in einer feuchten Kammer für 1 h bei RT inkubiert. Danach erfolgten drei Schritte, in denen die Deckgläschen in *Waschlösung 2* für je 10 min gespült wurden. Parallel erfolgte das Ansetzen der EdU-Färbelösung mit dem Farbstoff *Alexafluor® azide 594*. Dieser Ansatz wurde in einem Volumen von 50 µl auf Para-Film vorgelegt und die Deckgläschen mit der Zellseite darauf platziert. Es folgte eine Inkubation in einer feuchten Kammer für 30 min bei RT. Anschließend

wurden die Zellen dreimal für je 10 min mit 1 x PBS gewaschen und in *Vectashield Mounting-Medium* eingebettet und der Rand mit Nagellack abgedichtet.

Auswertung der mikroskopischen Aufnahmen

Die fokalen Färbungen von RAD51 (6 h nach MMC) wurden am Fluoreszenzmikroskop (*Axiovision Observe Z1*) ausgewertet. Es wurden mit der integrierten Kamera des Mikroskops und unter der Verwendung der Software *Axio Vision Rel. 4.7* pro Objektträger zufällig ausgewählte Bereiche aufgenommen und dazu der Modus *Mehrdimensionale Bildaufnahme* verwendet.

Die verwendete Belichtungszeit wurde vorher definiert und für die Vergleichbarkeit der Aufnahmen nicht verändert. Die aufgenommenen Bilder wurden mithilfe der Software *Image J* ausgewertet, indem die Schwellenwerte für die zu zählenden Foci (RAD51) initial bestimmt wurden. Dabei wurden die Anzahl der Foci in EdU-positiven Zellen gezählt und pro Ansatz die Foci von mindestens 100 Zellen gezählt.

Auswertung mittels AKLIDES®-Gerät von MediPan

Die Bewertung der fokalen Färbungen von RAD51 und γ H2AX (24 h nach MMC) erfolgte im *AKLIDES®*-Gerät von MediPan. Die Foci wurden automatisiert mithilfe der Software *Aklides Nuk 10160418* gemessen und gezählt. Dazu wurden pro Zelle die Anzahl „Foci ok“ und mit der Anzahl „Foci invalid“ gemessen und die Summe dieser pro Zelle gebildet. Die Summe dieser Foci pro Zelle wurde für die Analyse verwendet und die durchschnittliche Foci-Anzahl berechnet.

2.2.9 Nachweis von Mikrokernen über Giemsa-Färbung

Behandlung der Zellen

Pro Kammer eines *Boyden Chambers* wurden 25×10^3 Zellen in 500 μ l Medium ausgelegt und über Nacht bei 37 °C und 5 % CO₂-Begasung im Brutschrank inkubiert. Dann wurde mit der unbehandelten Kontrolle wie folgt verfahren: 18 h nach Aussaat wurde zu den Zellen Cytochalasin B (8 μ g/ml) für 6 h gegeben. Für die Zellen, die mit MMC behandelt wurden, wurde wie nachfolgenden beschrieben fortgefahren: Zunächst wurde MMC (20 mg) in 20 ml ddH₂O gelöst und für 30 min unter Schütteln und bei 37 °C inkubiert. Nach ungefähr 16 h bis 24 h nach Aussaat wurden die Zellen für 1 h mit MMC (1,5 μ g/ml) behandelt. Daraufhin wurde zweimal mit 1 x PBS gespült und frisches Medium hinzugegeben. Dieser Ansatz wurde für 18 h im Brutschrank inkubiert und anschließend für 6 h mit Cytochalasin B (8 μ g/ml) behandelt.

Fixierung und Färbung der Zellen

Nach der Cytochalasin B-Behandlung der Kontrolle und der MMC-behandelten Zellen, wurden diese einmalig mit 1 x PBS gespült und anschließend mit eiskaltem Methanol für 10 min fixiert und getrocknet. Nach Entfernung der Kammern der *Boyden Chamber Slides* erfolgte nun die Färbung mit 4 % Giemsa-Färbelösung (siehe Tab. 2.25) unter leichtem Schütteln für 15 min.

Beschichtung und Eindeckeln der *Boyden Chamber Slides*

Nach wiederholtem Spülen mit H₂O wurden die *Boyden Chamber Slides* getrocknet und mit Entellan beschichtet und mit einem Deckgläschen versehen.

2.2.10 Der *ALDEFLUOR*[™]-Assay

Die Aldefluor-positiven Zellen wurden mithilfe des *ALDEFLUOR*[™]-Kit (siehe Tab. 2.40) bestimmt, womit der Anteil an Tumorstammzellen in der Zellpopulation der verwendeten Zelllinien ermittelt werden konnte. Eine erhöhte ALDH-Expression und Aktivität von ALDH (engl. *aldehyde dehydrogenase*) charakterisiert Tumorstammzellen.

Der verwendete *ALDEFLUOR*[™]-Assay misst die Aktivität dieses Enzyms (ALDH). Das Enzym ALDH kann das Substrat, den Farbstoff BAAA (*BODIPY-aminoacetaldehyd*) umsetzen, welcher in die Zellen diffundiert und über die ALDH in negativ-geladenes, fluoreszierendes BAA (*BODIPY-aminoacetat*) umgewandelt wird. BAA kann nicht aus der Zelle diffundieren, da der Efflux ausschließlich über ABCD-Transporter erfolgt und diese Transporter vorher über einen Inhibitor in dem *ALDEFLUOR*[™] *Buffer* transient inaktiviert wurden. Daher akkumuliert dieser Fluoreszenzfarbstoff in der Zelle und erzeugt ein starkes Signal. Um Fluoreszenzsignal aus dem Hintergrund zu definieren, wurde für jede Probe zusätzlich eine Negativkontrolle verwendet, welcher der *ALDEFLUOR*[™] *Reagent* der ALDH-Inhibitor DEAB (*N,N-diethylaminobenzaldehyd*) hinzugefügt wurde.

Pro Ansatz wurden 1 x 10⁵ Zellen in einer T-25-Zellkulturflasche ausgelegt und über Nacht bei 37 °C und 5 % CO₂-Begasung im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit Trypsin gelöst, in DMEM-Medium mit 10 % FKS aufgenommen, die Zellsuspension in ein 5 ml-Reaktionsgefäß überführt, bei 1.200 rpm für 5 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellsediment wurde in 1 ml *ALDEFLUOR*[™]*Buffer* aufgenommen und 5 µl *ALDEFLUOR*[™]*Reagent* hinzugefügt. Parallel dazu wurde eine Kontrolle vorbereitet, in der 1 ml *ALDEFLUOR*[™]*Buffer* vorgelegt- und ergänzend dazu 5 µl DEAB hinzugefügt wurde. Anschließend wurden 0,5 ml der Probe in die Kontrolle hinein pipettiert. Die Inkubation erfolgte für 45 min bei 37 °C im Brutschrank. Im Anschluss wurden die Kontrolle- und die Probe bei 1.200 rpm für 5 min zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellsediment in 0,5 ml *ALDEFLUOR*[™] *Buffer* gelöst. Die Proben wurden bis zur Analyse im Durchflusszytometer (*MACSQuant*[®]*X and MACSQuant Analyzer 10*) auf Eis gelagert.

Auswertung der *Aldefluor*-positiven Zellen

Die Auswertung der Daten aus der durchflusszytometrischen Analyse erfolgte mithilfe der Software *FlowLogic*[™].

2.2.11 Immuncytochemischer Nachweis der cytosolischen dsDNA

Behandlung der Zellen

Jede Vertiefung einer 12-Lochplatte wurde mit einem Deckgläschen bestückt, pro Vertiefung $1,5 \times 10^5$ Zellen ausgelegt und die Zellen über Nacht bei 37 °C und 5 % CO₂-Begasung im Brutschrank inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen für die Behandlung mit ionisierender Strahlung (8 Gy) bestrahlt. Die unbehandelten Zellen dienten als Kontrolle.

Fixierung der Zellen

Die unbehandelten und die bestrahlten Zellen wurden nach 16 h fixiert. Dazu wurden die Zellen zunächst einmal mit 1 x PBS gespült und anschließend mit 4 % Paraformaldehyd für 20 min fixiert.

Präextraktion der Zellen

Die Zellen wurden dreimal für je 5 min mit 1 x PBS gespült. Die Präextraktion (Permeabilisierung der Membran) erfolgte über 0,2 %-Triton-X in PBS für 10 min. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit 1 x PBST gespült.

Behandlung der Zellen mit Formamid

Die Zellen wurden mit 50 % Formamid-PBS-Lösung bei RT zunächst 10 min inkubiert, um die spätere immunologische Bindung der primären Antikörper zu erleichtern. Dann wurde das Formamid entfernt und auf 75 °C erwärmte 50 % Formamid-PBS-Lösung gegeben und für 15 min bei 75 °C im Wasserbad inkubiert.

Behandlung mit RNase A

Nun wurde das Formamid entfernt und 1 x TBS hinzugegeben. Daraufhin wurde dreimal für je 5 min mit 1 x TBS gespült. Die RNase A wurde bei 95 °C aktiviert und auf die Zellen gegeben (1 mg/ml) und für 1 h bei 37 °C inkubiert. Nach der RNase A-Behandlung wurde mit den unbehandelten und mit 8 Gy bestrahlten Proben bei der Blockierung fortgefahren (siehe *Blockierung unspezifischer Bindungsstellen*). Während parallel Kontrollproben mit DNase I behandelt wurden (siehe *Behandlung mit DNase I*).

Behandlung mit DNase I

Parallel wurden Kontroll-Proben zusätzlich mit DNase I behandelt. Diese wurden direkt nach der RNase A-Behandlung zunächst dreimal mit 1 x TBS gespült. Dann erfolgte die Behandlung mit DNase I mit 30 U, 60 U und 90 U für 1 h bei 37 °C. Anschließend wurde auch bei diesen Proben mit der Blockierung fortgefahren.

Blockierung unspezifischer Bindungsstellen

Die Blockierung erfolgte über die 1 % BSA/ 2 % *Goat serum*-Lösung (siehe Tab. 2.24) für 1 h bei RT.

Immunfluoreszenzfärbung der dsDNA

Nach der Blockierung erfolgte die Inkubation des ersten primären Antikörpers gegen dsDNA (engl. *double-stranded DNA*) (siehe Tab. 2.11), welcher in der Lösung aus 1 % BSA/ 2 % *Goat serum* + 0,1 % Saponin (siehe Tab. 2.24) angesetzt wurde. Die Antikörperlösung (30 µl) wurde

tropfenweise auf Para-Film gegeben und die Deckgläschen mit der Seite der Zellen auf diese gelegt. Die anschließende Inkubation erfolgte über Nacht bei 4 °C in einer feuchten Kammer. Nun wurde dreimal mit PBST für je 5 min gespült, bevor der sekundäre Antikörper (siehe Tab. 2.12) für 1 h bei RT in einer feuchten Kammer inkubiert wurde.

Immunfluoreszenzfärbung der COX IV

Nachdem dreimal für 5 min mit PBST gespült wurde, wurde der primäre Antikörper gegen COX VI (siehe Tab. 2.11), welcher in der Lösung aus 1 % BSA/ 2 % *Goat serum* + 0,1 % Saponin (siehe Tab. 2.24) angesetzt wurde, für 1 h bei RT in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach erneutem dreimaligem Spülen für 5 min mit PBST, wurde der sekundäre Antikörper (siehe Tab. 2.12) für 1 h bei RT in einer feuchten Kammer inkubiert.

Färbung des Nukleus mit DAPI

Die Zellen wurden dreimal mit PBST für 5 min gespült und der Zellkern mit DAPI (50 ng/ml) für 10 min im Dunkeln gefärbt.

Eindeckeln

Die Zellen wurden mit PBST gespült und mit *Vectashield Mounting-Medium* eingebettet. Anschließend erfolgte die Versiegelung der Deckgläschen mit Nagellack. Die Objektträger wurden über Nacht und im Dunkeln bei 4 °C getrocknet.

Aufnahme und Auswertung der immuncytochemischen Bilder

Die Aufnahme der immuncytochemischen Bilder erfolgte in der *Microscopy Core Facility* des UKE unter der Verwendung des Konfokalmikroskops *Leica TCS SP8 X*. Beispielhafte Bilder sind anhand des MCF7 *wildtypes* im Anhang gezeigt (siehe Anhang A.4).

Die Auswertung der immuncytochemischen Bilder erfolgte mithilfe der Software *Imaris x64 7.6.1*. Dazu wurde die Intensität des Roten Signals (dsDNA), des Grünen Signals (COX IV) und Blauen Signals (DAPI) gemessen und die mittlere Intensität bestimmt (siehe Anhang, Abb. A.4). Überlagerung des Roten Signals mit dem Blauen Signal wurden von der gesamten mittleren Intensität des Roten Signals abgezogen. Es wurden je nach Objektträger und Zelldichte mindestens 100 Zellen ausgewertet.

2.2.12 Nachweis der cytosolischen dsDNA im *Quant-iT™ PicoGreen™ dsDNA Assay*

Behandlung der Zellen

Es wurden in einer T-75-Zellkulturflasche je 1 x 10⁶ Zellen (Kontrolle und Behandlung) ausgelegt und die Zellen über Nacht bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen für die Behandlung mit ionisierender Strahlung (8 Gy) bestrahlt. Die unbehandelten Zellen dienten als Kontrolle. Nach 16 h wurden die Zellen gelöst, gezählt und 1 x 10⁶ Zellen in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt.

Extraktion der cytoplasmatischen Fraktion

Die Extraktion des cytoplasmatischen Anteils erfolgte über das *NE-PER™ Extraction Kit* (siehe Tab. 2.41). Nach 6-minütiger Zentrifugation bei 500 x g wurde der Überstand verworfen und

die Zellen in 100 µl kaltem 1 x PBS gelöst. Anschließend wurden die Proben bei 500 x g für 4 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen. Für die Extraktion der cytoplasmatischen Fraktion wurde 100 µl eiskaltes CER I (siehe Tab. 2.57) hinzugefügt.

Tabelle 2.57: Verwendete Volumina für die jeweiligen Zell-Volumina

Zellvolumen (µl)	CER I (µl)	CER II (µl)	NER (µl)
10	100	5,5	50
20	200	11	100
50	500	27,5	250
100	1000	55	500

Nach Herstellerangaben (*NE-PER™ Extraktionskit*) und Empfehlung für HeLa Zellen (2 x 10⁶ Zellen entspricht einem 20 µl Zellvolumen)

Die in CER I gelösten Zellen wurden auf maximaler Stufe 15 s im *Vortex-Genie® 2* gemischt. Dann folgte eine Inkubation für 10 min auf Eis. Nun wurden 5,5 µl eisgekühltes CER II (siehe Tab. 2.57) zur Probe gegeben. Die Proben wurden nun auf maximaler Stufe 5 s im *Vortex-Genie® 2* gemischt. Nach einer ein-minütigen Inkubation auf Eis, wurden die Proben erneut auf maximaler Stufe 5 s im *Vortex-Genie® 2* gemischt. Nun wurden die Proben für 5 min bei 16.000 x g und 4 °C zentrifugiert, der Überstand (100 µl) wurden anschließend in gekühlte 1,5 ml-Reaktionsgefäße überführt und bei -80 °C bis zur Analyse gelagert.

Analyse der cytoplasmatischen Fraktion mittels *Quant-iT™ PicoGreen™ dsDNA Assay-Kit*

Zuerst wurden die Lösungen wie folgt angesetzt: Der 20 x TE Buffer wurde 1:20 mit ddH₂O verdünnt, um 1 x TE Buffer (entspricht dem 1 x Assay Buffer) zu erhalten. Das *Quant-iT™ PicoGreen® Reagent* wurde 1:200 in 1 x TE Buffer verdünnt (siehe Tab. 2.42). Bei jeder Messung wurde eine parallel eine Standardkurve verwendet. Diese wurde wie folgt angesetzt (siehe Tab. 2.58). Es wurde die DNA-Ausgangslösung (*Lambda DNA-standard* aus dem Kit) verwendet. Diese DNA-Ausgangslösung bestand aus 300 µl (294 µl 1 x Assay Buffer + 6 µl *Lambda DNA-standard*). Diese wurde vor der Anwendung kurz gemischt und zentrifugiert.

Tabelle 2.58: Standardkurve für den *Quant-iT™ PicoGreen™ dsDNA Assay*

Nr.	Finale Konzentration [ng/ml]	Ausgangskonzentration [ng/ml]
1	1000	2000
2	500	1000
3	250	500
4	125	250
5	62,5	125
6	31,25	62,5
7	15,625	31,25
8	7,8125	15,625
9	3,90625	7,8125

Die Verdünnungsreihe für die Standardkurve wurde dann wie folgt erstellt: Von *Ausgangslösung Nr.1* wurden 150 µl mit 150 µl 1 x *Assay Buffer* vermischt und auf diese Weise 300 µl *Ausgangslösung Nr. 2* erhalten (siehe Tab. 2.58). Für die weiteren Verdünnungsreihen (Nr. 3 bis Nr. 9) wurden die jeweiligen Ausgangslösungen mit 150 µl 1 x *Assay Buffer* vermischt und wie bei *Ausgangslösung Nr. 2* verfahren. Diese Standardkurve wurde in die 96-Lochplatte mit 100 µl pro Vertiefung gegeben. Außerdem wurden drei Leerproben (100 µl 1 x *Assay Buffer*) in die Vertiefungen gegeben.

Die in Abschnitt *Extraktion der cytoplasmatischen Fraktion* erhaltene DNA-Lösungen (Probe) wurden verwendet und 2 µl dieser mit 98 µl 1 x *Assay Buffer* vermischt.

Pro Vertiefung (Standardkurve bzw. Probe) wurden 100 µl *Quant-iT™ PicoGreen® Reagent* hinzugefügt und für 5 min unter Ausschluss von Licht bei RT inkubiert.

Die Messung erfolgte bei einer anregenden Wellenlänge von 480 nm und einer emittierenden Wellenlänge von 520 nm im *Spark®Multimode Microplate Reader* (Tecan Group AG) gemessen, zur Verfügung gestellt von der Abteilung *Biochemie* (UKE).

Auswertung der Menge cytosolischer dsDNA

Anschließend wurde der erhaltene Fluoreszenzwert der Leerprobe von jedem Fluoreszenzwert der Standardkurve bzw. Probe abgezogen. Die DNA-Menge (ng) pro 1×10^6 Zellen (ng/ 10^6 Zellen) der Proben wurde anhand der Standardkurve ermittelt.

2.2.13 Analyse der mRNA Expression von immunrelevanten Genen

Extraktion der Gesamt-RNA

Es wurden je 1×10^6 Zellen in einer T-75-Zellkulturflasche ausgelegt und am nächsten Tag mit 8 Gy bestrahlt. Nach 16 h erfolgte die Extraktion der Gesamt-RNA über das *RNeasy Mini Kit* (siehe Tab. 2.43) aus den unbehandelten und mit 8 Gy bestrahlten Zellen.

Dazu wurden zunächst maximal 1×10^7 Zellen als Pellet geerntet: Das Medium wurde abgenommen, einmal mit 1 x PBS gespült, die Zellen wurden mit Trypsin gelöst und die Zellzahl bestimmt. Anschließend wurden sie bei 1.200 rpm für 5 min bei 4 °C zentrifugiert, der Überstand abgenommen und die Zellpellets auf Eis gelagert.

Zunächst wurde für $<5 \times 10^6$ Zellen 350 µl *Buffer RLT*, für $<1 \times 10^7$ Zellen 600 µl *Buffer RLT* eingesetzt und das Pellet darin gelöst. Zu diesem wurden je 1 Volumen 70 % Ethanol hinzugegeben und durch Pipettieren vermischt. Bis zu 700 µl der Probe wurden auf eine *RNeasy Mini Spin Column* in einem 2 ml *Collection Tube* gegeben, das Reaktionsgefäß vorsichtig geschlossen und bei $8.000 \times g$ für 15 s zentrifugiert, der Überstand wurde verworfen.

Anschließend wurden 700 µl *Buffer RW1* auf die Membran der *RNeasy Mini Spin Column* gegeben und bei $8.000 \times g$ für 15 s zentrifugiert, der Überstand wurde verworfen. Nun wurden 500 µl *Buffer RPE* auf die *RNeasy Mini Spin Column* gegeben, das Reaktionsgefäß vorsichtig geschlossen und bei $8.000 \times g$ für 15 s zentrifugiert, der Überstand wurde verworfen. Erneut wurden 500 µl *Buffer RPE* auf die *RNeasy Mini Spin Column* gegeben, das Reaktionsgefäß vorsichtig geschlossen und bei $8.000 \times g$ für 2 min zentrifugiert, der Überstand wurde

verworfen. Die *RNeasy Mini Spin Column* wurde in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Auf die Membran der *RNeasy Mini Spin Column* wurden 30 bis 50 µl RNase-freies Wasser gegeben, das Reaktionsgefäß vorsichtig geschlossen und bei 8.000 x *g* für 1 min zentrifugiert, um die RNA zu eluieren. Die Bestimmung der Konzentration der extrahierten Gesamt-RNA erfolgte im *NanoDrop ONE*^c.

cDNA-Synthese über die Reverse Transkription

Nun erfolgte die Transkription der gesamten mRNA (engl. *messenger RNA*) in cDNA (engl. *copy DNA*) unter Verwendung des *Quanti[®]Tect Reverse Transcription Kit* (siehe Tab. 2.44). Zunächst wurde die RNA auf Eis aufgetaut. Dagegen wurden die Reagenzien *gDNA Wipeout Buffer*, *Quantiscript[®] Reverse Transcriptase*, *Quantiscript RT Buffer*, *RT Primer Mix* und das RNase-freie Wasser bei RT (15 bis 25 °C) aufgetaut. Jedes Reagenz wurde vor der Anwendung kurz gemischt, zentrifugiert und anschließend auf Eis gestellt. Nun wurde die Reaktion für die Eliminierung der genomischen DNA (gDNA) auf Eis angesetzt nach Tab. 2.59 (von *Qiagen*). Es wurden insgesamt 500 ng RNA eingesetzt und das entsprechende Volumen je nach Konzentration eingesetzt.

Tabelle 2.59: Komponenten der Reaktion zur Eliminierung der genomischen DNA (Angaben von *Qiagen*)

Reagenz/ Komponente	Volumen
<i>gDNA Wipeout Buffer</i> , 7 x	2 µl
<i>Template RNA</i> , bis zu 1 µg	variabel
RNase-freies Wasser	variabel
Gesamtes Reaktionsvolumen	14 µl

Dieser Ansatz wurde für 2 min bei 42 °C im Heizblock erhitzt und anschließend sofort auf Eis platziert. Nun wurde der Mastermix für die Reverse Transkription angesetzt nach Tab. 2.60, um die cDNA zu synthetisieren.

Tabelle 2.60: Komponenten der Reaktion für die Reverse Transkription

Reagenz/ Komponente	Volumen
<i>Quantiscript Reverse Transcriptase</i>	1 µl
<i>Quantiscript RT Buffer</i> , 5 x	4 µl
<i>RT Primer Mix</i>	1 µl
<i>Template RNA</i> aus Eliminierungsschritt	14 µl
Gesamtes Reaktionsvolumen	20 µl

Dieser Ansatz wurde auf Eis angesetzt und anschließend für weitere 20 min bei 42 °C im Heizblock inkubiert. Für die Inaktivierung der *Quantiscript Reverse Transcriptase* wurde der Ansatz für 3 min bei 95 °C inkubiert. Anschließend wurde der fertige Reaktionsansatz (cDNA) bei -20 °C gelagert bzw. in der *Quantitativen Echtzeit PCR* eingesetzt.

Analyse der mRNA Expression in der *Quantitativen Echtzeit PCR (qPCR)*

Nach der Reversen Transkription der mRNA in cDNA kann die Expression in der *Quantitativen Echtzeit PCR* untersucht werden. Dabei ist die qPCR (*quantitative Echtzeit PCR*) hoch sensitiv und eignet sich für die Quantifizierung von Gene, die niedrig exprimiert vorliegen sowie für geringfügige Veränderungen in der mRNA Expression [246]. In der *Quantitativen Echtzeit PCR* wird in die neu synthetisierten PCR-Produkte der fluoreszierende Farbstoff *SYBR Green I* eingebaut, welcher mit hoher Spezifität in die kleine Furche der DNA integriert wird [246, 247].

Die erhaltene cDNA aus der Reversen Transkription der mRNA wurde 1:5 verdünnt eingesetzt und die jeweiligen Primer aus Tab. 2.6 verwendet. Zudem wurde der *AccuPower®2xGreenStar™qPCR Master Mix* (siehe Tab. 2.45) verwendet. Der *Master Mix* (jeweils für jedes Gen) wurde auf Eis wie folgt angesetzt (siehe Tab. 2.61).

Tabelle 2.61: Zusammensetzung des Master Mix für die Quantitative Echtzeit PCR

Reagenz/ Komponente	Volumen
2 X Greenstar Master Mix	15 µl
PCR Primer forward (10 pmol)	2 µl
PCR Primer reverse (10 pmol)	2 µl
50 X ROX dye	1 µl
cDNA (template)*	5-10 µl
DEPC-distilled water	Auf 25 µl aufgefüllt

*Insgesamt wurden 5 µl cDNA-Lösung eingesetzt

Der komplette Ansatz (25 µl) wurden pro Vertiefung einer 96-Lochplatte gegeben und anschließend mithilfe des *CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System* mit nachfolgendem Programm (siehe Tab. 2.62) gemessen. Die Daten (Ct-Werte, engl. *threshold cycle*) wurden aus der *CFX Manager™ Software* entnommen.

Tabelle 2.62: Programm für die Quantitative Echtzeit PCR im CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System

Schritt	Temperatur [°C]	Zeit [s]	Zyklus-Anzahl
1	95	180	1
2	95	10	45
	57,8	30	
3	98	10	1
4	65	60	1
5	4	unendlich	1

Auswertung der relativen mRNA Expression

Zur Auswertung der mRNA Expression der immunrelevanten Gene nach Bestrahlung, wurde die relative Quantifizierung nach *Pfaffl* angewendet [246]. Dabei wird als Maß für die Quantifizierung der Startmenge die sogenannten Ct oder CP (engl. *crossing point*)-Werte verwendet [246]. Der Ct/CP-Wert entspricht der Anzahl an PCR-Zyklen, die nötig sind, um ein konstantes Fluoreszenzniveau zu erreichen [246].

Zunächst wurde die mRNA Expression (Zyklen) des Zielgens (*IL-6* bzw. *TLR-9* bzw. *CXCR4*) auf die mRNA Expression des Haushaltsgens *GAPDH* normalisiert und auf diese Weise der *delta-Ct-Wert* erhalten.

$$\text{Delta Ct-Wert} = \frac{\text{Ct-Wert des Zielgens (IL6 bzw. TLR-9 bzw. CXCR4)}}{\text{Ct-Wert des Haushaltsgens (GAPDH)}} \quad (2-7)$$

In der vorliegenden Arbeit wurde der *delta Ct-Wert* der unbehandelten Kontrolle und der mit 8 Gy behandelten Probe für die Gene *IL-6*, *TLR-9* und *CXCR4* ermittelt. Es wurden hierbei die endogenen mRNA-Level dieser Gene mit der der MCF7 verglichen bzw. die mRNA-Expressionslevel nach Behandlung mit 8 Gy mit der der MCF7 verglichen.

2.2.14 Statistische Auswertung

Für die statistischen Analysen wurden der ungepaarte *Student's t-Test* verwendet. P-Werte wurden auf Basis des zweiseitigen t-Tests ermittelt (* p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001 und **** p < 0,0001).

3 Ergebnisse

Die Homologe Rekombination (HR) ist einer der wichtigsten DNA-Doppelstrangbruch-Reparaturwege und verhindert genomische Instabilität [65]. Bei Tumorstammzellen (CSCs, engl. *cancer stem cells*) ist die chromosomale Stabilität von herausragender Bedeutung, indem sie durch eine hochregulierte HR in der S-Phase DNA-Schäden vermeiden [203]. Beeinträchtigungen in der HR, wie durch einen *BRCA1*-Verlust, verursachen replikationsassoziierte DNA-Schäden, die als Fragmente im Cytosol akkumulieren und die intrazelluläre Immunantwort initiieren. Aufgrund der erhöhten Expression von HR-Genen, einschließlich *BRCA1*, in CSCs verschiedener Tumorentitäten [228, 194], würde man aufgrund der verbesserten HR-Kapazität weniger cytosolische DNA erwarten. Es ist unklar, wie die Menge der HR-Proteine, z.B. von *BRCA1*, die Tumorstammzellfraktion und die intrazelluläre Immunantwort beeinflusst.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Auswirkungen einer reduzierten *BRCA1* Expression auf die HR-Kapazität, die Tumorstammzellfraktion und die intrazelluläre Immunantwort anhand eines isogenen Zellsystems in der epithelialen Mammakarzinomzelllinie MCF7 untersucht. Diese Zelllinie trägt drei *BRCA1* Genkopien (Allele) [248], die über CRISPR/Cas9 [249] spezifisch verändert wurden. Auf diese Weise wurden Klone mit stabil reduzierten *BRCA1* Expressionsniveaus generiert, welches die Analyse einer veränderten HR ermöglichte.

3.1 Etablierung eines isogenen Zellsystems

Zur Untersuchung dieser Fragestellung wurde ein isogenes Zellsystem mit unterschiedlichen Stufen an HR hergestellt. Es wurde die epitheliale und lumbale Mammakarzinomzelllinie MCF7 verwendet, die drei *BRCA1* Allele trägt [248]. Ziel war es, die Allele funktionell auszuschalten. Dazu wurde diese Zelllinie mit einem CRISPR/Cas9-tragenden Vektor plus ligierter *single guide RNA* gegen Exon 9 bzw. Exon 14 transfiziert.

3.1.1 Gezielte Veränderung des *BRCA1* Gens in Exon 9 und Exon 14

Abb. 3.1 zeigt die gezielte Veränderung des *BRCA1* Gens mit der schematischen Darstellung der drei *BRCA1* Allele von MCF7, des einzelnen *BRCA1* Gens und der relevanten Proteindomänen.

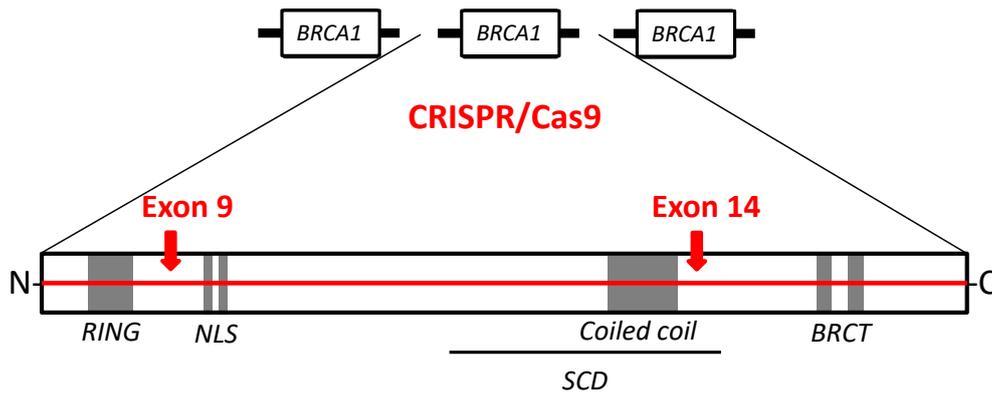


Abbildung 3.1: Schematische Darstellung der gezielten Veränderung des *BRCA1* Gens mit CRISPR/Cas9 in MCF7 Zellen [119, 125, 126, 129, 133]. Veränderungen im *BRCA1* Gen (rot) wurden in Exon 9, zwischen der *RING finger* Domäne und einem Kernlokalisierungssignal (*RING* bzw. *NLS*) (grau), oder in Exon 14, zwischen Proteinstrukturmotiv *Coiled coil* (in Teilen der SCD-Domäne) und *BRCT*-Domäne (grau) liegend, mit CRISPR/Cas9 vorgenommen.

Abkürzungen: *RING* (engl. *really interesting new gene*), *NLS* (engl. *nuclear localisation signal*, Kernlokalisierungssignal), SCD (engl. *serine containing domain*) und *BRCT* (engl. *BRCA1 C-terminus*).

Mithilfe von CRISPR/Cas9 und *single guide RNAs* gegen Exon 9 bzw. Exon 14 von *BRCA1* wurden Veränderungen zwischen der *RING finger* Domäne und einem Kernlokalisierungssignal (NLS) bzw. zwischen dem Proteinstrukturmotiv *Coiled coil*, in Teilen der SCD-Domäne, und der BRCT-Domäne erzeugt.

Es wurden 200 MCF7 Klone mit erfolgreich integriertem CRISPR/Cas9 Vektor plus *single guide RNA* etabliert. Von diesen wurden 80 Klone expandiert, welche in der primären PCR-Untersuchung auf Veränderungen der *BRCA1* Allele analysiert wurden. Um sowohl kleinere als auch größere Cas9-induzierte Veränderungen zu identifizieren, wurden in der PCR ein kürzerer und längerer Bereich um die Schnittstelle in Exon 9 bzw. Exon 14 amplifiziert. Deletionen und Insertionen wurden anhand der Fragmentlängen im Vergleich zur unveränderten MCF7 ermittelt.

3.1.2 Untersuchung der veränderten *BRCA1* Allele in der PCR

In Abb. 3.2 sind acht Klone mit deutlichen Veränderungen in Exon 9 und 14 des *BRCA1* Gens gezeigt. Dargestellt sind die elektrophoretisch aufgetrennten PCR-Fragmente der Klone, der MCF7, der Negativkontrolle (Wasser) und des Markers.

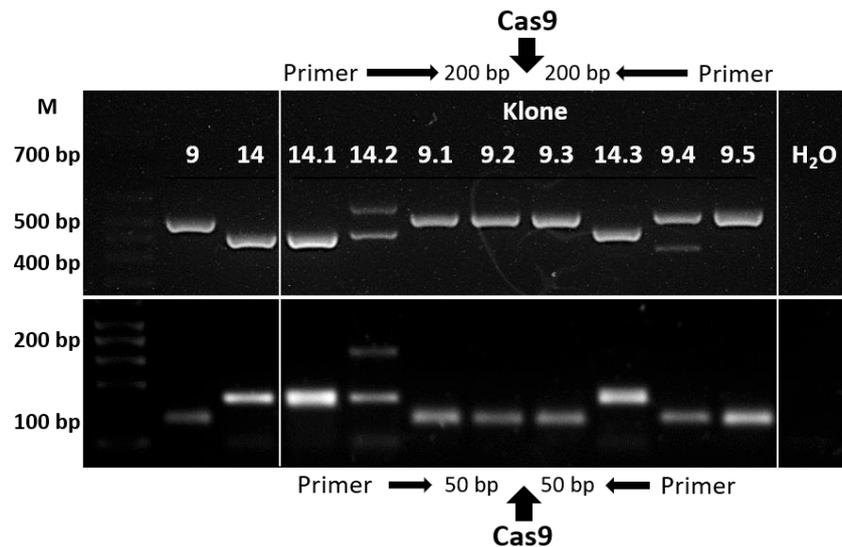


Abbildung 3.2: Herstellung von fünf in Exon 9 und drei in Exon 14 veränderten *BRCA1*-Klonen. Exponentielle MCF7 Zellen wurden mit dem die *single guide RNA* gegen Exon 9 oder 14 tragenden Vektor (pSpCas9-(BB)2A-GFP) elektroporiert, durchflusszytometrisch sortiert, expandiert und DNA isoliert. Bereiche, die Cas9-Schnittstelle von je 200 bp Länge (oben) oder 50 bp Länge (unten) flankierend, wurden in der PCR amplifiziert und gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die Fragmentlängen von MCF7 (Exon 9 (499 bp und 107 bp) und Exon 14 (403 bp und 159 bp)), Wasser (H₂O) und des Markers (M) dienten zur Kontrolle.

Die aufgetrennten PCR-Fragmente beinhalteten die Bereiche auf allen drei *BRCA1* Allelen. In der oberen Gelhälfte ist der längere Bereich, in der unteren der kürzere Bereich um die Cas9-Schnittstelle dargestellt. In der ersten Bande wurde der Marker mit bekannten Fragmentlängen aufgetragen. Die zwei weiteren Banden zeigen Exon 9 und Exon 14 der unveränderten MCF7, die folgenden Banden zeigen die fünf in Exon 9 und drei in Exon 14 veränderten Klone. In der unteren Gelhälfte handelte es sich bei den unteren schwachen Banden um unspezifische Primer-Dimere. Klon 14.1 zeigte im längeren und im kürzeren Fragment eine veränderte Länge, die auf kleinere Deletionen und Insertionen hinwies. Deutlich größere Veränderungen wurden in Klon 14.2 festgestellt, welcher mehrere Fragmente mit unterschiedlichen Längen besaß. Dabei war ein Fragment um ca. 200 bp länger im Vergleich zur MCF7, im größeren und kleineren Bereich um die Schnittstelle. Kleinere Insertionen wiesen Klon 9.1, Klon 9.2 und Klon 9.3 nur in den längeren Fragmenten auf. Klon 14.3 besaß im kürzeren Fragment eine Insertion von wenigen Basenpaaren. Eine große Deletion von ca. 100 bp im langen Fragment wurde in Klon 9.4 erzeugt. Diese zeigte sich nicht im kürzeren Fragment, möglicherweise durch den Verlust der Bindestelle für die Primer. Klon 9.5 wies nur in dem längeren Fragment eine Insertion von wenigen Basenpaaren auf. Die in dieser primären Analyse festgestellten Veränderungen der *BRCA1* Allele wurden weiter spezifiziert, indem die exakte Länge der Fragmente im *Bioanalyzer* ermittelt wurde.

3.1.3 Untersuchung der veränderten *BRCA1* Allele im *Bioanalyzer*

Zur detaillierteren Charakterisierung der veränderten *BRCA1* Allele wurden die Längen der PCR-Fragmente elektrophoretisch in einer Kapillare im *Bioanalyzer* bestimmt. Ein Beispiel für ein Elektropherogramm ist in Abb. 3.3 anhand von Klon 14.2 dargestellt. Der Marker (M) zeigt die bekannten Fragmentlängen. Es waren zwei *Peaks* erkennbar, wobei einer dem *wildtyp* *BRCA1* Allel entsprach (418 bp, WT) und der zusätzliche *Peak* ein mutiertes *BRCA1* Allel (601 bp, Mut) mit einer Insertion von 183 bp beinhaltete. In Klon 14.2 war folglich ein *BRCA1* Allel betroffen.

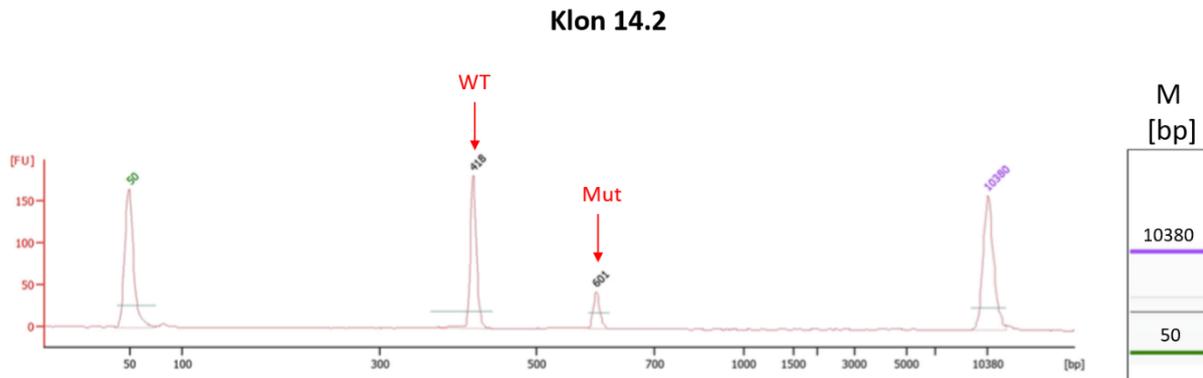


Abbildung 3.3: Veränderte *BRCA1* Allele des Klons 14.2. Dargestellt ist das Elektropherogramm des *BRCA1*-Klons 14.2. Die Längen der PCR-Fragmente wurden mithilfe des *Agilent 2100 Bioanalyzer* unter Verwendung entsprechender mikrofluidischer Chips und mithilfe der bekannten Fragmentlängen des Markers (M) ermittelt. Zur Kontrolle diente das MCF7 *wildtyp* *BRCA1* Allel (WT). Das veränderte *BRCA1* Allel ist mit Mut gekennzeichnet.

Alle *BRCA1*-Klone mit den dazugehörigen Ergebnissen sind in Tab. 3.1 zusammengefasst. Diese zeigt die Längen für die kurzen und langen PCR-Fragmente, die im *Bioanalyzer* ermittelt wurden; die Anzahl veränderter Allele; ob eine Insertion (Ins) oder Deletion (Del) vorlag und das Ergebnis der vorangegangenen primären PCR-Untersuchung (positiv oder negativ). Die Fragmente der drei *BRCA1* Allele sind farblich gekennzeichnet, wobei schwarz das *wildtyp* *BRCA1* Allel zeigt. Die Ergebnisse des *Bioanalyzer* bestätigten die Befunde der PCR-Analyse. Es wurden Klone mit einem bzw. zwei veränderten *BRCA1* Allelen vorgefunden, wobei kein vollständiger *Knockout* aller Allele erreicht wurde. Die in Exon 9 veränderten Klone zeigten im kurzen PCR-Fragment kleinere Insertionen oder Deletionen von 5 bp, wobei ein Allel verändert war. Aufgrund der geringen Veränderungen wurden diese Klone in der PCR als negativ gewertet. Jedoch wurden alle Exon 9 Klone basierend auf Veränderungen des langen PCR-Fragments als positiv gewertet. Überwiegend wurden Basenpaare inseriert. Klon 9.1 zeigte Insertionen von 45 bp und 61 bp mit zwei veränderten Allelen. Die Klone 9.2, Klon 9.3 und Klon 9.5 zeigten Insertionen von 5 bp mit einem veränderten Allel. Eine größere (177 bp) sowie eine kleinere (2 bp) Deletion wurden in Klon 9.4 bestätigt, welcher zwei veränderte Allele aufwies.

Deutliche größere Veränderungen wurden in den Exon 14 veränderten Klonen nachgewiesen. Anhand der kürzeren PCR-Fragmente besaß Klon 14.1 zwei veränderte Allele mit einer Deletion von 16 bp bzw. einer Insertion von 19 bp. Eine große Insertion von 182 bp wurde in einem Allel in Klon 14.2 festgestellt. Zwei veränderte Allele in Klon 14.3 wiesen eine Deletion

von 6 bp bzw. eine Insertion von 18 bp auf. Alle wurden in der primären PCR als positiv identifiziert. Anhand des kürzeren PCR-Fragments zeigte der Klon 14.1 zwei veränderte Allele, mit einer Deletion von 15 bp und einer Insertion von 25 bp. Die größere Insertion mit 183 bp in Klon 14.2 wurde auch hier bestätigt. Eine Deletion von 6 bp und eine Insertion von 20 bp wurden in Klon 14.3 nachgewiesen.

Tabelle 3.1: Veränderte *BRCA1* Allele in MCF7 Zellen. Das *wildtyp* (WT) *BRCA1* Allel ist in schwarz, die veränderten Allele in grau bzw. beige gekennzeichnet. Abkürzungen: Del: Deletionen, Ins: Insertionen

Klon	Kurzes PCR-Fragment				Langes PCR-Fragment				
	Exon 9	Bioanalyser [bp]	Zahl veränderter Allele	Ins/ Del	PCR	Bioanalyser [bp]	Zahl veränderter Allele	Ins/ Del	PCR
MCF7 WT		101				494			
9.1		107	0	/	Negativ	490, 535, 551	2	Ins/ Ins	Positiv
9.2		102, 107	1	Ins	Negativ	487, 492	1	Ins	Positiv
9.3		100, 105	1	Ins	Negativ	482, 487	1	Ins	Positiv
9.4		102	0	/	Negativ	486, 484, 309	2	Del/ Del	Positiv
9.5		102, 107	1	Ins	Negativ	486, 491	1	Ins	Positiv
Klon	Kurzes PCR-Fragment				Langes PCR-Fragment				
Exon 14	Bioanalyser [bp]	Zahl veränderter Allele	Ins/ Del	PCR	Bioanalyser [bp]	Zahl veränderter Allele	Ins/ Del	PCR	
MCF7 WT		169				419			
14.1		170, 154, 189	2	Del/ Ins	Positiv	412, 397, 437	2	Del/ Ins	Negativ
14.2		170, 352	1	Ins	Positiv	418, 601	1	Ins	Positiv
14.3		169, 163, 187	2	Del/ Ins	Positiv	419, 413, 439	2	Del/ Ins	Negativ

Zusammenfassung 3.1

Zusammenfassend wurde ein isogenes Zellsystem mit einer unterschiedlichen Anzahl veränderter *BRCA1* Allele und unterschiedlichen Exons (9 und 14) erfolgreich etabliert. Dabei wiesen fünf Klone eine Veränderung in Exon 9, drei Klone eine Veränderung in Exon 14 auf; wobei ein bzw. zwei Allele der insgesamt drei *BRCA1* Allele betroffen waren und kein vollständiger *Knockout* erhalten wurde. Nun galt es, die Auswirkungen der Veränderungen des jeweiligen Exons des *BRCA1* Gens und der Anzahl veränderter Allele auf die Proteinexpression von *BRCA1* und von in der DNA-Reparatur relevanten Proteinen in den Klonen zu untersuchen.

3.2 Charakterisierung der BRCA1-Klone

3.2.1 Expression von BRCA1 und von in der DNA-Reparatur relevanten Proteinen

Die Auswirkungen der veränderten *BRCA1* Allele wurden im nächsten Schritt auf Proteinebene untersucht. Zunächst wurde der direkte Einfluss auf die Proteinmenge von BRCA1 sowie mögliche Kompensationsmechanismen über andere für die DNA-Reparatur relevante Proteine wie FANCD2, CHK1 und RAD51 analysiert. Die Expressionsniveaus dieser Proteine in den BRCA1 Klonen, MCF7 und *BRCA1*-defizienten HCC1937 (HCC) sind in Abb. 3.4 dargestellt.

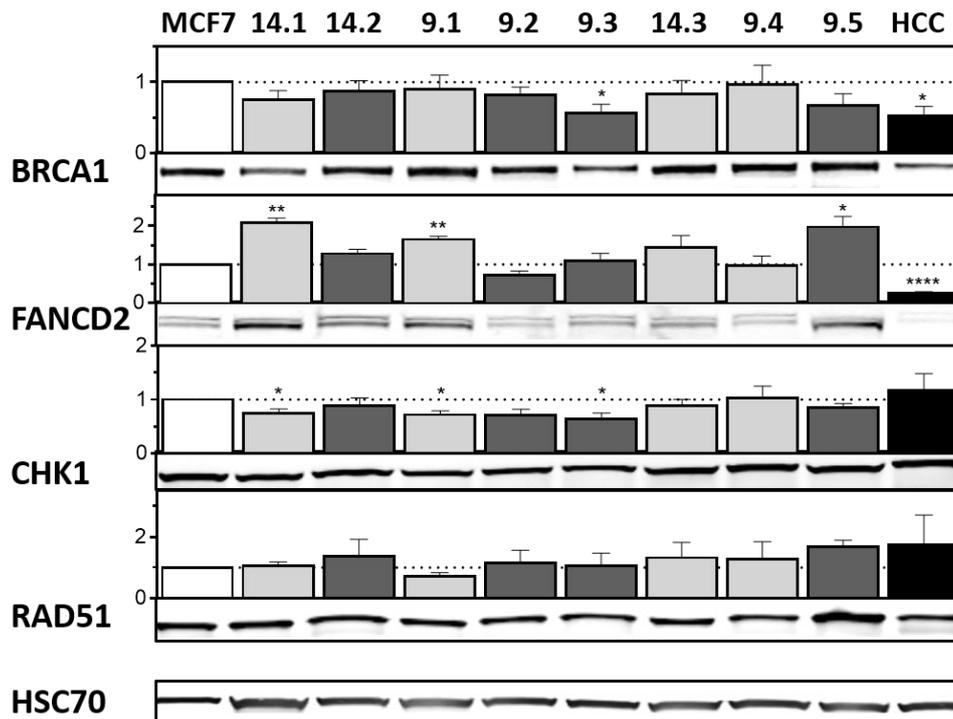


Abbildung 3.4: Vergleich der Expression von DNA-Reparaturproteinen in den acht BRCA1-Klonen. Es wurden je 40 µg Gesamtproteinextrakt exponentiell wachsender Zellen gelelektrophoretisch getrennt und BRCA1 (220 kDa), FANCD2 (165 kDa), CHK1 (56 kDa), RAD51 (37 kDa) und HSC70 (70 kDa) immunologisch detektiert. HCC1937 (HCC) diente als Negativkontrolle, HSC70 als Ladekontrolle. Dargestellt ist die Quantifizierung aus drei unabhängigen Experimenten mit Fehler des Mittelwertes, normiert auf MCF7 Zellen. Die BRCA1-Klone mit zwei intakten Allelen sind in dunkelgrau, die mit einem in hellgrau markiert. Statistisch signifikante Abweichungen: p-Wert $\leq 0,05$ = *; p-Wert $\leq 0,01$ = **; p-Wert $\leq 0,0001$ = **** (Student's T-Test).

Deutliche Unterschiede in der BRCA1 Expression wurden in den acht Klonen identifiziert. Diese waren unabhängig von dem veränderten Exon und der Anzahl der intakten Allele. Eine signifikante Reduktion der relativen BRCA1 Expression auf $0,57 \pm 0,12$ (p-Wert: 0,0226) zeigte sich in einem in Exon 9 veränderten Klon (Klon 9.3). In den weiteren Klonen war die Expression auf 0,97 bis 0,68 reduziert. Klon 14.2 und Klon 9.1 wiesen eine relative Expression von $0,87 \pm 0,14$ bzw. $0,89 \pm 0,20$ auf. In Klon 9.2 und Klon 14.3 war eine relative Expression von $0,82 \pm 0,11$ bzw. $0,83 \pm 0,19$ vorhanden. Eine stärkere Reduktion wiesen Klon 14.1 und Klon 9.5 auf, mit $0,75 \pm 0,13$ bzw. $0,68 \pm 0,16$. Die geringste Veränderung (auf $0,97 \pm 0,27$) zeigte Klon 9.4, während die *BRCA1*-defiziente HCC1937 eine relative Expression von $0,52 \pm 0,14$ (p-Wert: 0,0255) zeigte, bei es sich um ein verkürztes BRCA1-Protein aufgrund eines mutierten *BRCA1*

Allels (Insertion an Position 5382 (*5382insC*)) handelt [250].

FANCD2 wurde in den BRCA1-Klonen unterschiedlich exprimiert. Die Expression war häufig erhöht, wobei die signifikant höchste relative FANCD2 Expression in Klon 14.1 mit $2,08 \pm 0,13$ (p-Wert: 0,0012) auftrat. Erhöhte Expressionsniveaus wurden in Klon 9.5 ($1,97 \pm 0,28$) (p-Wert: 0,0255), Klon 9.1 ($1,65 \pm 0,09$) (p-Wert: 0,0017), Klon 14.3 ($1,45 \pm 0,30$) und Klon 14.2 ($1,28 \pm 0,11$) beobachtet. Eine leicht erhöhte Expression zeigte Klon 9.3 ($1,10 \pm 0,19$). Eine reduzierte FANCD2 Expression lag bei zwei Exon 9 Klonen vor: Klon 9.4 ($0,96 \pm 0,26$) und Klon 9.2 ($0,71 \pm 0,12$). Die niedrigste FANCD2 Expression zeigte HCC1937 ($0,24 \pm 0,05$) (p-Wert: $<0,0001$). Somit wiesen alle Exon 14 Klone eine vergleichbare oder erhöhte FANCD2 Expression auf. Hingegen führten Veränderungen in Exon 9 zu einer erhöhten, konstanten oder reduzierten FANCD2 Expression.

Eine reduzierte CHK1 Expression wiesen fast alle Klone auf, welche mit der reduzierten BRCA1 Expression korrelierte ($R^2=0,52$; p-Wert: 0,0277), gezeigt in Abb. 3.5.

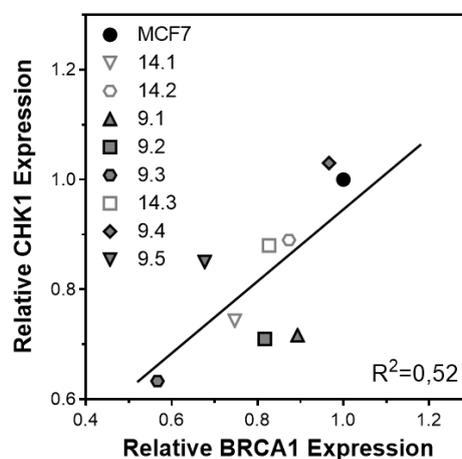


Abbildung 3.5: Korrelation der relativen CHK1 Expression mit der relativen BRCA1 Expression. Dargestellt ist die relative CHK1 Expression gegen die relative BRCA1 Expression der BRCA1-Klone, welche eine Korrelation ($R^2=0,52$; p-Wert: 0,0277) aufwies. Statistisch signifikante Abweichungen: p-Wert $>0,05$ = ns; p-Wert $\leq 0,05$ = * (Student's T-Test).

Bei sechs von acht Klonen ging die reduzierte CHK1 Expression mit einer erhöhten FANCD2 Expression einher, aber es wurde keine Korrelation festgestellt ($R^2=0,26$; p-Wert: 0,1338). Die signifikant stärkste Reduktion auf $0,63 \pm 0,12$ war in Klon 9.3 (p-Wert: 0,0348) vorhanden. Eine leichte Reduktion zeigten Klon 14.2 mit $0,89 \pm 0,14$; Klon 14.3 mit $0,88 \pm 0,12$ und Klon 9.5 mit $0,85 \pm 0,08$. Die CHK1 Expression war auf $0,74 \pm 0,08$ in Klon 14.1 (p-Wert: 0,00312) und in Klon 9.1 auf $0,72 \pm 0,08$ (p-Wert: 0,0198) reduziert. Eine auf $0,71 \pm 0,11$ reduzierte CHK1 Expression zeigte Klon 9.2, jedoch ohne erhöhte FANCD2 Expression. Die Expression blieb in Klon 9.4 mit $1,03 \pm 0,22$ nahezu unverändert. Bei der HCC1937 war die CHK1 Expression leicht erhöht ($1,16 \pm 0,32$).

Eine leicht erhöhte RAD51 Expression war in den meisten BRCA1-Klonen vorhanden. Die höchste relative RAD51 Expression lag in Klon 9.5 mit $1,67 \pm 0,21$ vor. In Klon 14.2 war die RAD51 Expression auf $1,36 \pm 0,56$ erhöht, in Klon 14.3 auf $1,31 \pm 0,50$ und Klon 9.4 auf $1,28 \pm 0,57$. Leicht erhöhte Expressionsniveaus zeigten Klon 14.1 mit $1,05 \pm 0,13$; Klon 9.2 mit $1,14 \pm$

0,41 und Klon 9.3 mit $1,06 \pm 0,42$. Eine reduzierte Expression auf $0,70 \pm 0,13$ wies Klon 9.1 auf. In der HCC1937 war die Expression auf $1,74 \pm 0,97$ erhöht.

Abschließend war die Expression von in der Homologen Rekombination und DNA-Reparatur-relevanten Proteine in den BRCA1-Klonen signifikant verändert. Zusätzlich zu einem reduzierten BRCA1 Expressionsniveau auf maximal 0,57 in Klon 9.3, waren FANCD2 und RAD51 vorwiegend erhöht exprimiert und CHK1 gleichzeitig reduziert. Eine veränderte Expression in diesen HR-Proteinen kann bereits endogen zu mehr DNA-Schäden führen. Diese Schäden wurden im nächsten Abschnitt in den BRCA1-Klonen untersucht.

3.2.2 Endogene DNA-Schäden in den BRCA1-Klonen

Die DNA-Schadensantwort und DNA-Reparatur über die Homologe Rekombination können bereits durch endogene Schäden aktiviert werden. Ein Indiz dafür ist das durch DNA-Schädigung aktivierte monoubiquitinierte FANCD2 in der Synthese-Phase (S-Phase) [56] und die endogene Bildung von spontanen RAD51 Foci, die z.B. nach Überexpression von RAD51 beobachtet wurde [251]. DNA-Doppelstrangbrüche werden über γ H2AX Akkumulation sichtbar [252], während eine unvollständige Replikation über Chromatinbrücken [253] und Mikrokerne [254] charakterisiert werden kann. Der Grad an Monoubiquitinierung von FANCD2 wird durch die L/S Ratio bestimmt. Monoubiquitiniertes FANCD2 ist größer (*large*, L-Bande) als nicht-monoubiquitiniertes FANCD2 (*small*, S-Bande). In Abb. 3.6 (A) ist die FANCD2 Expression und die jeweilige L/S Ratio dargestellt.

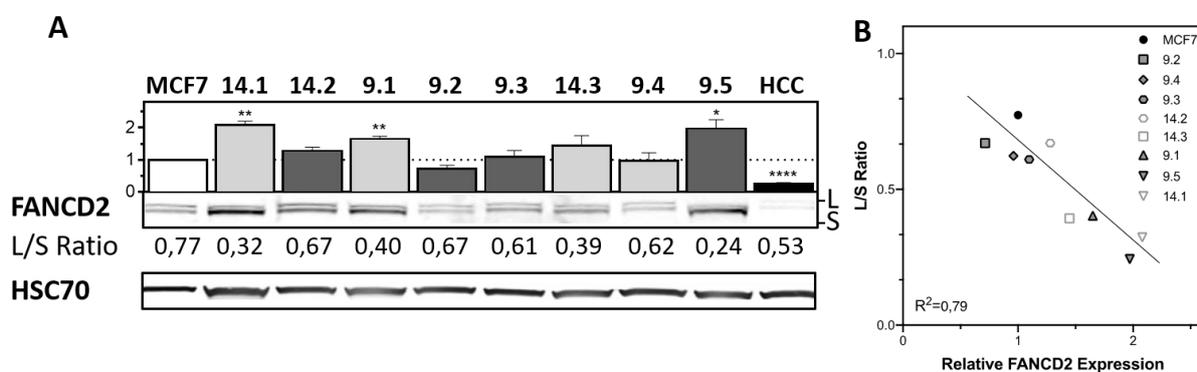


Abbildung 3.6: Erhöhte FANCD2 Expression mit geringerer Monoubiquitinierung in BRCA1-Klonen. Es wurden je 40 μ g Gesamtproteinextrakt exponentiell wachsender Zellen gelelektrophoretisch getrennt und FANCD2 (165 kDa) immunologisch detektiert. HCC1937 (HCC) diente als Negativkontrolle, HSC70 (70 kDa) als Ladekontrolle. Die L/S Ratio wurde durch Subtraktion der oberen (L) durch die untere (S) Bande des FANCD2 Signals ermittelt. (A) Dargestellt ist die Quantifizierung dreier unabhängiger Experimente mit Fehler des Mittelwertes, normiert auf MCF7 Zellen. Die BRCA1-Klone mit zwei intakten Allelen sind in dunkelgrau, die mit einem in hellgrau markiert. Statistisch signifikante Abweichungen: p-Wert $\leq 0,05$ = *; p-Wert $\leq 0,01$ = **; p-Wert $\leq 0,0001$ = **** (Student's T-Test). (B) Inverse Korrelation der L/S Ratio mit der relativen FANCD2 Expression mit $R^2=0,79$; p-Wert: 0,0012.

Eine signifikant reduzierte Monoubiquitinierung von FANCD2 lag in allen BRCA1-Klonen vor, unabhängig vom betroffenen Exon und der Anzahl intakter *BRCA1* Allele. Der Anteil von monoubiquitiniertem FANCD2 wurde durch die L/S Ratio bestimmt. Dabei war es schwierig, die beiden Banden, die nahe beieinanderlagen, zu quantifizieren. Einen signifikant reduzierten Anteil zeigten die folgenden Klone: Klon 14.1 ($0,32 \pm 0,06$; p-Wert: 0,0034), Klon 14.3 ($0,39 \pm$

0,05; p-Wert: 0,0045), Klon 9.1 ($0,40 \pm 0,05$; p-Wert: 0,0047) und Klon 9.5 ($0,24 \pm 0,03$; p-Wert: 0,0006). MCF7 wies eine L/S Ratio von $0,77 \pm 0,04$ auf. Geringe Abweichungen traten in Klon 14.2 ($0,67 \pm 0,03$), Klon 9.2 ($0,67 \pm 0,10$), Klon 9.3 ($0,61 \pm 0,03$; p-Wert: 0,0311) und Klon 9.4 ($0,62 \pm 0,06$) auf. Die HCC1937 zeigte eine L/S Ratio von $0,54 \pm 0,03$ (p-Wert: $<0,0001$). Es war auffällig, dass eine höhere FANCD2 Expression invers mit einer geringeren Monoubiquitinierung korrelierte ($R^2= 0,79$; p-Wert: 0,0012), siehe Abb. 3.6 (B). Der Großteil des FANCD2-Proteins schien in Klonen mit vergleichsweise niedriger FANCD2 Expression aktiviert zu werden. Insgesamt wurde ein überwiegend reduzierter Anteil an monoubiquitiniertem FANCD2 in den Klonen nachgewiesen, welches auf weniger DNA-Schäden während der Replikation hinwies. Die gleichzeitig erhöhte FANCD2 Expression könnte einen Kompensationsmechanismus für die reduzierte BRCA1 Expression darstellen. Die endogen auftretenden DNA-Schäden in den BRCA1-Klonen galt es, weiter zu untersuchen. Dazu wurden γ H2AX als Marker für DSBs [252], spontane RAD51 Foci [251], sowie Chromatinbrücken [253] und Mikrokerne [254] untersucht. Abb. 3.7 zeigt zur genaueren Analyse der endogenen DNA-Schäden in den BRCA1-Klonen die spontanen γ H2AX (A) und RAD51 Foci (B); Chromatinbrücken (C) und Mikrokerne (D) im unbehandelten Zustand.

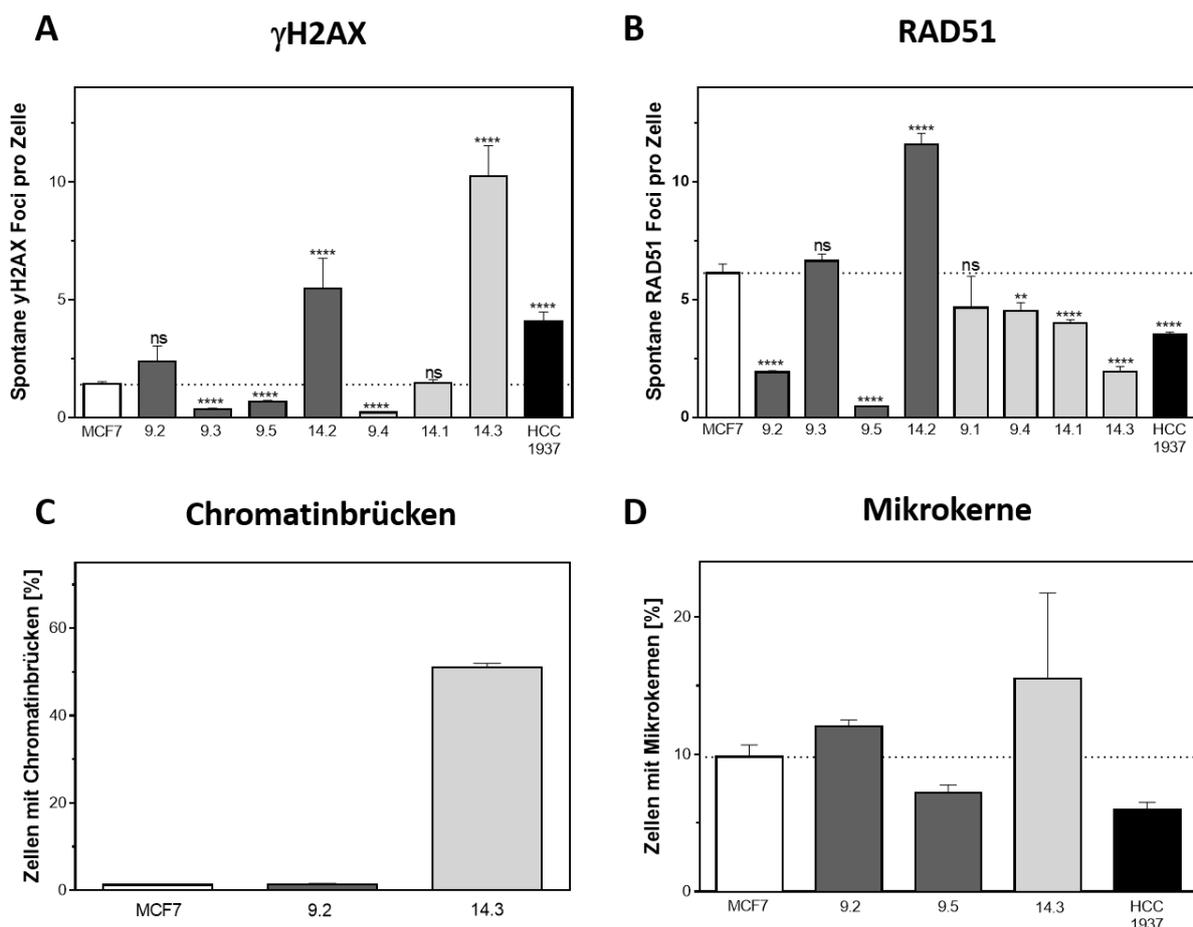


Abbildung 3.7: Veränderte endogene DNA-Schäden in BRCA1-Klonen. Exponentielle MCF7 Zellen wurden fixiert, γ H2AX (A) und RAD51 (B) immunocytochemisch mit entsprechenden Erst- und fluoreszenzgekoppelten Zweitantikörpern und nukleäre DNA mit DAPI gefärbt. Dargestellt ist die Quantifizierung der Foci pro Zelle. MCF7 und HCC1937 dienen zur Kontrolle. (C) Chromatinbrücken wurden mit DAPI gefärbt. Dargestellt ist der prozentuale Anteil unbehandelter Zellen mit Chromatinbrücken. (D) Mikrokerne wurden in exponentiellen Zellen

durch 6 h Cytochalasin B Behandlung, Fixierung und Giemsa-Färbung untersucht. Dargestellt ist die Quantifizierung des prozentualen Anteils von Zellen mit Mikrokernen. Die BRCA1-Klone mit zwei intakten Allelen sind in dunkelgrau, die mit einem in hellgrau markiert.

Es handelt sich um zwei unabhängige Experimente mit Fehler des Mittelwertes. Statistisch signifikante Abweichungen: p-Wert > 0,05 = ns; p-Wert ≤ 0,01 = **; p-Wert ≤ 0,0001 = **** (Student's T-Test).

Weniger DSBs (anhand von γ H2AX) waren in den meisten BRCA1-Klonen vorhanden, teilweise abhängig vom Exon, aber unabhängig von der Anzahl intakter *BRCA1* Allele. Signifikant weniger γ H2AX Foci wurden in den Exon 9 Klonen beobachtet: Klon 9.3 mit $0,36 \pm 0,04$; Klon 9.4 mit $0,22 \pm 0,03$ und Klon 9.5 mit $0,67 \pm 0,06$ (p-Wert: <0,0001). Klon 9.2 zeigte mit $2,39 \pm 0,65$ (p-Wert: 0,2543) nur einen leichten und nicht signifikanten Anstieg. Die signifikant höchste Anzahl spontaner γ H2AX Foci mit $10,25 \pm 1,29$ wies Klon 14.3 auf (p-Wert: <0,0001). Signifikant mehr γ H2AX Foci waren in Klon 14.2 ($5,48 \pm 1,28$) und in der HCC1937 ($4,08 \pm 0,39$) (p-Wert: <0,0001) vorhanden. Eine ähnliche γ H2AX Foci Zahl wie MCF7 ($1,43 \pm 0,08$) zeigte Klon 14.1 mit $1,47 \pm 0,13$ ohne signifikanten Unterschied (p-Wert: 0,7908).

Die Anzahl spontaner RAD51 Foci war deutlich reduziert bei den meisten BRCA1-Klonen. Die Reduktion war unabhängig vom veränderten Exon und der Anzahl intakter Allele. Signifikant weniger RAD51 Foci wiesen folgende Klone auf: Klon 14.1 ($3,75 \pm 1,68$), Klon 14.3 ($1,96 \pm 0,02$), Klon 9.2 ($1,64 \pm 1,29$), Klon 9.4 ($3,68 \pm 1,61$) und Klon 9.5 ($0,45 \pm 0,6$), verglichen zur MCF7 mit $6,13 \pm 1,82$ (p-Wert: < 0,0001 bei Klon 14.1, Klon 14.3, Klon 9.2, Klon 9.5 und der p-Wert bei Klon 9.4: 0,0028). Weniger RAD51 Foci wies Klon 9.1 mit $4,67 \pm 0,00$ auf, aber ohne signifikanten Unterschied zur MCF7 (p-Wert: 0,5536). Signifikant mehr RAD51 Foci mit $11,20 \pm 0,88$ (p-Wert: <0,0001) zeigte Klon 14.2, während Klon 9.3 mit $6,23 \pm 2,45$ (p-Wert: 0,3459) eine leicht erhöhte RAD51 Foci Zahl aufwies. Eine signifikant reduzierte Foci Zahl zeigte die HCC1937 mit $3,54 \pm 1,05$ (p-Wert: <0,0001) verglichen zur MCF7.

Das Auftreten von Chromatinbrücken wurde bei MCF7 und zwei BRCA1-Klonen (Klon 9.2 und Klon 14.3) untersucht. Über 50 % der Zellen in Klon 14.3 wiesen Chromatinbrücken auf ($51,00 \pm 1,00$ %). Nahezu keine Chromatinbrücken lagen in Klon 9.2 ($1,35 \pm 0,25$ %) und der MCF7 ($1,25 \pm 0,25$ %) vor. Der prozentuale Anteil der Zellen mit Mikrokernen wurde in MCF7, Klon 9.2, Klon 14.3, Klon 9.5 und in der HCC1937 bestimmt. Den höchsten Anteil von Zellen mit Mikrokernen wies Klon 14.3 mit $15,49 \pm 6,25$ % auf. Weniger Zellen mit Mikrokernen wurden in Klon 9.5 ($7,21 \pm 0,57$ %) und den HCC1937 ($5,93 \pm 0,58$ %) gefunden. Geringere Unterschiede zeigte Klon 9.2 ($12,05 \pm 0,45$ %) zur MCF7 ($9,82 \pm 0,87$ %). Beispielhafte mikroskopische Aufnahmen sind im Anhang in Abb. A.5 dargestellt.

Zusammenfassend unterschieden sich die endogen auftretenden DNA-Schäden in den Klonen erheblich. Weniger spontane DSBs (γ H2AX Foci) traten in den meisten Klonen auf. Jedoch zeigte ein in Exon 14 veränderter Klon (Klon 14.3) hohe Level an DSBs. Gleichzeitig war die Anzahl der spontanen RAD51 Foci in den meisten Klonen reduziert, in zwei Klonen dagegen erhöht (Klon 14.2 und Klon 9.3). Die verringerte Anzahl von RAD51 Foci deutete auf eine geringere Aktivierung der Homologen Rekombination im unbehandelten Zustand hin. Der Klon mit einem hohen Level an DSBs zeigte auch die höchste Anzahl an Chromatinbrücken und Mikrokernen.

Vermehrte endogene DNA-Schäden können zu einer Verlängerung der G1- und G2-Phase

führen [255, 256]. Ein veränderter Zellzyklus beeinflusst zudem die Proliferation. Die Verteilung und Kontrolle des Zellzyklus hängen von BRCA1 und CHK1 ab, die unabhängig und in Interaktion agieren [109, 110]. Daher wurden im nächsten Abschnitt die Proliferationsrate und die Zellzyklusverteilung in den BRCA1-Klonen analysiert.

3.2.3 Proliferation und Zellzyklusverteilung in den BRCA1-Klonen

Die Proliferationsrate und die Zellzyklusverteilung wurden in den acht BRCA1-Klonen untersucht. MCF7 und HCC1937 wurden zur Kontrolle verwendet. In Abb. 3.8 ist sowohl die Proliferationsrate graphisch und die Verdopplungszeit (h) in tabellarischer Form in (A) als auch die Zellzyklusverteilung in (B) gezeigt.

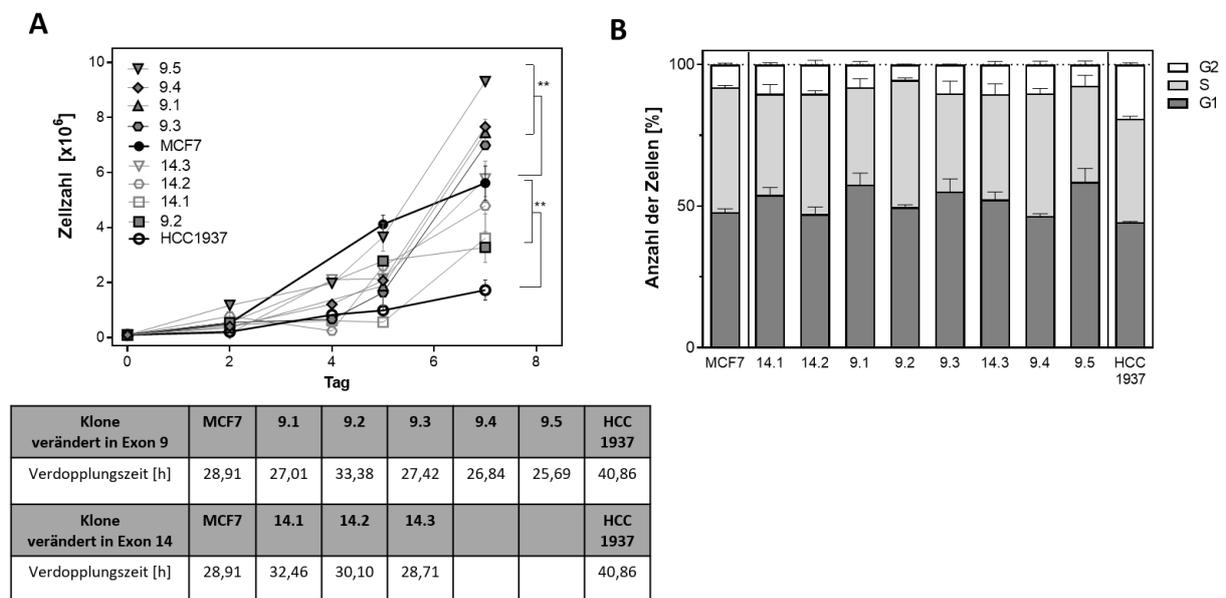


Abbildung 3.8: Proliferationsrate und veränderte Zellzyklusverteilung in BRCA1-Klonen. (A) Die Proliferationsrate wurde in exponentiellen Zellen bis Tag 7 bestimmt. Die Verdopplungszeit (h) aus zwei unabhängigen Experimenten ist tabellarisch dargestellt. Die Fehler stellen den Fehler des Mittelwertes dar. Statistisch signifikante Abweichungen: p-Wert $\leq 0,01 = **$ (Student's T-Test). (B) Die Zellzyklusverteilung wurde in exponentiellen Zellen gemessen, diese fixiert, mit Propidiumiodid gefärbt und die Zellzyklusphase anhand des DNA-Gehalts durchflusszytometrisch bestimmt. Dargestellt sind die prozentualen Anteile der Zellen in G2- (weiß), S- (hellgrau) und G1- (grau) Phase dreier unabhängiger Experimente mit Fehler des Mittelwertes. MCF7 und HCC1937 dienten zur Kontrolle. Abkürzungen: G2-Phase (*gap2 phase*); S-Phase (Synthese-Phase); G1-Phase (*gap1 phase*).

Daten in (B) aus Masterarbeit S. Classen, 2019 [257]

Auffällig war, dass eine signifikant erhöhte Proliferationsrate in allen Exon 9 veränderten Klonen (p-Wert: 0,0018) mit einer kürzeren Verdopplungszeit auftrat: mit 27,01 h für Klon 9.1; 27,42 h für Klon 9.3; 26,84 h für Klon 9.4 und 25,69 h für Klon 9.5, im Vergleich zur MCF7 (28,91 h). Nur ein Exon 9 Klon (Klon 9.2) zeigte eine geringere Proliferationsrate mit einer Verdopplungszeit von 33,38 h. Dagegen führte die Veränderung in Exon 14 zu einer Verlängerung des Zellzyklus mit deutlich niedrigeren Proliferationsraten. Die Exon 14 Klone zeigten im Vergleich zur HCC1937 (40,86 h) eine signifikant erhöhte Proliferationsrate: Klon 14.1 mit 32,46 h; Klon 14.2 mit 30,60 h und Klon 14.3 mit 28,71 h (p-Wert: 0,0086).

Die Zellzyklusverteilung wurde aus dem DNA-Gehalt mit Propidiumiodid-Färbung mittels

Durchflusszytometrie bestimmt und mit der MCF7 verglichen. Eine kürzere S-Phase wiesen alle BRCA1-Klone auf, mit Ausnahme von Klon 9.2. Daraus resultierte in einigen Zellen ein höherer G1- oder G2-Phaseanteil. Ein Anstieg von bis zu 10 % an den Zellen in der G1-Phase trat bei nahezu allen Exon 9 Klonen auf: Klon 9.1 ($57,7 \pm 4,1$ %); Klon 9.3 ($55,3 \pm 4,4$ %) und Klon 9.5 ($58,6 \pm 4,8$ %), verglichen zur MCF7 mit $48,0 \pm 1,1$ %. Der S-Phase-Anteil war in diesen Klonen um etwa 10 % reduziert: Klon 9.1 mit $34,4 \pm 3,0$ %; Klon 9.3 mit $34,6 \pm 4,3$ % und Klon 9.5 mit $34,0 \pm 3,7$ % (MCF7: $44,1 \pm 0,6$ %). Eine Zunahme (um 3 %) der Zellen in der G2-Phase zeigten zwei in Exon 9 veränderte Klone: Klon 9.3 ($10,2 \pm 0,2$ %) und Klon 9.4 ($10,1 \pm 1,2$ %) (MCF7: $7,9 \pm 0,5$ %). Die S-Phase war bei diesen Klonen verkürzt: Klon 9.3 ($34,6 \pm 4,3$ %) und Klon 9.4 ($43,3 \pm 1,7$ %). Ein Exon 9 Klon (Klon 9.2) mit der niedrigsten Proliferationsrate hatte eine ähnliche Zellzyklusverteilung wie die MCF7: eine leicht verkürzte S-Phase ($44,9 \pm 0,7$ %) und G1-Phase ($5,4 \pm 0,2$ %) und etwas längere G2-Phase ($49,7 \pm 0,8$ %). Alle Exon 14 veränderten Klone wiesen eine verkürzte S-Phase und einen erhöhten Anteil von Zellen in der G2-Phase auf. Diese Klone zeigten einen 3 %-igen Anstieg der Zellen in der G2-Phase: Klon 14.1 ($10,3 \pm 0,8$ %), Klon 14.2 ($10,3 \pm 1,5$ %) und Klon 14.3 ($10,4 \pm 1,1$ %). Der S-Phase-Anteil war um etwa 10 % reduziert: Klon 14.1 ($35,6 \pm 3,3$ %), Klon 14.2 ($42,5 \pm 1,1$ %) und Klon 14.3 ($37,2 \pm 3,6$ %). Gleichzeitig war der Anteil an G1-Phase-Zellen erhöht: Klon 14.1 ($54,0 \pm 2,5$ %), Klon 14.3 ($52,4 \pm 2,5$ %) und Klon 14.2 ($47,2 \pm 2,6$ %). Den höchsten Anteil an G2-Phase-Zellen zeigte die HCC1937 Zelllinie mit $19,0 \pm 0,7$ %.

Zusammenfassend zeigten Exon 9 veränderte Klone eine überwiegend erhöhte, Exon 14 veränderte Klone eine niedrigere bzw. unveränderte Proliferationsrate. Eine verkürzte S-Phase und längere G1- oder G2-Phase wiesen sieben der acht Klone Exon-unabhängig auf.

Zusammenfassung 3.2

Zusammenfassend zeigten alle untersuchten BRCA1-Klone eine stabil reduzierte BRCA1 Expression auf maximal 0,57 in Klon 9.3, unabhängig vom veränderten Exon und der Anzahl intakter Allele. Die Expression war dabei stets höher als die, laut Anzahl intakter Allele, erwartete. Eine weitere Folge waren eine zumeist erhöhte FANCD2 und RAD51 Expression und gleichzeitig reduzierte CHK1 Expression. Endogene Schäden lagen reduziert in den meisten Klonen vor, mit einer geringeren FANCD2-Monoubiquitinierung trotz erhöhter Expression von FANCD2. Das Niveau der endogenen DSBs (γ H2AX) war in den Klonen reduziert, bis auf Klon 14.2 und Klon 14.3, und die endogene RAD51 Foci-Bildung zumeist reduziert, bis auf Klon 14.2 und Klon 9.3. Hohe DNA-Schäden anhand von Chromatinbrücken und Mikrokernen zeigte Klon 14.3. Weitere Folgen waren eine überwiegend erhöhte Proliferationsrate in Exon 9 veränderten Klonen, mit Ausnahme von Klon 9.2 mit der niedrigsten Rate. Im Gegensatz dazu führte eine Veränderung in Exon 14 zu einer verringerten oder unveränderten Proliferationsrate. In allen Klonen, bis auf Klon 9.2, war die S-Phase verkürzt, woraus ein höherer Anteil an Zellen in der G1- bzw. G2-Phase resultierte. Das veränderte Auftreten spontaner DNA-Schäden und eine veränderte Proliferation könnten auf einen Defekt in der HR hinweisen. Daher galt es, die funktionellen Aspekte der HR über die relative HR-Kapazität, RAD51 Foci-Bildung nach MMC-Schädigung und das zelluläre Überleben nach verschiedenen DNA-schädigenden Agenzien (MMC, Olaparib und Bestrahlung) zu untersuchen.

3.3 Auswirkungen auf die Homologe Rekombination

Ein Defekt in der RAD51-vermittelten Homologen Rekombination von DNA-Doppelstrangbrüchen wurde bereits in *BRCA1*-defizienten Zellen beschrieben [258]. Diese Zellen wiesen eine Überempfindlichkeit gegenüber DSBs-induzierenden Agenzien auf [258]. Die *BRCA1*-Klone in der vorliegenden Arbeit zeigten jedoch keinen vollständigen Verlust der *BRCA1* Expression. Der Einfluss der reduzierten *BRCA1* Expression auf die HR in den Klonen und eine mögliche Beeinträchtigung wurden im nächsten Abschnitt untersucht.

3.3.1 Relative HR-Kapazität in den *BRCA1*-Klonen

Die relative HR-Kapazität wurde mithilfe des Plasmid-Rekonstruktionsassays (PRA) [259, 260] in den *BRCA1*-Klonen bestimmt, wie in Abb. 3.9 gezeigt. Abb. 3.9 (A) zeigt zunächst den schematischen Ablauf des Plasmid-Rekonstruktionsassays [259, 260]. Ein Plasmid mit einem I-SceI geschnittenen GFP und verkürzten GFP wird in die Zellen transfiziert. HR-profiziente Zellen sind in der Lage, das geschnittene GFP durch Homologe Rekombination unter Verwendung des verkürzten GFP zu reparieren. Daher fluoreszieren diese Zellen in der Durchflusszytometrie grün. Der Anteil dieser GFP-positiven Zellen wurde zur Bestimmung der HR-Kapazität relativ zur MCF7 verwendet, wie in Abb. 3.9 (B) dargestellt.

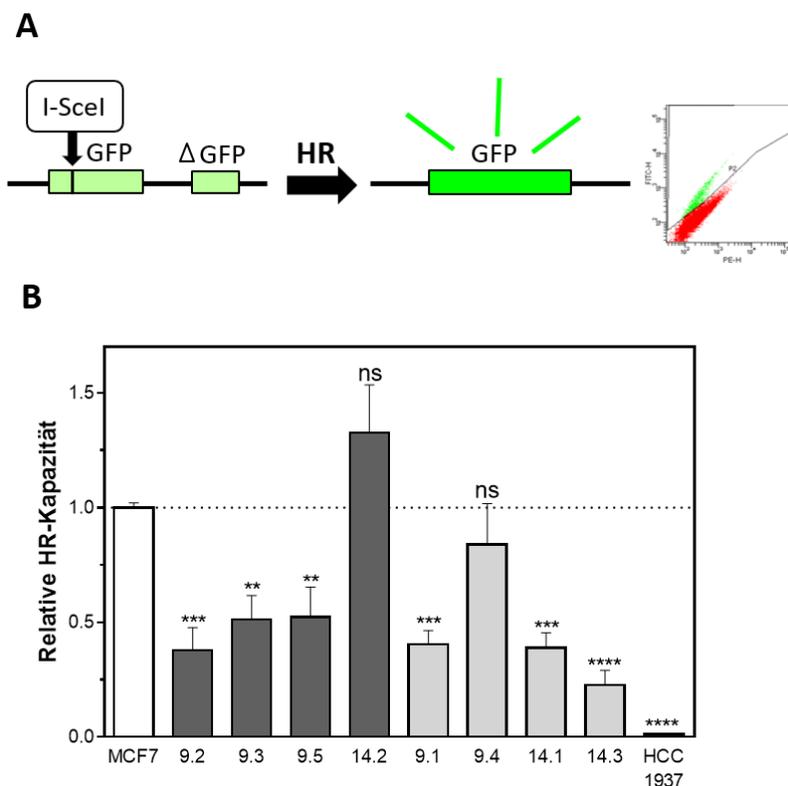


Abbildung 3.9: Reduzierte HR-Kapazität in *BRCA1*-Klonen. (A) Schematische Darstellung des Plasmid-Rekonstruktionsassays und (B) Darstellung der relativen HR-Kapazität in den *BRCA1*-Klonen. HCC1937 diente als Negativkontrolle. Die HR-Kapazität wurde auf MCF7 normiert. Die *BRCA1*-Klone mit zwei intakten Allelen sind in dunkelgrau, die mit einem in hellgrau markiert. Dargestellt ist die Quantifizierung dreier unabhängiger Experimente mit Fehler des Mittelwertes dar. Statistisch signifikante Abweichungen: p-Wert > 0,05 = ns; p-Wert \leq 0,01 = **; p-Wert \leq 0,001 = ***; p-Wert \leq 0,0001 = **** (Student's T-Test).

(B) aus Masterarbeit S. Classen, 2019 [257] und aus [261]

Die relative HR-Kapazität war signifikant reduziert bei den meisten BRCA1-Klonen, unabhängig von dem veränderten Exon und der Anzahl intakter *BRCA1* Allele. Alle Exon 9 Klone zeigten eine signifikante Reduktion: Klon 9.1 ($0,40 \pm 0,06$), Klon 9.2 ($0,38 \pm 0,10$), Klon 9.3 ($0,51 \pm 0,11$) und Klon 9.5 ($0,52 \pm 0,13$) (p-Werte: 0,0002; 0,0008; 0,0031 und 0,0080). Klon 9.4 zeigte ebenfalls eine Reduktion ($0,84 \pm 0,18$), jedoch ohne Signifikanz. Ein in Exon 14 veränderter Klon (Klon 14.2) erhöhte jedoch die HR-Kapazität auf $1,33 \pm 0,21$. Dieser Klon zeigte zudem ein hohes Niveau an spontanen DSBs und RAD51 Foci (siehe Kapitel 3.2). Die niedrigste HR-Kapazität mit einer Reduktion von 77 % ($0,23 \pm 0,06$ (p-Wert: $<0,0001$)) wies Klon 14.3 auf, der zudem ein hohes Niveau an endogenen DNA-Schäden aufwies (siehe Kapitel 3.2). Die relative HR-Kapazität war signifikant reduziert in Klon 14.1 auf $0,39 \pm 0,06$ (p-Wert: 0,0003). Die insgesamt niedrigste HR-Kapazität trat in der Negativkontrolle HCC1937 ($0,01 \pm 0,004$) mit einer Signifikanz von p-Wert $<0,0001$ auf. Vorwiegend wiesen die BRCA1-Klone erwartungsgemäß eine reduzierte HR-Kapazität. Dieser mögliche HR-Defekt wurde in den nächsten Schritten weiter definiert.

3.3.2 RAD51 Foci-Bildung nach MMC-Schädigung

Die Bildung von RAD51 Foci nach DNA-Schäden ist ein weiterer Hinweis auf eine HR-Profizienz. Als DNA-schädigendes Agens wurde das bifunktionelle Alkylans MMC (engl. *mitomycin C*) verwendet. Dieses interkaliert in die DNA und verbindet die DNA-Stränge kovalent miteinander [262], wobei dieser Schaden weitgehend über die Homologe Rekombination repariert wird. Eine potenziell beeinträchtigte Rekrutierung von RAD51 – initiiert 6 Stunden nach MMC-Schädigung – wurde in den BRCA1-Klonen analysiert (in Abb. 3.10 gezeigt). Beispielhafte immunocytochemische Aufnahmen der RAD51 Foci in Klon 9.2 sind in (A) dargestellt und in (B) die Quantifizierung der Anzahl der RAD51 Foci 6 Stunden nach MMC-Behandlung aller BRCA1-Klone, der MCF7 und HCC1937.

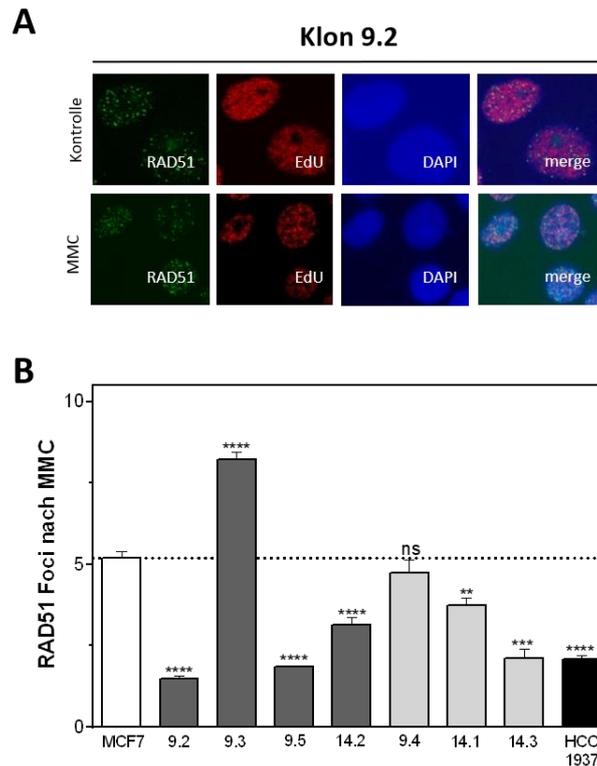


Abbildung 3.10: Verminderte RAD51 Foci-Bildung in BRCA1-Klonen. Exponentielle Zellen wurden mit EdU-Puls markiert (rot), mit MMC behandelt, fixiert und immunocytochemisch mit entsprechenden Erst- und Zweitantikörpern und nukleäre DNA mit DAPI gefärbt. Dargestellt sind RAD51 Foci (grün) des Klons 9.2 (**A**) und in (**B**) die Quantifizierung aller BRCA1-Klone zweier unabhängiger Experimente mit Fehler des Mittelwertes. MCF7 und HCC1937 dienen zur Kontrolle. Die BRCA1-Klone mit zwei intakten Allelen sind in dunkelgrau, die mit einem in hellgrau markiert. Statistisch signifikante Abweichungen: p-Wert > 0,05 = ns; p-Wert ≤ 0,01 = **; p-Wert ≤ 0,001 = ***; p-Wert ≤ 0,0001 = **** (Student's T-Test).

Eine verminderte RAD51 Foci-Bildung trat in allen BRCA1-Klonen, bis auf Klon 9.3, auf. Es gab dabei weder eine Abhängigkeit vom Exon, noch von der Zahl intakter Allele. Klon 9.3 zeigte signifikant mehr RAD51 Foci ($7,80 \pm 0,55$; p-Wert: $<0,0001$) im Vergleich zur MCF7 ($5,21 \pm 0,19$). Weniger RAD51 Foci zeigten alle anderen Exon 9 Klone: Klon 9.4 mit $4,63 \pm 1,02$ (p-Wert: $0,3627$) und Klon 9.5 mit $1,79 \pm 0,19$ (p-Wert: $<0,0001$). Die niedrigste Anzahl an RAD51 Foci trat in Klon 9.2 mit $1,33 \pm 0,42$ (p-Wert: $<0,0001$) auf, wie als Beispiel in Abb. 3.10 (A) dargestellt. Alle Exon 14 Klone waren in der Bildung der RAD51 Foci beeinträchtigt: Klon 14.1 mit $3,76 \pm 0,23$ (p-Wert: $0,0079$), Klon 14.2 mit $3,18 \pm 0,22$ (p-Wert: $<0,0001$) und Klon 14.3 mit $2,02 \pm 0,33$ (p-Wert: $0,0006$). Die HCC1937 zeigte eine RAD51 Foci Anzahl von $2,09 \pm 1,38$ (p-Wert: $<0,0001$). Die BRCA1-Klone zeigten 6 Stunden nach Schädigung eine eingeschränkte Bildung von RAD51-Foci. Es wurde weiter untersucht, ob die RAD51 Foci-Auflösung zusätzlich zur eingeschränkten Bildung beeinträchtigt war. Daher wurden die residuellen RAD51 Foci 24 Stunden nach der Schädigung mit MMC untersucht und andere Stressindikatoren wie γ H2AX, Chromatinbrücken und Mikrokerne analysiert.

3.3.3 Exogene DNA-Schäden durch MMC

Signifikante Unterschiede in Bezug auf die endogenen DNA-Schäden in den BRCA1-Klonen wurden bereits in dem Abschnitt 3.2 festgestellt. Eine Zunahme dieser DNA-Schäden 24 Stunden nach MMC-induzierter exogener Schädigung wurde ebenfalls durch die Analyse von γ H2AX und RAD51 Foci, Chromatinbrücken und Mikrokernen beobachtet. Abb. 3.11 zeigt signifikante Unterschiede in den DNA-Schäden in den BRCA1-Klonen nach MMC-Behandlung. Für Klon 9.2, Klon 14.2 und Klon 14.3 sowie MCF7 und HCC1937 sind die γ H2AX (A) und RAD51 Foci (B); für Klon 9.2, Klon 14.3 und MCF7 die Chromatinbrücken (C) und für Klon 9.2, Klon 9.5 und Klon 14.3 sowie für die Kontrollen die Mikrokern (D) dargestellt.

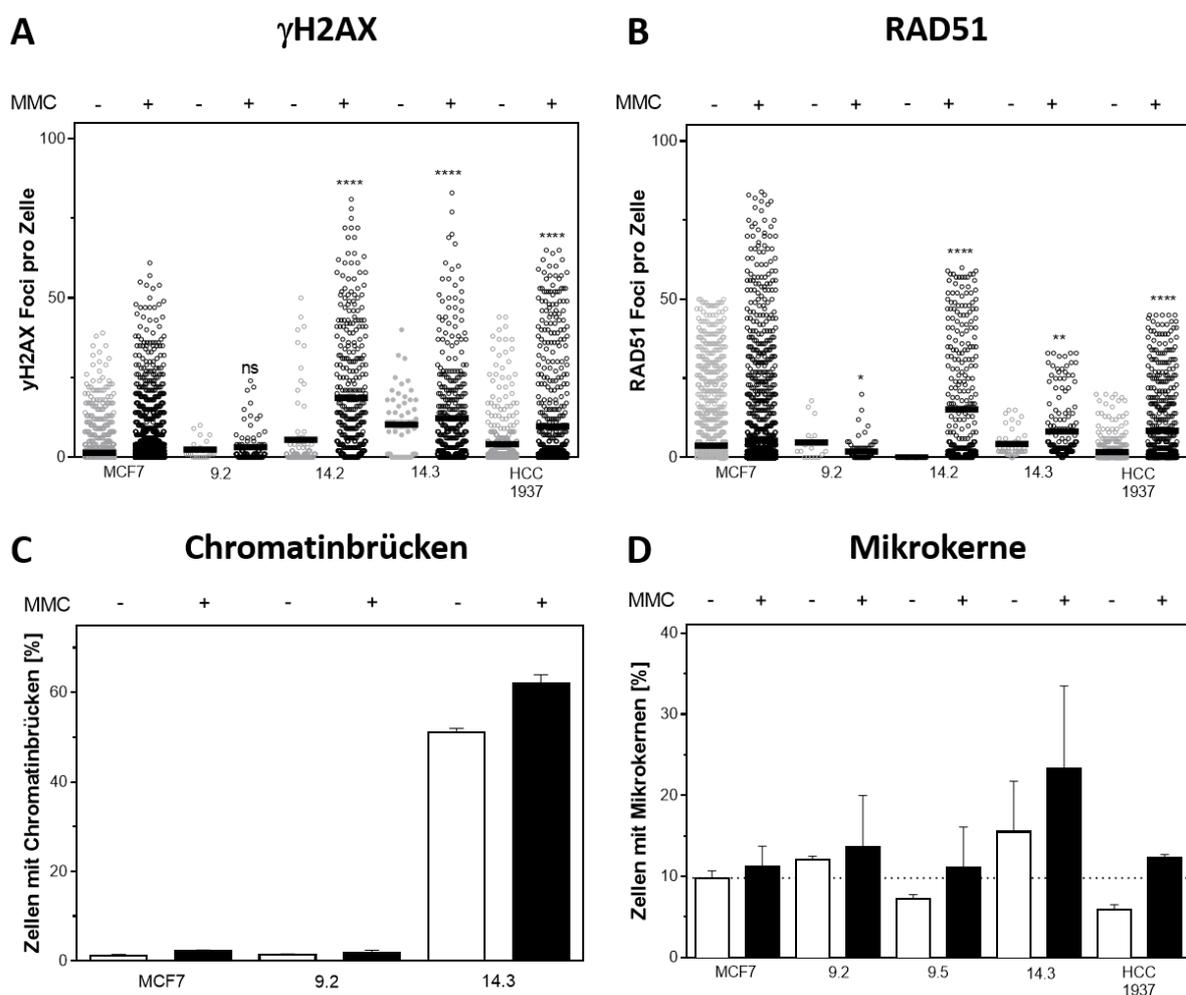


Abbildung 3.11: Veränderte Level an DNA-Schäden nach MMC in BRCA1-Klonen. Exponentielle MCF7 Zellen wurden mit MMC behandelt, nach 24 h fixiert, γ H2AX (A) und RAD51 (B) immuncytochemisch mit spezifischen Erst- und fluoreszenzgekoppelten Zweitantikörpern und nukleäre DNA mit DAPI gefärbt. Dargestellt ist die Quantifizierung der Foci pro Zelle. MCF7 und HCC1937 dienten zur Kontrolle. (C) Chromatinbrücken wurden mit DAPI gefärbt. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der Zellen mit Chromatinbrücken unbehandelt und MMC-behandelt. (D) Mikrokern wurden in exponentiellen und mit MMC-behandelten Zellen nach 6 h Cytochalasin B Behandlung, Fixierung und Giemsa-Färbung untersucht. Dargestellt ist der prozentuale Anteil von Zellen mit Mikrokernen. Es handelt sich um zwei unabhängige Experimente mit Fehler des Mittelwertes. Statistisch signifikante Abweichungen: p-Wert > 0,05 = ns; p-Wert \leq 0,05 = *; p-Wert \leq 0,01 = **; p-Wert \leq 0,0001 = **** (Student's T-Test).

Deutliche Unterschiede in den MMC-induzierten DSBs (γ H2AX) traten in den BRCA1-Klonen auf. Signifikant mehr DSBs waren in Klon 14.2 mit $18,91 \pm 1,04$ und Klon 14.3 mit $12,26 \pm 0,79$ (p-Wert: $<0,0001$) im Vergleich zur MCF7 ($3,56 \pm 0,16$) vorhanden. Ein Exon 14 veränderter Klon (Klon 14.1) zeigte weniger DSBs mit $0,76 \pm 0,07$ (p-Wert: $<0,0001$). Alle Exon 9 Klone wiesen weniger DSBs auf: Klon 9.2 mit $3,12 \pm 0,54$ (in Abb. 3.11, p-Wert: 0,5982), Klon 9.3 mit $0,72 \pm 0,07$; Klon 9.4 mit $1,46 \pm 0,15$ und Klon 9.5 $1,43 \pm 0,11$ Foci pro Zelle (p-Wert: $<0,0001$) (Daten sind in der Abb. 3.11 nicht gezeigt). Die HCC1937 wies mehr γ H2AX Foci auf als die MCF7 ($9,72 \pm 0,67$; p-Wert: $<0,0001$).

Die signifikant höchste Anzahl an RAD51 Foci nach MMC zeigte Klon 14.2 ($15,21 \pm 1,03$; p-Wert: $<0,0001$) im Vergleich zur MCF7 ($5,28 \pm 0,28$), wie auch Klon 14.3 mit $8,22 \pm 0,75$ Foci (p-Wert: 0,0069). Eine signifikant reduzierte RAD51 Foci Zahl lag in Klon 9.2 ($1,86 \pm 0,35$; p-Wert: 0,018) vor. Die Anzahl an RAD51 Foci nach MMC war ebenfalls reduziert in Klon 9.4 mit $1,48 \pm 0,12$; Klon 9.3 mit $0,49 \pm 0,05$ und Klon 9.5 mit $0,26 \pm 0,02$ (Daten sind in der Abb. 3.11 nicht gezeigt). Die HCC1937 wies eine signifikant höhere RAD51 Foci Anzahl mit $8,47 \pm 0,52$ (p-Wert: $<0,0001$) auf. Die Anzahl der Zellen mit Chromatinbrücken stieg in Klon 14.3 von $51,00 \pm 1,00$ % auf $62,00 \pm 2,00$ % nach MMC an. Nahezu keine Zellen mit Chromatinbrücken wies Klon 9.2 mit $1,35 \pm 0,25$ % vor und $1,9 \pm 0,05$ % nach MMC auf; ähnlich wie die MCF7, die vor der Behandlung $1,25 \pm 0,25$ % Zellen mit Chromatinbrücken zeigte, die nach der Behandlung auf $2,25 \pm 0,25$ % anstiegen.

Der Anteil an Zellen mit Mikrokernen nach MMC stieg in den BRCA1-Klonen an. Den höchsten Anstieg wies Klon 14.3 auf, welcher im Vergleich zur MCF7 signifikant mehr Zellen mit Mikrokernen vor ($15,49 \pm 6,25$ %) und nach MMC zeigte ($23,29 \pm 10,19$ %) (MCF7: vor MMC: $9,81 \pm 0,87$ % und nach MMC: $11,21 \pm 2,51$ %). Klon 9.2 und Klon 9.5 wiesen vor ($12,05 \pm 0,45$ % bzw. $7,21 \pm 0,57$ %) und nach der Behandlung ($13,57 \pm 6,43$ % bzw. $11,06 \pm 5,06$ %) eine ähnliche Anzahl wie die MCF7 auf. Die HCC1937 zeigte einen zweifachen Anstieg des Anteils von $5,93 \pm 0,58$ % auf $12,25 \pm 0,45$ %. Beispielhafte mikroskopische Aufnahmen sind in Anhang in Abb. A.6 gezeigt.

Abschließend war die Anzahl der MMC-induzierten DNA-Schäden in den in Exon 14 veränderten Klonen erhöht, wobei Klon 14.3 die höchsten Werte aufwies, charakterisiert durch den erhöhten Anteil an γ H2AX und RAD51 Foci sowie an Chromatinbrücken und an mikronukleären Zellen. Bei den meisten Exon 9 veränderten Klonen traten weniger DNA-Schäden auf. Ein möglicher Einfluss dieser unterschiedlichen DNA-Schäden — endogen und nach MMC-Behandlung — auf das zelluläre Überleben nach MMC wurde im nächsten Abschnitt in den BRCA1-Klonen untersucht. Die MMC-Sensitivität stellt eine weitere Charakterisierung eines möglichen HR-Defekts dar [258].

3.3.4 Überleben nach MMC

BRCA1-defiziente Zellen reagieren häufig sensitiv gegenüber MMC [258], welches eine HR-Defizienz kennzeichnet. Ein möglicher HR-Defekt in den BRCA1-Klonen wurde über die Sensitivität gegen MMC spezifiziert. Das zelluläre Überleben der BRCA1-Klone sowie von MCF7 und HCC1937 nach ansteigenden Konzentrationen MMC ist in Abb. 3.12 gezeigt.

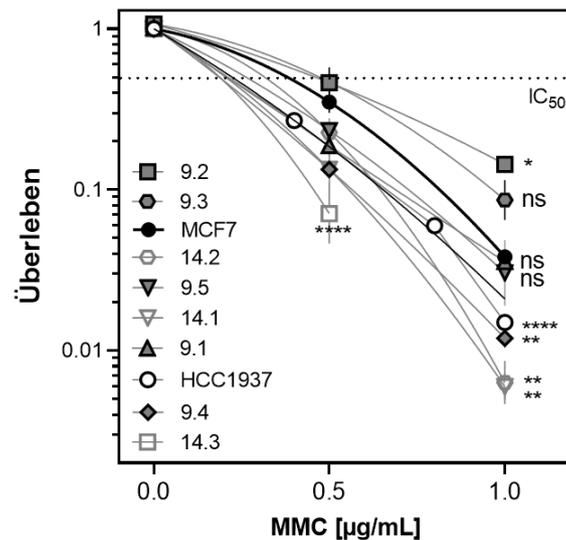


Abbildung 3.12: Signifikante Unterschiede im Überleben nach MMC in BRCA1-Klonen. Exponentielle Zellen wurden mit ansteigenden Konzentrationen von MMC behandelt, fixiert, gefärbt und die Kolonien gezählt. MCF7 und HCC1937 dienten zur Kontrolle. Dargestellt sind die Werte dreier unabhängiger Experimente mit Fehler des Mittelwertes. Statistisch signifikante Abweichungen: p-Wert > 0,05 = ns; p-Wert ≤ 0,05 = *; p-Wert ≤ 0,01 = **; p-Wert ≤ 0,0001 = **** (Student's T-Test).

Daten aus Masterarbeit S. Classen, 2019 [257]

Signifikante Unterschiede im zellulären Überleben nach MMC waren in den BRCA1-Klonen vorhanden, die mit dem IC_{50} -Wert [263] bestimmt wurden. Die Mehrheit der Klone zeigte eine erhöhte MMC-Sensitivität. Alle Exon 14 Klone waren signifikant empfindlicher als die MCF7. Die IC_{50} -Werte dieser Klone waren: Klon 14.1 mit 0,20 µg/ml; Klon 14.2 mit 0,31 µg/ml und Klon 14.3 mit 0,18 µg/ml (MCF7: 0,39 µg/ml). Klon 14.1 wies eine Plattierungseffizienz (PE) nach 1 µM MMC von $0,01 \pm 0,00$ genauso wie Klon 14.2, und Klon 14.3 mit $0,00 \pm 0,00$ als sensitivster Klon (MCF7: $0,04 \pm 0,00$) (p-Werte: Klon 14.1: 0,0016; Klon 14.2: 0,0054; Klon 14.3: <0,0001). Exon 9 veränderte Klone waren teilweise sensitiver und teilweise resistenter. Die sensitiven Klone (Klon 9.4 und Klon 9.5) hatten IC_{50} -Werte von 0,18 bzw. 0,26 µg/ml und ein signifikant schlechteres Überleben (PE: $0,01 \pm 0,00$ bzw. $0,03 \pm 0,02$) (Klon 9.4: p-Wert: 0,0051)). Die beiden resistenten Klone, Klon 9.2 und Klon 9.3, zeigten jeweils einen IC_{50} -Wert von 0,46 µg/ml und signifikant besseres Überleben (PE: $0,14 \pm 0,02$ bzw. $0,09 \pm 0,03$) (Klon 9.2: p-Wert: 0,029). Klon 9.1 zeigte eine ähnliche MMC-Empfindlichkeit wie MCF7 mit einer PE von $0,04 \pm 0,00$. Die HCC1937 wies ein besseres Überleben als einige Klone auf mit einem IC_{50} -Wert von 0,20 µg/ml und einem signifikant schlechteren Überleben nach 1 µM MMC mit einer PE von $0,01 \pm 0,00$ (p-Wert: <0,0001). Eine signifikant höhere MMC-Sensitivität zeigten darüber hinaus Klone mit einem intakten *BRCA1* Allel im Vergleich zur MCF7 mit drei intakten *BRCA1* Allelen (p-Wert: <0,0001), wie in Abb. 3.13 dargestellt. Die BRCA1-Klone mit einem intakten Allel unterschieden sich ebenfalls signifikant von denen mit zwei intakten Allelen (p-Wert: 0,0125).

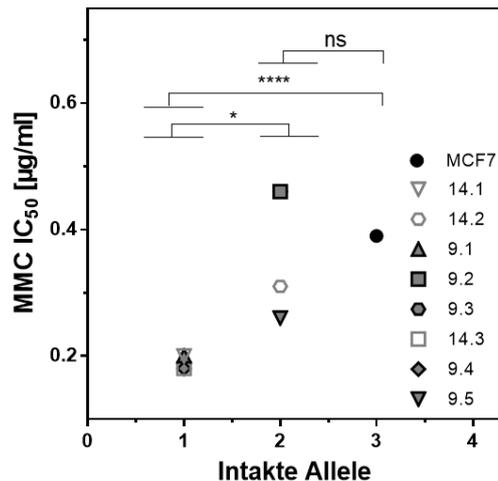


Abbildung 3.13: Abhängigkeit der MMC-Sensitivität von der Anzahl intakter *BRCA1* Allele in MCF7. Zwei intakte Allele bedingten teilweise Resistenzen, ein *BRCA1* Allel eine erhöhte Sensitivität gegenüber MMC. Dabei zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen den *BRCA1*-Klonen mit einem Allel und zwei *BRCA1* Allelen, sowie zwischen den *BRCA1*-Klonen mit einem intakten Allel zur MCF7 mit drei intakten *BRCA1* Allelen. Statistisch signifikante Abweichungen: p-Wert > 0,05 = ns; p-Wert ≤ 0,05 = *; p-Wert ≤ 0,0001 = **** (Student's T-Test).

Insgesamt führte eine Veränderung in Exon 14 von *BRCA1* zu einer erhöhten Sensitivität gegenüber MMC, wobei die höchste Sensitivität in Klon 14.3 auftrat. Veränderungen in Exon 9 verursachten nicht nur eine erhöhte Sensitivität in den meisten Klonen, sondern auch eine Resistenz in zwei Klonen (Klon 9.2 und Klon 9.3). Zwei Klone (Klon 14.3 und Klon 9.4) zeigten zudem eine höhere MMC-Sensitivität als die HCC1937.

3.3.5 Überleben nach PARP1-Inhibition mit Olaparib

Die überwiegend erhöhten Sensitivitäten deuteten auf einen Defekt in der Homologen Rekombination hin. Zur weiteren Bestätigung wurde die Sensitivität gegenüber der Inhibition von PARP1 (engl. *poly ADP-ribose polymerase 1*) mit Olaparib in den *BRCA1*-Klonen bestimmt. Olaparib (KU0059436) ist einer der ersten PARP1 Inhibitoren [142], die eine synthetische Letalität in Kombination mit einer HR-Defizienz zeigten [141, 142, 143].

In Abb. 3.14 (A) ist das zelluläre Überleben nach PARP1-Inhibition mit ansteigenden Olaparib-Konzentrationen in den *BRCA1*-Klonen, der MCF7 und HCC1937 dargestellt. Das zelluläre Überleben anhand der PE nach 2,00 µM Olaparib ist als Säulendiagramm in Abb. 3.14 (B) gezeigt.

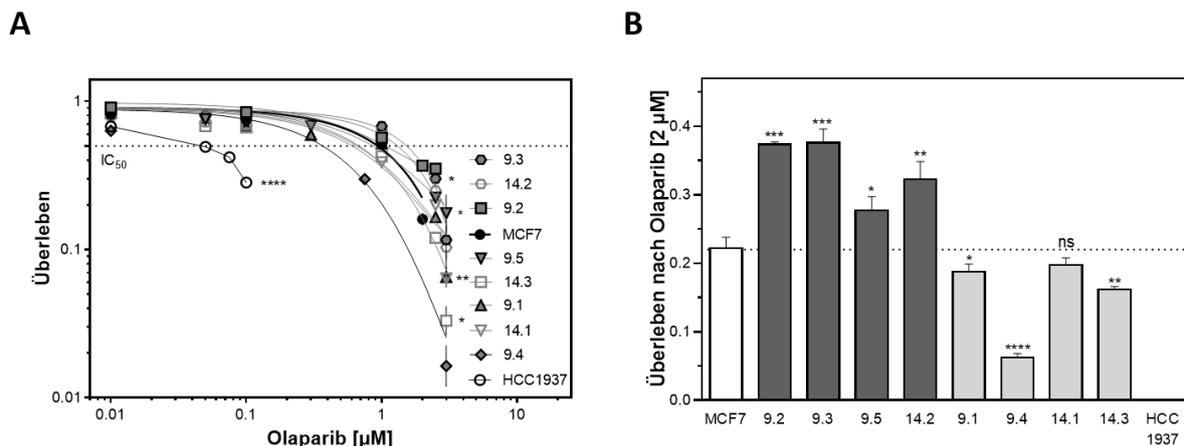


Abbildung 3.14: Signifikante Unterschiede im Überleben nach PARP1-Inhibition in BRCA1-Klonen. Exponentielle Zellen wurden mit ansteigenden Konzentrationen von Olaparib behandelt, fixiert, gefärbt und die Kolonien gezählt. MCF7 und HCC1937 dienten zur Kontrolle. Die BRCA1-Klone mit zwei intakten Allelen sind in dunkelgrau, die mit einem in hellgrau markiert. Dargestellt sind die Werte dreier unabhängiger Experimente mit Fehler des Mittelwertes. Das gesamte Überleben nach ansteigenden Konzentrationen ist in (A) und das Überleben nach 2,0 µM Olaparib anhand der Plattierungseffizienz in (B) gezeigt. Statistisch signifikante Abweichungen: p-Wert > 0,05 = ns; p-Wert ≤ 0,05 = *; p-Wert ≤ 0,01 = **; p-Wert ≤ 0,001 = ***; p-Wert ≤ 0,0001 = **** (Student's T-Test).

Signifikante Unterschiede im zellulären Überleben nach PARP1-Inhibition waren in den BRCA1-Klonen vorhanden. Eine erhöhte Sensitivität gegenüber Olaparib zeigten die meisten Klone, welches durch den IC_{50} -Wert [263] bestätigt wurde. Eine erhöhte Resistenz trat jedoch bei zwei Klone auf: Klon 14.2 (IC_{50} : 1,40 µM) und Klon 9.3 (IC_{50} : 1,70 µM; p-Wert: 0,032) (MCF7: IC_{50} : 1,00 µM). Eine erhöhte Olaparib-Sensitivität zeigten Klon 9.5 (0,80 µM; p-Wert: 0,0276), Klon 14.3 (IC_{50} : 0,70 µM; p-Wert: 0,0161) und Klon 9.1 (IC_{50} : 0,60 µM; p-Wert: 0,0045), wobei Klon 14.1 und Klon 9.4 mit einem IC_{50} -Wert von 0,40 µM die sensitivsten Klone waren. Keinen veränderten IC_{50} -Wert von 1,00 µM besaß Klon 9.2. Die höchste Empfindlichkeit gegenüber Olaparib wies die HCC1937 mit einem IC_{50} -Wert von 0,03 µM auf. Zusätzlich zu Klon 14.2 und Klon 9.3 wurden zwei weitere Klone (Klon 9.2 und Klon 9.5) als resistent identifiziert, über die PE nach 2,00 µM Olaparib. Die größte überlebende Zellfraktion mit signifikantem Unterschied zur MCF7 lag bei Klon 9.3 mit einer PE von $0,38 \pm 0,02$ (p-Wert: 0,0004) vor, gefolgt von Klon 9.2 mit $0,37 \pm 0,02$ (p-Wert: 0,0002) und Klon 9.5 mit einer PE von $0,28 \pm 0,02$ (p-Wert: 0,0191). Eine niedrigere PE als die MCF7 ($0,22 \pm 0,02$) zeigte Klon 9.1 mit $0,19 \pm 0,01$ (p-Wert: 0,0296). Zwei der drei in Exon 14 veränderten Klone wiesen ebenfalls eine verringerte, teilweise signifikant reduzierte PE im Vergleich zur MCF7 ($0,22 \pm 0,02$) auf: Klon 14.1 mit $0,20 \pm 0,01$ (p-Wert: 0,0777, ns) und Klon 14.3 mit $0,16 \pm 0,004$ (p-Wert: 0,0038). Hingegen zeigte Klon 14.2 mit einer PE von $0,32 \pm 0,03$ (p-Wert: 0,004) eine signifikant höhere PE als die MCF7. Nahezu keine überlebende Zellfraktion zeigten Klon 9.4 mit $0,06 \pm 0,01$ (p-Wert: <0,0001) und die HCC1937 mit $0,00 \pm 0,00$ nach 2,00 µM Olaparib. Es war auffällig, dass die Olaparib-Sensitivität von der Anzahl intakter Allele abhängig war. BRCA1-Klone mit zwei intakten Allelen zeigten eine erhöhte Olaparib-Resistenz, während Klone mit einem intakten *BRCA1* Allel eine erhöhte Sensitivität aufwiesen, wie in Abb. 3.15 dargestellt.

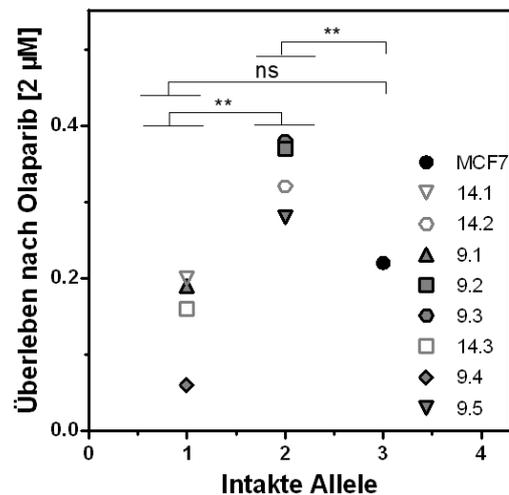


Abbildung 3.15: Abhängigkeit der Olaparib-Sensitivität von der Anzahl intakter *BRCA1* Allele in MCF7. Zwei intakte Allele bedingen Resistenzen, ein *BRCA1* Allel eine erhöhte Sensitivität gegenüber Olaparib. Dabei zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen den *BRCA1*-Klonen mit einem Allel und zwei *BRCA1* Allelen, sowie zwischen den *BRCA1*-Klonen mit zwei intakten Allelen zur MCF7 mit drei intakten *BRCA1* Allelen. Statistisch signifikante Abweichungen: p-Wert > 0,05 = ns; p-Wert ≤ 0,01 = ** (Student's T-Test).

Die Klone mit zwei intakten Allelen und einer erhöhten Olaparib-Resistenz unterschieden sich signifikant von der MCF7 mit drei intakten Allelen (p-Wert: 0,0023). Einen ebenfalls signifikanten Unterschied zeigten die *BRCA1*-Klone mit einem intakten *BRCA1* Allel (Olaparib-sensitiv) zu den Klonen mit zwei *BRCA1* Allelen (Olaparib-resistent) (p-Wert: 0,0034). Die unterschiedlichen Olaparib-Sensitivitäten bestätigten weitgehend einen HR-Defekt bei einigen *BRCA1*-Klonen. Olaparib verursacht hauptsächlich S-Phase-spezifische Schäden, da PARP1 auf der Replikationsgabel gehalten wird (engl. *trapping*) und somit ein Hindernis während der Replikation darstellt, was zu einem ein-endiger DNA-Doppelstrangbruch führt [142]. Folglich kann der HR-Defekt hauptsächlich replikationsassoziierte Funktionen in den Olaparib-sensitiven Klonen eingeschränkt haben.

Neben der Reparatur von Schäden wie DNA-Strang-Vernetzungen (durch MMC) oder ein-endigen DSBs (durch Olaparib) ist die Homologe Rekombination wichtig für die Reparatur von strahlungsinduzierten Schäden in der S-Phase [149]. Der DSB stellt eine biologisch signifikante Läsion dar und ist daher potenziell letal für die Zelle. Ionisierende Strahlung erzeugt meist Einzelstrangbrüche und Basenschäden, die mit der Replikationsgabel kollidieren und ein-endige DSBs verursachen [264], die über die HR repariert werden müssen. Eine erhöhte Strahlenempfindlichkeit ist daher ein Anzeichen für eine defekte HR. Das zelluläre Überleben nach ionisierender Strahlung wurde in den *BRCA1*-Klonen bestimmt.

3.3.6 Überleben nach ionisierender Strahlung

Signifikante Unterschiede im zellulären Überleben nach ansteigender Dosis ionisierender Strahlung zeigten die *BRCA1*-Klone, wie in Abb. 3.16 dargestellt.

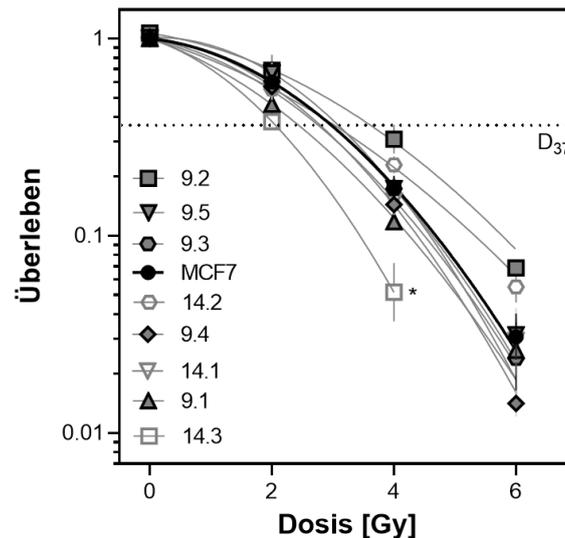


Abbildung 3.16: Signifikante Unterschiede im Überleben nach Bestrahlung in BRCA1-Klonen. Exponentielle Zellen wurden mit ansteigender Dosis bestrahlt, fixiert, gefärbt und die Kolonien gezählt. MCF7 und HCC1937 dienten zur Kontrolle. Dargestellt sind die Werte dreier unabhängiger Experimente mit Fehler des Mittelwertes. Statistisch signifikante Abweichungen: p -Wert $\leq 0,05 = *$ (Student's T-Test).

Daten aus Masterarbeit S. Classen, 2019 [257]

Die Radiosensitivität wurde in den BRCA1-Klonen auf Grundlage des zellulären Überlebens nach ionisierender Strahlung unter Verwendung der Dosis D_{37} bestimmt. D_{37} ist die Dosis, bei der statistisch jede Zelle mindestens ein letales Ereignis erfährt und 37 % der Zellen überleben. Eine deutliche Radioresistenz wiesen zwei in Exon 9 veränderte BRCA1-Klone auf, verglichen zur MCF7 (D_{37} : 3,0 Gy): Klon 9.2 (D_{37} : 3,6 Gy) und Klon 9.5, (D_{37} : 3,1 Gy). Alle Klone, die in Exon 14 verändert waren, wurden radiosensitiver: Klon 14.1 mit D_{37} von 2,8 Gy und Klon 14.2 mit D_{37} von 2,9 Gy. Die höchste Strahlenempfindlichkeit besaß ein Klon, welcher in Exon 14 verändert war (Klon 14.3), mit einer D_{37} von 2,0 Gy. Die anderen Exon 9 Klone waren radiosensitiver als die MCF7: Klon 9.4 mit D_{37} von 2,8 Gy und Klon 9.1 mit D_{37} von 2,4 Gy. Klon 9.3 zeigte eine ähnliche Radiosensitivität wie die MCF7 (D_{37} : 3,0 Gy). Die Unterschiede im zellulären Überleben nach 6 Gy wurden durch die PEs der Klone deutlich. Ein signifikant schlechteres Überleben nach 6 Gy bzw. keine überlebende Zellfraktion wies Klon 14.3 mit einer PE von $0,00 \pm 0,00$ (p -Wert: 0,0335) auf. Eine höhere PE zeigten einige Klone: Klon 9.2 mit $0,07 \pm 0,00$ und Klon 14.2 mit $0,06 \pm 0,01$ (MCF7: $0,03 \pm 0,01$), während andere BRCA1-Klone eine reduzierte PE aufwiesen wie Klon 9.3 mit $0,02 \pm 0,01$ und Klon 9.4 mit $0,01 \pm 0,00$. Eine zur MCF7 ähnliche PE zeigten Klon 9.1, Klon 9.5 und Klon 14.1 mit einer PE von $0,03 \pm 0,01$.

Das zelluläre Überleben nach 4 Gy ionisierender Strahlung korrelierte zudem signifikant mit der relativen HR-Kapazität (siehe Kapitel 3.3, Abb. 3.9), dargestellt in Abb. 3.17 (A) ($R^2=0,85$, p -Wert: 0,0012) und war abhängig von der Anzahl intakter Allele (Abb. 3.17 (B)). Die Strahlenempfindlichkeit (basierend auf dem Überleben nach 4 Gy) in den Klonen mit zwei *BRCA1* Allelen unterschied sich signifikant im Vergleich zu den Klonen mit einem *BRCA1* Allel (p -Wert: 0,0398) (Abb. 3.17 (B)). Weiterhin zeigten die BRCA1-Klone mit einem *BRCA1* Allel

einen signifikanten Unterschied zur MCF7 mit drei Allelen (p-Wert: 0,0025), wie in Abb. 3.17 (B) gezeigt.

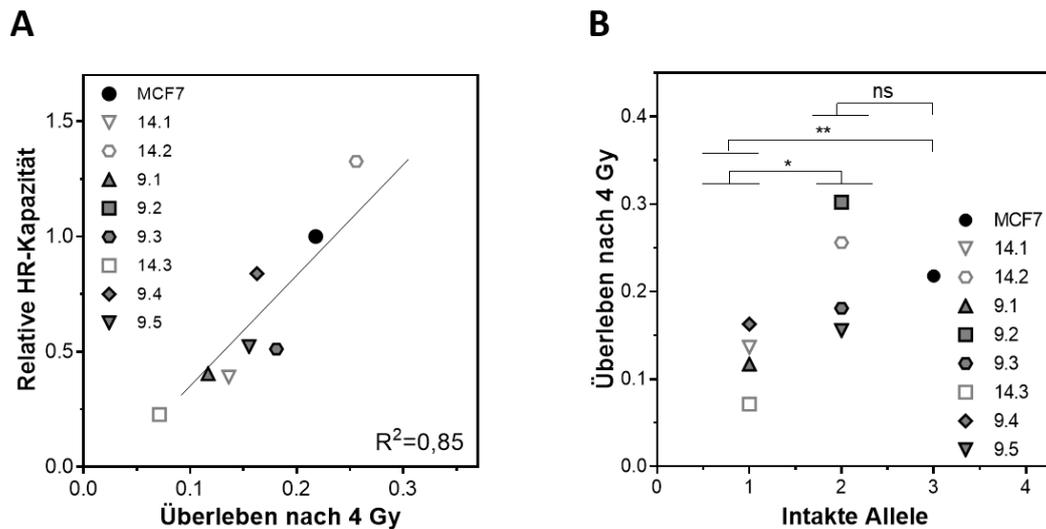


Abbildung 3.17: Abhängigkeit des zellulären Überlebens nach 4 Gy von der relativen HR-Kapazität und Anzahl intakter *BRCA1* Allele. In (A) ist die relative HR-Kapazität der *BRCA1*-Klone und MCF7 gegen das zelluläre Überleben nach 4 Gy aufgetragen, dieses korrelierte signifikant miteinander ($R^2=0,85$; p-Wert: 0,0012). In (B) ist das zelluläre Überleben nach 4 Gy gegen die Anzahl intakter *BRCA1* Allele aufgetragen. Dabei zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen den *BRCA1*-Klonen mit einem Allel und zwei *BRCA1* Allelen, sowie zwischen den *BRCA1*-Klonen mit einem intakten Allel zur MCF7 mit drei intakten *BRCA1* Allelen. Statistisch signifikante Abweichungen: p-Wert > 0,05 = ns; p-Wert ≤ 0,05 = *; p-Wert ≤ 0,01 = ** (Student's T-Test).

Abschließend zeigten alle in Exon 14 veränderten Klone eine höhere Strahlenempfindlichkeit, während zwei in Exon 9 veränderte Klone (Klon 9.2 und Klon 9.5) eine höhere Resistenz aufwiesen.

Zusammenfassung 3.3

Die Funktionalität der HR war unterschiedlich in den *BRCA1*-Klonen eingeschränkt. Eine reduzierte HR-Kapazität, bis auf Klon 14.2, lag in allen Klonen vor. Eine maximale Reduktion um 77 % zeigte Klon 14.3. Die Initiierung von RAD51 Foci nach MMC war ebenfalls vermindert in den Klonen, bis auf Klon 9.3. Gleichzeitig waren exogen durch MMC induzierte DNA-Schäden in den Klonen erhöht, bis auf Klon 9.2. Das höchste Niveau an DSBs (γ H2AX Foci), Chromatinbrücken und Mikrokernen nach MMC wies Klon 14.3 auf. Ein möglicher HR-Defekt wurde über Untersuchungen des zellulären Überlebens nach DNA-schädigenden Agenzien wie MMC, Olaparib und ionisierender Strahlung spezifiziert. Alle Exon 14 Klone und die meisten Exon 9 Klone waren sensitiver gegenüber MMC, wobei die höchste Empfindlichkeit Klon 14.3 aufwies. Dieser Klon zeigte zudem das höchste Niveau an DNA-Schäden und die niedrigste HR-Kapazität. Eine erhöhte Resistenz zeigten zwei Exon 9 Klone (Klon 9.2 und Klon 9.3). Die unterschiedliche Empfindlichkeit gegen PARP1-Inhibition bestätigte in Klonen mit zwei veränderten Allelen und Exon-unabhängig einen HR-Defekt aufgrund erhöhter Sensitivität, während Klone mit einem veränderten Allel resistenter wurden. Die Empfindlichkeit gegen ionisierende Strahlung war in allen Exon 14 veränderten Klonen höher, mit der höchsten Sensitivität in Klon 14.3. Im Gegensatz dazu wurde die höchste Radioresistenz in Klon 9.2, der

ebenfalls MMC-resistent war, beobachtet. Dieser Klon zeigte zudem den niedrigsten Anteil an G2-Phasezellen (siehe Kapitel 3.2). Ein weiterer Exon 9 Klon (Klon 9.5) war ebenfalls radioresistent.

Eine mögliche Ursache für die unterschiedlichen Empfindlichkeiten der BRCA1-Klone stellen veränderte Tumorstammzeleigenschaften dar, die im nächsten Abschnitt betrachtet wurden.

3.4 Tumorstammzeleigenschaften

Als Ursache für die unterschiedlichen Sensitivitäten und Resistenzen wurden in diesem Abschnitt die Eigenschaften von Tumorstammzellen und der Anteil an Tumorstammzellen in den BRCA1-Klonen im Vergleich zur MCF7 analysiert. Tumorstammzellen (CSCs, engl. *cancer stem cells*) sind für das Auftreten von Radioresistenzen verantwortlich [198, 199] und zeichnen sich durch die Expression bestimmter Stammzellmarker und einen mesenchymalen Phänotyp aus [207, 265]. BRCA1 spielt sowohl in normalen Stammzellen [230] als auch im malignen Kontext eine wesentliche Rolle [231]. Die Charakterisierung des Tumorstammzellstatus in den BRCA1-Klonen erfolgte zunächst über die Zellmorphologie, anschließend über die Expression von EMT-Markern und über die Aktivität von ALDH (engl. *aldehyde dehydrogenase*).

3.4.1 Zellmorphologie der BRCA1-Klone

Eine zellmorphologische Veränderung der BRCA1-Klone wurde im Vergleich zur MCF7 untersucht. Die MCF7 ist durch einen epithelialen Phänotyp mit einer runden Zellenmorphologie gekennzeichnet. Abb. 3.18 zeigt beispielhafte lichtmikroskopische Aufnahmen von der MCF7 und drei BRCA1-Klonen (Klon 14.1, Klon 9.4 und Klon 9.2).

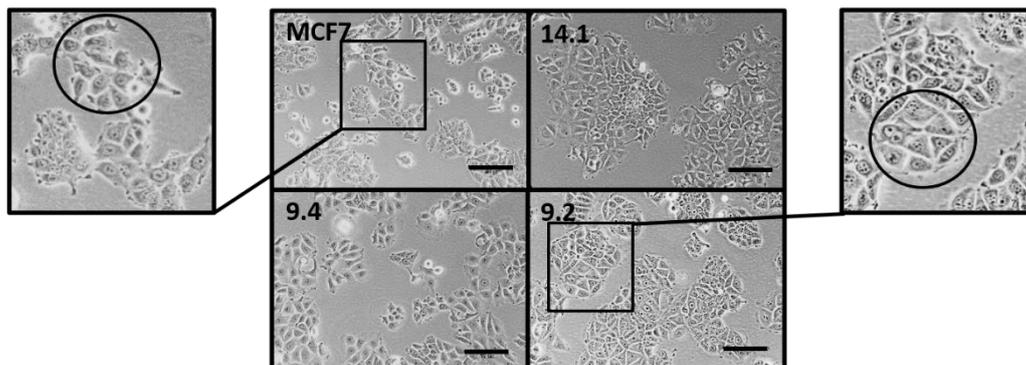


Abbildung 3.18: Zellmorphologische Veränderungen von Klon 9.2. Beispielhafte Darstellung der lichtmikroskopischen Aufnahmen von MCF7 und von den BRCA1-Klonen (Klon 14.1, Klon 9.4 und Klon 9.2). Genauere morphologische Strukturen in MCF7 und in Klon 9.2 sind über den Digitalen Zoom (1.08) vergrößert und mit Kreisen markiert. Maßstab 140 μm , Objektiv 20x, 1.08 Digital Zoom.

Deutliche zellmorphologische Veränderungen wurden in Klon 9.2 festgestellt: Die Zellen waren größer, spindelförmiger und anders organisiert, was auf einen mesenchymalen Phänotyp hinweist [266]. Die MCF7 hingegen zeigte keine solche Organisation und wies runde Zellen aufgrund ihrer epithelialen Merkmale auf [239]. Die epitheliale Zellmorphologie

veränderte sich in den restlichen Klonen nicht, im Vergleich zur MCF7. Klon 14.1 und Klon 9.4 sind beispielhaft dargestellt.

3.4.2 Expression von EMT- und Tumorstammzell-Markern in den BRCA1-Klonen

Tumorstammzellen zeichnen sich durch eine hohe Expression des Stammzellmarkers ALDH1 [213, 267] und mesenchymaler Marker [266] aus, während der Verlust des epithelialen Markers E-Cadherin einen invasiven Phänotyp unterstützt [268]. Weiterhin ist eine erhöhte ZEB1 Expression in CSCs bereits bekannt [269]. Daher wurde die Expression dieser Marker in BRCA1-Klonen nachgewiesen und mit der MCF7 verglichen. In Abb. 3.19 ist die Expression von EMT-Markern (ZEB1 und E-Cadherin) und des universellen Stammzellmarkers ALDH1A1 in den BRCA1-Klonen, in der MCF7 und in der HCC1937 gezeigt.

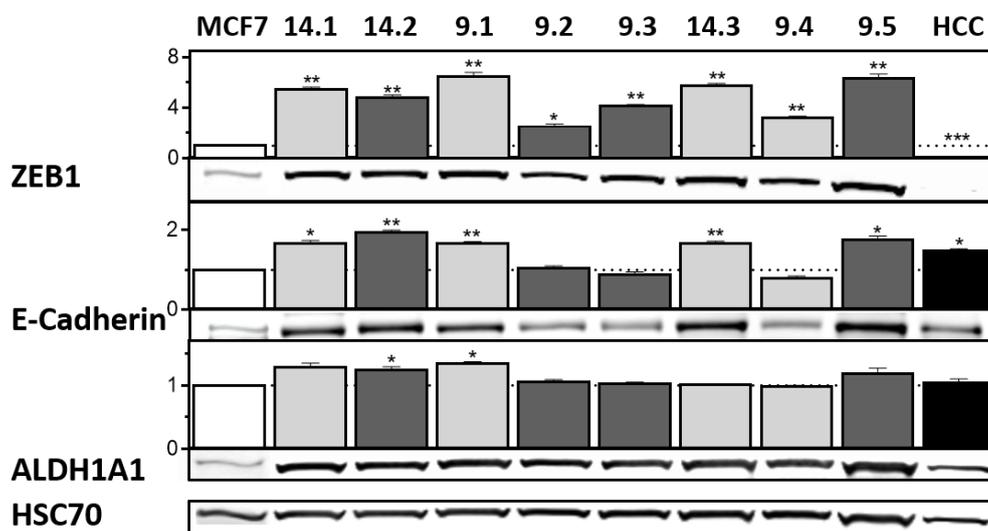


Abbildung 3.19: Veränderte Expression von EMT- und Tumorstammzellmarkern in BRCA1-Klonen. Es wurden je 40 µg Gesamtproteinextrakt exponentiell wachsender Zellen gelelektrophoretisch getrennt und ZEB1 (130 kDa), E-Cadherin (110 kDa), ALDH1A1 (55 kDa), und HSC70 (70 kDa) immunologisch detektiert. HCC1937 (HCC) diente als Negativkontrolle, HSC70 als Ladekontrolle. Dargestellt ist die Quantifizierung zweier unabhängiger Experimente mit Fehler des Mittelwertes, normiert auf MCF7 Zellen. Die BRCA1-Klone mit zwei intakten Allelen sind in dunkelgrau, die mit einem in hellgrau markiert. Statistisch signifikante Abweichungen: p-Wert ≤ 0,05 = *; p-Wert ≤ 0,01 = **; p-Wert ≤ 0,001 = *** (Student's T-Test).

Die Expression des in die EMT involvierten Transkriptionsfaktors ZEB1 war signifikant in allen BRCA1-Klonen erhöht, wobei die höchste relative Expression in Klon 9.1 ($6,50 \pm 0,30$) und Klon 9.5 ($6,34 \pm 0,34$) (p-Werte: Klon 9.1: 0,0029; Klon 9.5: 0,0039) auftrat. In allen Exon 14 veränderten Klonen war die ZEB1 Expression in ähnlicher Weise erhöht: Klon 14.3 ($5,72 \pm 0,21$), Klon 14.1 ($5,43 \pm 0,23$) und Klon 14.2 ($4,76 \pm 0,26$) (p-Werte: Klon 14.3: 0,0021; Klon 14.1: 0,0026; Klon 14.2: 0,0046). Eine drei- bis vierfach erhöhte ZEB1 Expression war in den Exon 9 Klonen vorhanden: Klon 9.3 ($4,13 \pm 0,13$), Klon 9.4 ($3,17 \pm 0,17$) und Klon 9.2 ($2,52 \pm 0,22$) (p-Werte: Klon 9.3: 0,0016; Klon 9.4: 0,0061; Klon 9.2: 0,0196). Die niedrigste ZEB1 Expression wies die HCC1937 mit $0,07 \pm 0,02$ auf (p-Wert: 0,0005).

Deutliche Unterschiede bezogen auf die E-Cadherin Expression zeigten die BRCA1-Klone. Einige Exon 9 veränderte Klone wiesen eine erhöhte E-Cadherin Expression (Klon 9.1 mit 1,66

$\pm 0,06$; Klon 9.5 mit $1,76 \pm 0,09$) auf, während andere eine reduzierte bzw. nahezu unveränderte Expression zeigten (Klon 9.2 mit $1,05 \pm 0,06$; Klon 9.3 mit $0,88 \pm 0,07$ und Klon 9.4 mit $0,80 \pm 0,06$) (p-Werte: Klon 9.1: 0,007; Klon 9.5: 0,0137). In allen Exon 14 veränderten Klonen war eine signifikant erhöhte Expression von E-Cadherin vorhanden (Klon 14.1 mit $1,67 \pm 0,07$; Klon 14.2 mit $1,95 \pm 0,06$ und Klon 14.3 mit $1,66 \pm 0,06$) (p-Werte: Klon 14.1: 0,0107; Klon 14.2: 0,0034; Klon 14.3: 0,0082). In der HCC1937 war die Expression auf $1,47 \pm 0,07$ (p-Wert: 0,019) erhöht.

Eine leicht erhöhte ALDH1A1 Expression trat in einigen BRCA1-Klonen auf. Zu diesen gehörten Klon 14.1 mit $1,28 \pm 0,07$; Klon 14.2 mit $1,25 \pm 0,04$; Klon 9.1 mit $1,34 \pm 0,04$ und Klon 9.5 mit $1,19 \pm 0,08$, diese zeigten gleichzeitig eine erhöhte E-Cadherin Expression (Klon 14.2: p-Wert: 0,0321; Klon 9.1: p-Wert: 0,0107). In Klon 9.2 und Klon 9.3 war die ALDH1A1 Expression leicht erhöht auf $1,05 \pm 0,05$ bzw. $1,03 \pm 0,02$. Hingegen wiesen Klon 9.4 mit $0,99 \pm 0,01$ und Klon 14.3 mit $1,01 \pm 0,01$ nahezu keine veränderte ALDH1A1 Expression auf, wie die HCC1937 mit $1,04 \pm 0,06$.

3.4.3 Aktivität des Tumorstammzellmarkers ALDH1

Die veränderte Zellmorphologie und die veränderte Expression der Tumorstammzell-relevanten Proteine deuteten auf einen erhöhten Anteil an CSCs in einigen BRCA1-Klonen hin. Eine weitere Charakterisierung der CSCs erfolgte über die Aktivität von ALDH [213] im *ALDEFLUOR*TM Assay, da eine hohe Aktivität in CSCs beschrieben wurde [213].

Abb. 3.20 zeigt den prozentualen Anteil Aldefluor-positiver Zellen in den BRCA1-Klonen, in der MCF7 und in der HCC1937. Die Aldefluor-positiven Zellen lassen einen Rückschluss auf die Aktivität von ALDH zu. In (A) sind beispielhafte Streulicht-Diagramme der MCF7, der HCC1937 und von zwei Klonen (Klon 9.2 und Klon 14.1) gezeigt. Die prozentuale Quantifizierung aller BRCA1-Klone ist in (B) dargestellt.

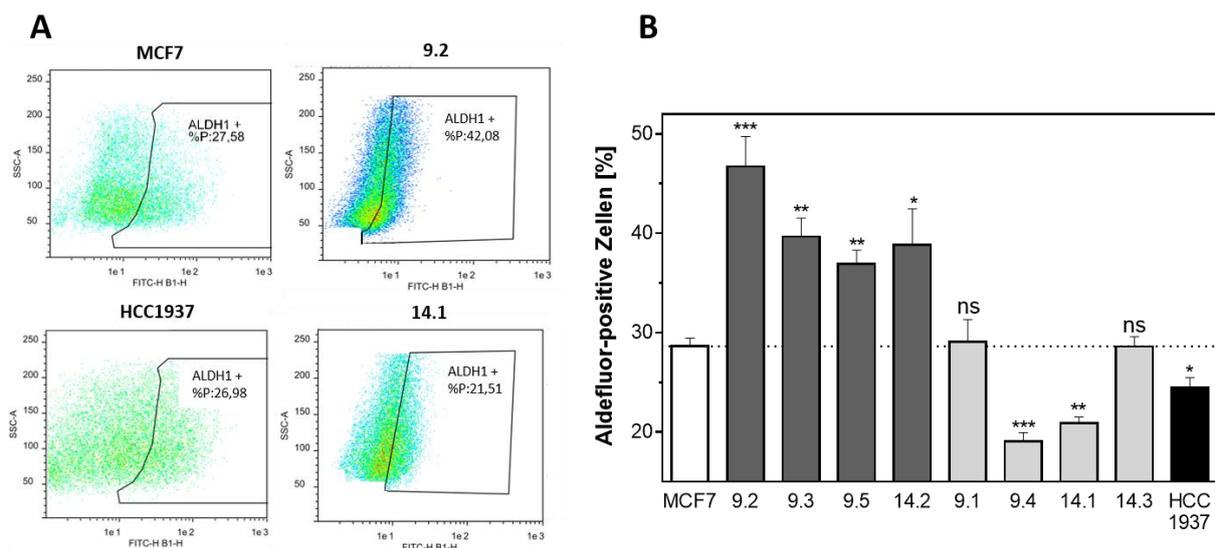


Abbildung 3.20: BRCA1 Reduktion beeinflusst Stammzellartigkeit in MCF7. In exponentiellen Zellen wurde die Aktivität von ALDH mithilfe des *ALDEFLUOR*TM Assays durchflusszytometrisch bestimmt. MCF7 und HCC1937 dienten zur Kontrolle. In (A) sind beispielhafte Streulicht-Diagramme von MCF7, HCC1937 und den BRCA1-Klonen (Klon 9.2, Klon 14.1) dargestellt und in (B) die Quantifizierung des prozentualen Anteils Aldefluor-positiver Zellen dreier unabhängiger Experimente mit Fehler des Mittelwertes. Die BRCA1-Klone mit zwei intakten Allelen sind in

dunkelgrau, die mit einem in hellgrau markiert. Statistisch signifikante Abweichungen: p-Wert > 0,05 = ns; p-Wert ≤ 0,05 = *; p-Wert ≤ 0,01 = **; p-Wert ≤ 0,001 = *** (Student's T-Test).

Signifikante Unterschiede in der Aktivität von ALDH zeigten sich bei den BRCA1-Klonen im Vergleich zur MCF7. Einen signifikanten Anstieg in der ALDH-Aktivität wiesen folgende Klone auf: Klon 9.2 mit $46,73 \pm 2,99$ %; Klon 9.3 mit $39,67 \pm 1,86$ %; Klon 9.5 mit $36,91 \pm 1,39$ % und Klon 14.2 mit $38,84 \pm 3,63$ % im Vergleich zur MCF7 ($28,63 \pm 0,81$ %) (p-Werte: 0,0003; 0,0012; 0,0014 und 0,0119). Diese Klone waren in einem der drei *BRCA1* Allele verändert. Ein signifikant reduzierter Anteil an Zellen mit aktiver ALDH lag in Klon 14.1 mit $20,89 \pm 0,62$ % und in Klon 9.4 mit $19,09 \pm 0,86$ % vor (p-Werte: 0,0026 und 0,0003). Keine Unterschiede zur MCF7 zeigten Klon 9.1 mit $29,05 \pm 2,26$ % und Klon 14.3 mit $28,62 \pm 0,98$ %. In diesen Klonen war nur ein intaktes *BRCA1* Allele vorhanden. Die HCC1937 hatte einen Anteil Aldefluor-positiver Zellen von $24,49 \pm 0,99$ % (p-Wert: 0,0135). Die Unterschiede in der ALDH-Aktivität in den BRCA1-Klonen wurden durch eine unterschiedliche Anzahl intakter *BRCA1* Allele bedingt, wie in Abb. 3.21 dargestellt.

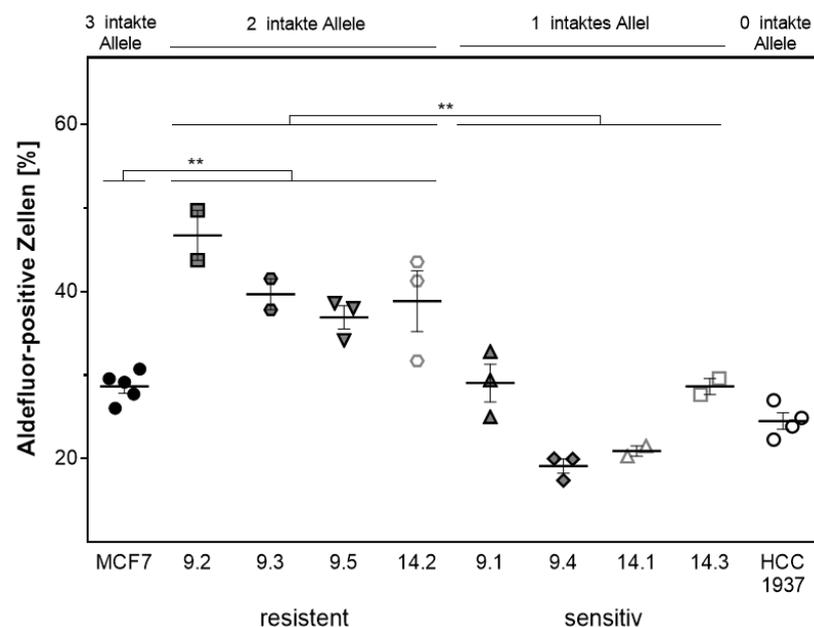


Abbildung 3.21: Abhängigkeit des CSC-Anteils (Aldefluor-positive Zellen (%)) von der Zahl intakter *BRCA1* Allele in MCF7. Dargestellt ist der prozentuale Anteil Aldefluor-positiver Zellen (entspricht den CSCs) und die Anzahl der *BRCA1* Allele in MCF7, den BRCA1-Klonen und der HCC1937. Zwei intakte *BRCA1* Allele bedingten einen erhöhten Anteil Aldefluor-positiver Zellen und Resistenzen im Vergleich zur MCF7, während ein intaktes Allele eine Verringerung und eine erhöhte Sensitivität erzeugte. Statistisch signifikante Abweichungen: p-Wert ≤ 0,01 = ** (Student's T-Test).

Klone mit zwei intakten *BRCA1* Allelen zeigten einen erhöhten prozentualen Anteil Aldefluor-positiver Zellen und eine erhöhte Resistenz mit einem signifikanten Unterschied zur MCF7 mit drei intakten *BRCA1* Allelen (p-Wert: 0,014). Diese Klone unterschieden sich signifikant zu den BRCA1-Klonen mit einem intakten Allele (p-Wert: 0,003). Im Gegensatz dazu wiesen die BRCA1-Klone mit nur einem intakten Allele einen reduzierten oder unveränderten CSC-Anteil auf, ohne

signifikanten Unterschied zur MCF7 (p-Wert: 0,1533, ns); diese Klone waren durch eine erhöhte Sensitivität charakterisiert.

Zusammenfassung 3.4

Folgen der BRCA1 Reduktion in den MCF7-Klonen waren ein veränderter Anteil der Tumorstammzellen, welcher eine Ursache für die unterschiedlichen Sensitivitäten darstellt. Ein Klon (Klon 9.2) zeigte ausgeprägte zellmorphologische Veränderungen zu einem mesenchymalen und spindelförmigen Phänotyp. Darüber hinaus wurde in allen BRCA1-Klonen eine dynamisch veränderte Expression des epithelialen Markers E-Cadherin und eine erhöhte Expression des regulatorischen Transkriptionsfaktors ZEB1 beobachtet. Der universelle Stammzellmarker ALDH1A1 war nur geringfügig erhöht. Jedoch wies die Messung der Aktivität der ALDH auf eine veränderte Tumorstammzellfraktion in den Klonen hin. Dabei führte ein verändertes *BRCA1* Allel zu einer erhöhten Aktivität in Klon 9.2, Klon 9.3, Klon 14.2 und Klon 9.5 und zu einer erhöhten Resistenz. Im Gegensatz dazu resultierten zwei veränderte *BRCA1* Allele in einer verringerten oder unveränderten Tumorstammzellfraktion, welches eine erhöhte Empfindlichkeit verursachte.

3.5 Einfluss auf die intrazelluläre Immunantwort

Der Anteil an CSCs unterschied sich signifikant in den BRCA1-Klonen. Es ist bekannt, dass CSCs DNA-Reparaturwege wie die HR hochregulieren [203]. Aufgrund dieser gesteigerten Reparaturkapazität würde man bei Zellen mit hoher Stammzellartigkeit weniger DNA-Schäden und weniger DNA-Fragmente im Cytosol erwarten. In Zellen mit einem HR-Defekt (*RAD51*-depletierte Zellen) konnte bereits gezeigt werden, dass diese nach Bestrahlung dsDNA (engl. *double-stranded DNA*) im Cytosol akkumulierten, wodurch die intrazelluläre Immunantwort über den cGAS-STING Signalweg aktiviert wurde [190]. Die Auswirkungen einer reduzierten BRCA1 Expression und dadurch verminderten HR-Kapazität in den BRCA1-Klonen mit unterschiedlichem CSC-Anteil wurden auf einen strahlungsinduzierten Anstieg der cytosolischen dsDNA untersucht. Eine Aktivierung der intrazellulären Immunantwort in den BRCA1-Klonen nach Bestrahlung wurde durch die mRNA Expression immunrelevanter Gene analysiert. Zu diesen Genen gehörten *IL-6* (*Interleukin 6*) [270], *CXCR4* (engl. *C-X-C-Motif chemokine receptor 4*) [271] und *TLR-9* (engl. *toll-like receptor 9*) [272], die essenzielle Rollen in der intrazellulären Immunantwort spielen.

3.5.1 Mögliche strahlungsinduzierte Akkumulation von cytosolischer dsDNA in den BRCA1-Klonen

Ein möglicher strahlungsinduzierter Anstieg der dsDNA im Cytosol wurde in den BRCA1-Klonen analysiert. Zunächst wurde die cytosolische dsDNA von zwei BRCA1-Klonen 16 Stunden nach Bestrahlung mit 8 Gy immunocytochemisch gefärbt, wie in Abb. 3.22 gezeigt. In Abb. 3.22 (A) sind beispielhafte mikroskopische Aufnahmen der MCF7 ohne Bestrahlung mit 90 U DNase-Behandlung und nach 8 Gy dargestellt. Die dsDNA im Cytosol ist rot dargestellt. Um den Ursprung der DNA aus den Mitochondrien auszuschließen, wurde parallel die mitochondriale

COX IV (engl. *cytochrome c oxidase 4*) (grün) nachgewiesen, die keine strahlungsinduzierte Veränderung zeigte. Die Quantifizierung der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI, engl. *mean fluorescence intensity*) des roten Signals (dsDNA) in 3.22 (B) zeigt die beiden BRCA1-Klone Klon 9.2 und Klon 9.5, in denen ein leichter Anstieg der cytosolischen dsDNA nach 8 Gy nachgewiesen wurde.

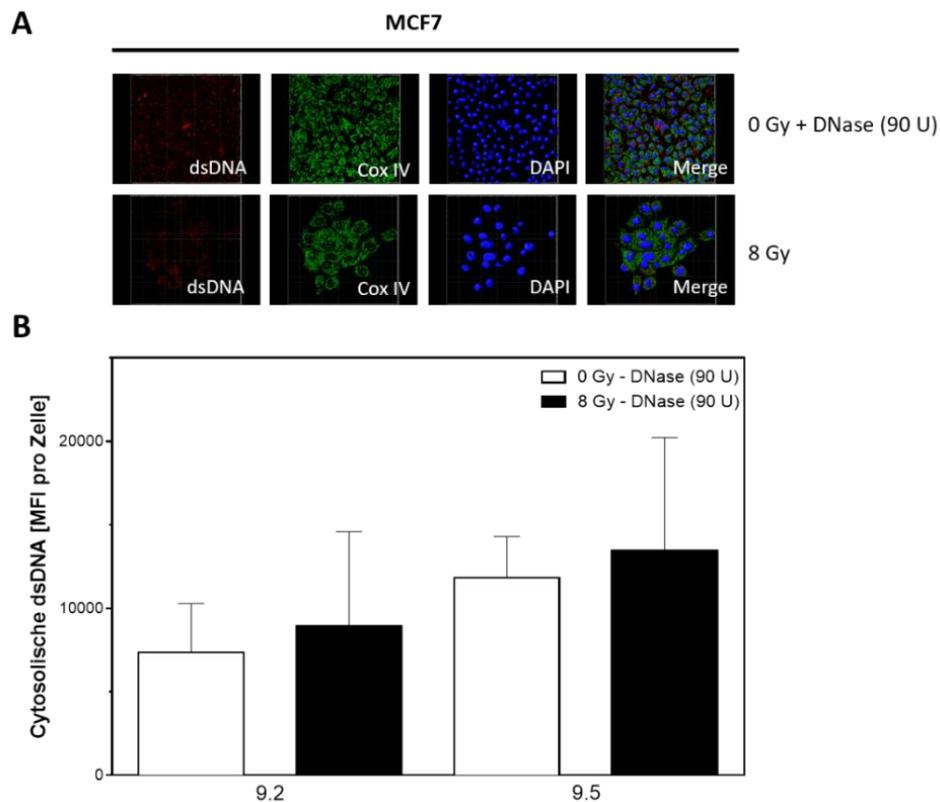


Abbildung 3.22: Minimaler strahlungsinduzierter Anstieg der cytosolischen dsDNA in Klon 9.2 und Klon 9.5. In exponentiellen Zellen wurde cytosolische dsDNA nachgewiesen, indem diese mit 8 Gy bestrahlt, fixiert und immunocytochemisch dsDNA sowie mitochondriale COX IV mit spezifischen Erst- und fluoreszenzgekoppelten Zweitantikörpern; nukleäre DNA mit DAPI gefärbt wurde. Die mehrschichtigen Aufnahmen erfolgten (63x Objektiv) mit dem Konfokalmikroskop *Leica TCS SP8 X*, ausgewertet mit dem Programm *Imaris x64 7.6.1*. (A) Dargestellt sind die cytosolische dsDNA (rot) und COX IV (grün) in MCF7 und (B) die Quantifizierung der cytosolischen dsDNA pro Zelle (MFI, engl. *mean fluorescence intensity*, Mittlere Fluoreszenzintensität) zweier BRCA1-Klone (Klon 9.2 und Klon 9.5) aus 100 Zellen mit Fehler des Mittelwertes. Das Hintergrundsignal (90 U DNase-Behandlung) wurde abgezogen.

Eine strahlungsinduzierte Akkumulation und unterschiedliche endogene Niveaus cytosolischer dsDNA wurden in Klon 9.2 und Klon 9.5 nachgewiesen. Die cytosolische dsDNA (mittlere Fluoreszenzintensität des roten Signals) stieg nach 8 Gy wie folgt an: Klon 9.2 (0 Gy: 7362,2 ± 2924,9 auf 8 Gy: 8953,3 ± 5649,2) und Klon 9.5 (0 Gy: 11825,8 ± 2468,9 auf 8 Gy: 13429,1 ± 6792,3).

3.5.2 Expression immunrelevanter Gene nach Bestrahlung in zwei BRCA1-Klonen

Eine aktivierte intrazelluläre Immunantwort durch strahlungsinduzierte Akkumulation cytosolischer dsDNA wurde im nächsten Schritt in diesen beiden BRCA1-Klonen untersucht. Dazu wurde die mRNA Expression immunrelevanter Gene 16 Stunden nach 8 Gy Bestrahlung

in der *Quantitativen Echtzeit PCR* analysiert. In Abb. 3.23 ist die relative mRNA Expression der immunrelevanten Gene (*IL-6*, *TLR-9* und *CXCR4*) vor und 16 Stunden nach 8 Gy in den BRCA1-Klonen Klon 9.2 und Klon 9.5 und in der MCF7 dargestellt.

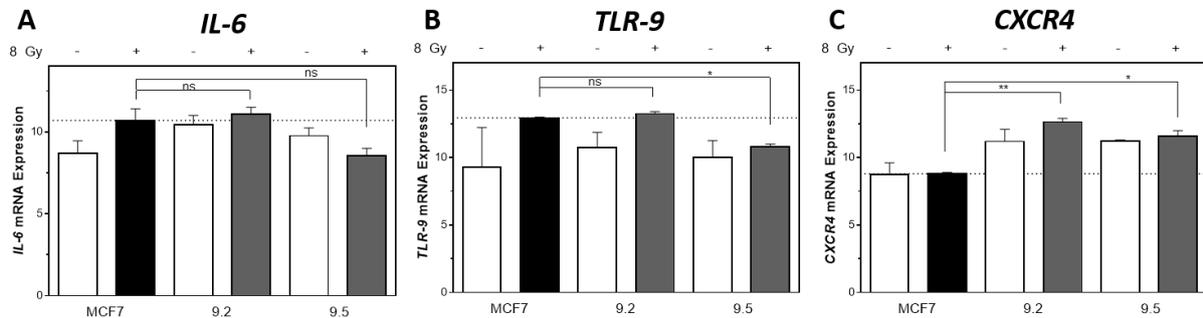


Abbildung 3.23: Geringfügig strahlungsinduzierte Veränderung der Expression von Genen der intrazellulären Immunantwort in Klon 9.2 und Klon 9.5. Die relative mRNA Expression immunrelevanter Gene ((A) *IL-6*, (B) *TLR-9* und (C) *CXCR4*) wurde in exponentiellen Zellen 16 h nach Bestrahlung mit 8 Gy bestimmt. Gesamt-RNA wurde isoliert, mRNA in cDNA transkribiert, in der *Quantitativen Echtzeit-PCR* untersucht und normiert auf *GAPDH*. MCF7 diente zur Kontrolle. Dargestellt ist die Quantifizierung der relativen mRNA Expression zweier unabhängiger Experimente mit Fehler des Mittelwertes. Statistisch signifikante Abweichungen: p-Wert > 0,05 = ns; p-Wert ≤ 0,05 = *; p-Wert ≤ 0,01 = ** (Student's T-Test). Diese Abweichungen beziehen sich auf die mRNA-Expressionsniveaus in der MCF7 nach 8 Gy.

Geringe, nicht signifikante Unterschiede in der relativen mRNA Expression von *IL-6* zeigten Klon 9.2 und Klon 9.5 im Vergleich zur MCF7 (vor und nach 8 Gy Bestrahlung). Die *IL-6* mRNA Expression veränderte sich wie folgt: Klon 9.2 ($10,44 \pm 0,55$ und $11,09 \pm 0,42$) und Klon 9.5 ($9,76 \pm 0,49$ und $8,53 \pm 0,47$) im Vergleich zur MCF7 mit $8,69 \pm 0,77$ vor und $10,71 \pm 0,70$ nach 8 Gy. Nur geringe Veränderungen in der relativen Expression von *TLR-9* vor und nach 8 Gy zeigten Klon 9.2 und Klon 9.5: Klon 9.2 zeigte eine leicht erhöhte Expression ($10,75 \pm 1,12$ und $13,24 \pm 0,16$) und Klon 9.5 geringe Veränderungen ($10,02 \pm 1,24$ und $10,79 \pm 0,22$, p-Wert: 0,0102). Allerdings war die mRNA Expression von *TLR-9* nach 8 Gy in Klon 9.5 signifikant niedriger mit $10,79 \pm 0,22$ (p-Wert: 0,0102) als bei der MCF7 mit $8,69 \pm 0,77$ vor und $10,71 \pm 0,70$ nach Bestrahlung.

Obwohl keine signifikanten Veränderungen der relativen mRNA Expression des Chemokinrezeptors *CXCR4* nach 8 Gy Bestrahlung vorlagen und in MCF7 nahezu unverändert waren ($8,76 \pm 0,85$ auf $8,83 \pm 0,07$), war die endogene mRNA-Expression in den BRCA1-Klonen (Klon 9.2 und Klon 9.5) höher im Vergleich zur MCF7: Klon 9.2 mit $11,19 \pm 0,90$ und Klon 9.5 mit $11,24 \pm 0,08$ (MCF7 mit $8,76 \pm 0,85$). Die Expressionsniveaus nach 8 Gy Bestrahlung waren in beiden Klonen (Klon 9.2: $12,46 \pm 0,26$; Klon 9.5: $11,60 \pm 0,41$) signifikant erhöht im Vergleich zur MCF7 ($8,83 \pm 0,07$) (Klon 9.2: p-Wert: 0,005; Klon 9.5: p-Wert: 0,0214).

Insgesamt wurden nur geringe Unterschiede in der Expression der untersuchten immunrelevanten Gene vorgefunden.

3.5.3 Veränderte Level cytosolischer dsDNA und strahlungsinduzierte Akkumulation in BRCA1-Klonen

Aufgrund der tendenziellen Akkumulation cytosolischer dsDNA nach Bestrahlung, wurde die cytosolische dsDNA aller BRCA1-Klone 16 Stunden nach 8 Gy Bestrahlung im *Picogreen*-Assay untersucht sowie die der Kontrollen MCF7 und HCC1937. In Abb. 3.24 ist die Quantifizierung der Menge der dsDNA im Cytosol ($\text{ng}/10^6$ Zellen) vor und nach Bestrahlung mit 8 Gy in den BRCA1-Klonen, in der MCF7 und der HCC1937 dargestellt.

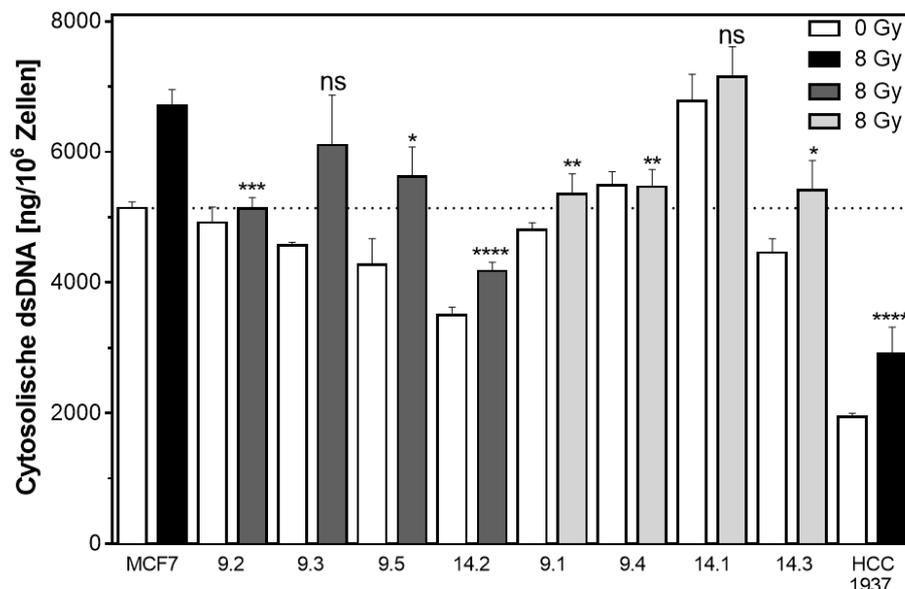


Abbildung 3.24: Strahlungsinduzierter Anstieg cytosolischer dsDNA in BRCA1-Klonen. dsDNA wurde in exponentiellen Zellen 16 h nach Bestrahlung mit 8 Gy in der cytoplasmatischen Fraktion ($\text{ng}/10^6$ Zellen) mithilfe des *Quant-iT™PicoGreen™dsDNA Assays* bestimmt. MCF7 und HCC1937 dienten zur Kontrolle. Die BRCA1-Klone mit zwei intakten Allelen sind in dunkelgrau, die mit einem in hellgrau markiert. Dargestellt ist die Quantifizierung zweier unabhängiger Experimente mit Fehler des Mittelwertes. Statistisch signifikante Abweichungen: $p\text{-Wert} > 0,05 = \text{ns}$; $p\text{-Wert} \leq 0,05 = *$; $p\text{-Wert} \leq 0,01 = **$; $p\text{-Wert} \leq 0,001 = ***$; $p\text{-Wert} \leq 0,0001 = ****$ (Student's T-Test). Diese Abweichungen beziehen sich auf die Level cytosolischer dsDNA in der MCF7 nach 8 Gy.

Eine Reduktion der endogenen dsDNA im Cytosol wies die Mehrheit der BRCA1-Klone, bis auf Klon 14.1 und Klon 9.4, im Vergleich zur MCF7 auf. Fast alle BRCA1-Klone zeigten eine strahlungsinduzierte Akkumulation der cytosolischen dsDNA. Dieser Anstieg war in unterschiedlichem Ausmaß ausgeprägt. Die MCF7 zeigte den höchsten strahlungsinduzierten Anstieg der cytosolischer dsDNA mit $5139,46 \pm 96,11 \text{ ng}/10^6$ Zellen vor und $6709,71 \pm 242,09 \text{ ng}/10^6$ Zellen nach 8 Gy. Die höchsten endogenen und strahlungsinduzierten Niveaus cytosolischer dsDNA zeigte jedoch Klon 14.1: endogene Level mit $6777,45 \pm 413,26 \text{ ng}/10^6$ Zellen, die nach Bestrahlung auf $7152,97 \pm 457,68 \text{ ng}/10^6$ Zellen anstiegen. Im Gegensatz dazu lagen die niedrigsten endogenen Werte bei Klon 14.2 mit $3496,55 \pm 121,46 \text{ ng}/10^6$ Zellen vor, die nach Bestrahlung auf $4176,10 \pm 137,39 \text{ ng}/10^6$ Zellen anstiegen. Einen hohen strahlungsinduzierten Anstieg der cytosolischen dsDNA zeigten Klon 9.3 ($4573,81 \pm 39,82 \text{ ng}/10^6$ Zellen vor und $6101,81 \pm 763,69 \text{ ng}/10^6$ Zellen nach 8 Gy) und Klon 9.5 ($4266,51 \pm$

402,21 ng/10⁶ Zellen vor und 5623,11 ± 452,94 ng/10⁶ Zellen nach 8 Gy). Eine ebenfalls hohe Akkumulation wies ein in Exon 14 veränderter Klon (Klon 14.3) mit 4455,03 ± 213,20 ng/10⁶ Zellen vor und 5418,23 ± 449,32 ng/10⁶ Zellen nach Bestrahlung auf. In Klon 9.1 stiegen die Werte nach Bestrahlung von 4802,51 ± 114,77 ng/10⁶ Zellen auf 5352,41 ± 310,05 ng/10⁶ Zellen an. Die HCC1937 zeigte endogen die niedrigsten Werte (1943,86 ± 54,70 ng/10⁶ Zellen) und nach Bestrahlung eine Akkumulation der dsDNA auf 2915,66 ± 402,89 ng/10⁶ Zellen. Geringfügige Veränderungen im Niveau der cytosolischen dsDNA vor und nach Bestrahlung zeigten folgende Exon 9 Klone: Klon 9.4 mit 5493,63 ± 203,20 ng/10⁶ Zellen vor und 5463,72 ± 269,20 ng/10⁶ Zellen nach 8 Gy und Klon 9.2 mit 4916,42 ± 239,09 ng/10⁶ Zellen vor und 5132,81 ± 165,65 ng/10⁶ Zellen nach Bestrahlung. Mit Ausnahme von zwei Klonen (Klon 14.1 und Klon 9.3) waren die Werte nach Bestrahlung in den BRCA1-Klonen und den HCC1937 im Vergleich zur MCF7 signifikant niedriger: Klon 14.2 (p-Wert: <0,0001), Klon 9.1 (p-Wert: 0,0077), Klon 9.2 (p-Wert: 0,0003), Klon 14.3 (p-Wert: 0,0208), Klon 9.4 (p-Wert: 0,0097), Klon 9.5 (p-Wert: 0,0491) und HCC1937 (p-Wert: <0,0001).

Die unterschiedlichen Mengen cytosolischer dsDNA endogen (Abb. 3.25 (A), R²=0,049; p-Wert: 0,5388) und nach Bestrahlung (Abb. 3.25 (B), R²=0,001; p-Wert: 0,9305) wurden nicht auf einen unterschiedlichen Anteil an CSCs (Aldefluor-positiver Zellen (%)) zurückgeführt.

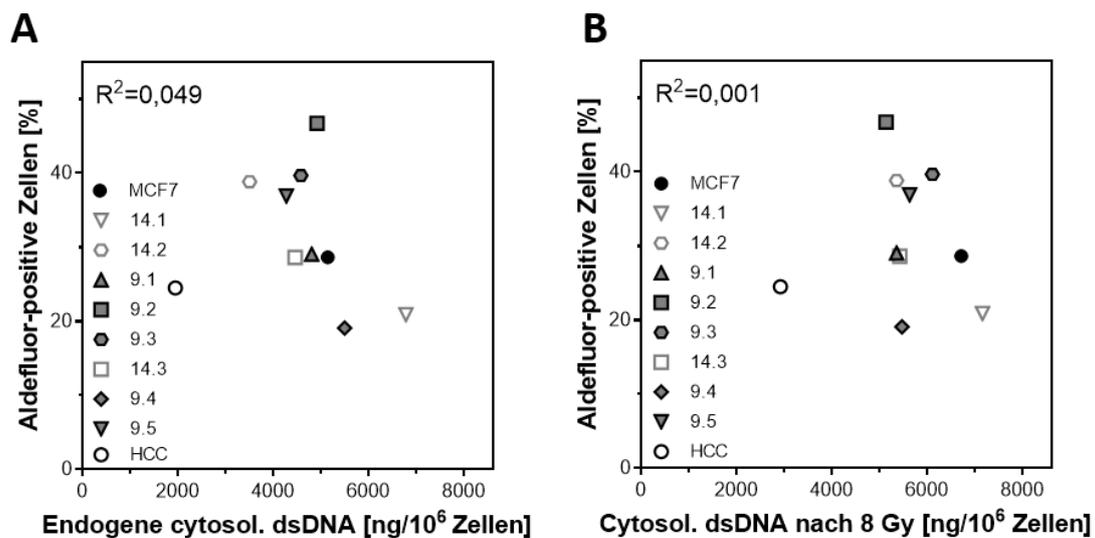


Abbildung 3.25: Keine Korrelation der endogenen cytosolischen dsDNA bzw. cytosolischen dsDNA nach 8 Gy mit den Aldefluor-positiven Zellen (CSCs) in den BRCA1-Klonen und der MCF7. In (A) ist der Anteil an Aldefluor-positiver Zellen (%) gegen das endogene Level cytosolischer dsDNA (ng/10⁶ Zellen) aufgetragen (R²= 0,049; p-Wert: 0,5388). In (B) ist der Anteil an Aldefluor-positiver Zellen (%) gegen die Menge cytosolischer dsDNA (ng/10⁶ Zellen) nach 8 Gy aufgetragen (R²= 0,001; p-Wert: 0,9305). Statistisch signifikante Abweichungen: p-Wert > 0,05 = ns (Student's T-Test).

Weder die reduzierten endogenen und strahlungsinduzierten Mengen cytosolischer dsDNA in den meisten BRCA1-Klonen, noch der strahlungsinduzierte Anstieg beeinflussten die Radiosensitivität (das zelluläre Überleben nach 8 Gy), wie in Abb. 3.26 gezeigt.

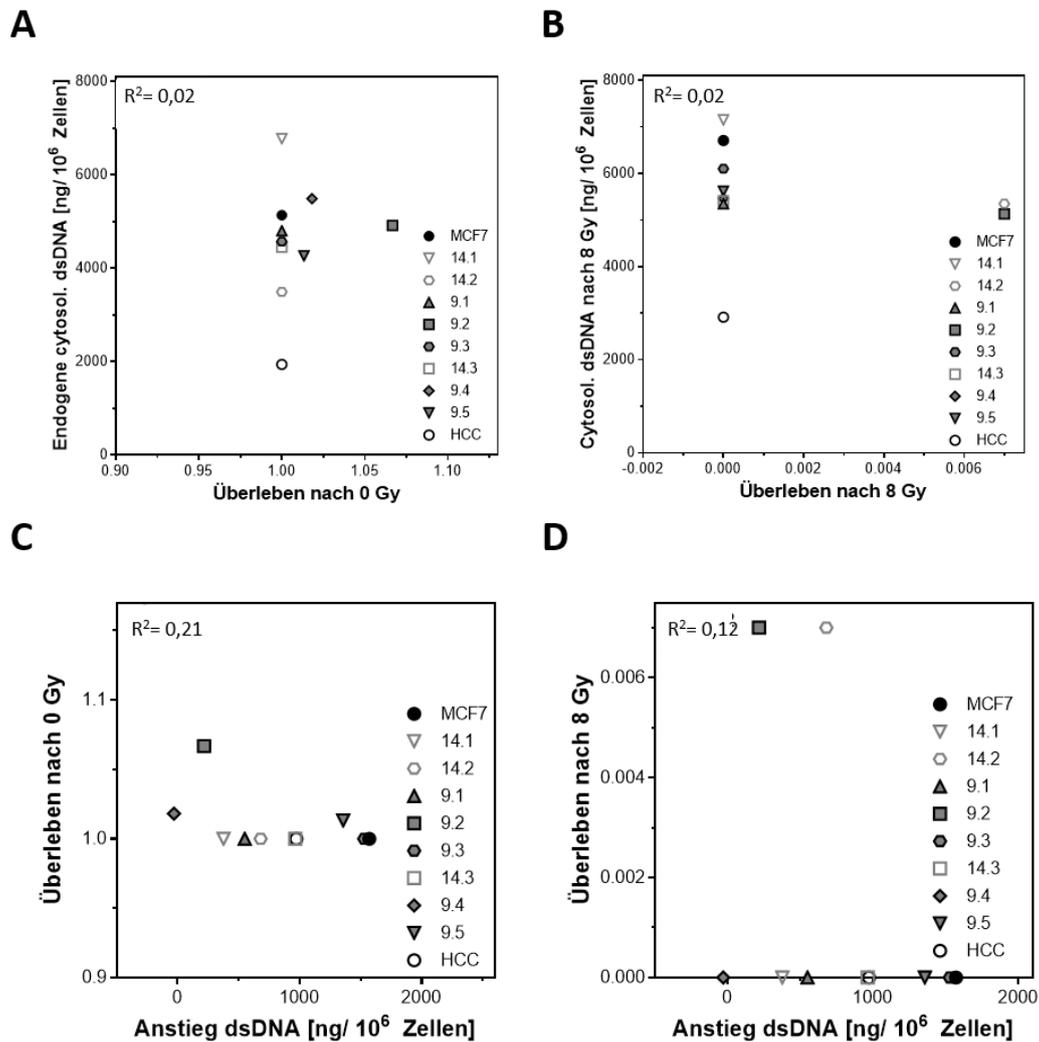


Abbildung 3.26: Keine Korrelation der cytosolischen dsDNA endogen bzw. nach 8 Gy mit der Radiosensitivität (zelluläres Überleben nach 0 Gy bzw. 8 Gy) in den BRCA1-Klonen und der MCF7. Dargestellt ist in (A) das endogene Level cytosolischer dsDNA (ng/10⁶ Zellen) in Bezug auf das Überleben nach 0 Gy ($R^2=0,02$; p-Wert: 0,6939), in (B) das Level cytosolischer dsDNA (ng/10⁶ Zellen) nach 8 Gy in Bezug auf das Überleben nach 8 Gy ($R^2=0,02$; p-Wert: 0,7188). Hingegen ist in (C) das Überleben nach 0 Gy ($R^2=0,21$; p-Wert: 0,1814) und in (D) das Überleben nach 8 Gy auf den strahlungsinduzierten Anstieg cytosolischer dsDNA (ng/10⁶ Zellen) bezogen ($R^2=0,12$; p-Wert: 0,3191). Statistisch signifikante Abweichungen: p-Wert > 0,05 = ns (Student's T-Test).

Insgesamt wiesen die BRCA1-Klone eine strahlungsinduzierte Akkumulation cytosolischer dsDNA und endogen reduzierte dsDNA-Niveaus auf, unabhängig vom veränderten Exon, der Anzahl intakter Allele und dem Anteil Aldefluor-positiver Zellen. Das Ausmaß des Anstiegs war bei den Klonen unterschiedlich und in zwei in Exon 9 veränderten Klonen, Klon 9.2 und Klon 9.4, nahezu unverändert.

Zusammenfassung 3.5

Trotz strahlungsinduzierter Akkumulation von dsDNA im Cytosol lag keine erhöhte intrazelluläre Immunantwort vor und wurde nicht als Ursache für die unterschiedlichen Sensitivitäten in den BRCA1-Klonen identifiziert. Es wurden 16 Stunden nach 8 Gy zunächst mithilfe der immunocytochemischen Färbung geringere Unterschiede festgestellt. Die cytosolische dsDNA als Signal für die intrazelluläre Immunantwort hatte jedoch nur eine

geringfügig veränderte Expression der immunrelevanten Gene (*IL-6*, *TLR-9* und *CXCR4*) zur Folge. Jedoch wurde in einer genaueren Analyse über den *Picogreen* Assay eine Akkumulation cytosolischer dsDNA nachgewiesen. Dabei zeigte nahezu alle BRCA1-Klone einen Anstieg nach Bestrahlung, bis auf Klon 9.2 und Klon 9.4. Eine Assoziation der unterschiedlichen Level cytosolischer dsDNA mit den auftretenden Resistenzen und Sensitivitäten in den BRCA1-Klonen wurde nicht explizit beobachtet.

3.6 Abschließende Zusammenfassung

Die Homologe Rekombination (HR) verhindert das Auftreten von Mutationen und genomischer Instabilität durch die fehlerfreie Reparatur in der S-Phase [65]. Eine hochregulierte HR und damit höhere genomische Stabilität ist charakteristisch für Tumorstammzellen [203]. Eine defekte HR führt dagegen zu DNA-Schäden in der S-Phase, die als Fragmente ins Cytosol freigesetzt werden und akkumulieren, welches die intrazelluläre Immunantwort aktiviert [190]. Bisher fehlen Erkenntnisse, wie die Menge an HR-Proteinen, z.B. von BRCA1, und die Veränderung bestimmter Domänen von BRCA1 den Anteil von Tumorstammzellen beeinflussen und ob die intrazelluläre Immunantwort in diesen Zellen nach ionisierender Strahlung aktiviert wird. In der vorliegenden Arbeit wurde diese Frage untersucht, indem ein isogenes Zellsystem mit einer stabil reduzierten BRCA1 Expression in der Mammakarzinomzelllinie MCF7 entwickelt wurde.

3.1) Ein isogenes Zellsystem mit einer unterschiedlichen Anzahl von veränderten *BRCA1* Allelen und unterschiedlichen Exons (9 und 14) wurde erfolgreich etabliert. Fünf Klone wurden in Exon 9, drei Klone in Exon 14 verändert mit einem oder zwei veränderten *BRCA1* Allelen, ohne einen vollständigen *Knockout* aller drei Allele.

3.2) Die BRCA1 Expression war in den Klonen stabil, auf maximal 0,57 in Klon 9.3, reduziert und stets höher als erwartet. Gleichzeitig war die Expression von RAD51 und FANCD2 in den meisten Klonen überwiegend erhöht. Die reduzierte CHK1 Expression korrelierte mit der reduzierten BRCA1 Expression, die parallel zu einer erhöhten FANCD2 Expression auftrat. Die erhöhte FANCD2 Expression korrelierte invers mit einer verminderten FANCD2-Monoubiquitinierung. Es traten weniger endogene DSBs (γ H2AX) in den Klonen auf mit Ausnahme von Klon 14.2 und Klon 14.3 und weniger spontane RAD51 Foci mit Ausnahme von Klon 14.2 und Klon 9.3 auf. Das höchste Niveau an endogenen DNA-Schäden mit Chromatinbrücken und Mikrokernen wies Klon 14.3 auf. Die Proliferationsrate war in vier der fünf Exon 9 Klonen erhöht, aber in Klon 9.2 am niedrigsten. Ein verändertes Exon 14 verursachte eine niedrigere oder unveränderte Proliferationsrate. Die S-Phase war verkürzt bei allen Klonen, bis auf Klon 9.2, mit einem höheren Anteil von Zellen in der G1- bzw. G2-Phase.

3.3) Die HR-Kapazität war reduziert in fast allen Klonen (außer in Klon 14.2), unabhängig vom Exon und der Anzahl an Allelen, genauso wie die Bildung von RAD51 Foci nach MMC (außer in Klon 9.3). Die niedrigste HR-Kapazität zeigte Klon 14.3. Nach MMC stieg die Anzahl residueller DSBs (γ H2AX) an (außer in Klon 9.2), die RAD51 Foci blieben niedrig. In Klon 14.3 wurden mehr

replikationsassoziierte Schäden wie Chromatinbrücken und Mikrokerne nachgewiesen. Die MMC-Empfindlichkeit war in allen Exon 14 Klonen erhöht, wobei Klon 14.3 am empfindlichsten war, und in den meisten der Exon 9 Klone; Klon 9.2 und Klon 9.3 waren jedoch resistent. Die MMC-Sensitivität war in den Klonen erhöht, welche nur ein intaktes *BRCA1* Allel aufwiesen. In einigen Klonen wurde eine erhöhte Olaparib-Sensitivität, in anderen dagegen eine erhöhte Resistenz wie in Klon 14.2, Klon 9.3, Klon 9.2 und Klon 9.5 nachgewiesen. Eine erhöhte Resistenz trat in Klonen mit zwei intakten *BRCA1* Allelen auf. Die Radiosensitivität war zumeist erhöht, mit jedoch zwei resistenten Klonen (Klon 9.2 und Klon 9.5). Die Radiosensitivität war abhängig von der relativen HR-Kapazität und Zahl intakter Allele. Die höchste MMC- und Radioresistenz zeigte Klon 9.2, während die höchste Empfindlichkeit bei Klon 14.3 vorlag.

3.4) Ein unterschiedlicher CSC-Anteil wurde in den *BRCA1*-Klonen beobachtet, was eine Ursache für die unterschiedlichen Sensitivitäten darstellt. Dieser Anteil hing von der Anzahl intakter *BRCA1* Allele ab. Den höchsten Anteil an CSCs zeigte Klon 9.2, welcher eine spindelförmige Zellmorphologie und die höchste Aktivität von ALDH aufwies. Die EMT-Marker waren in diesem Klon jedoch nahezu unverändert im Vergleich zur MCF7. Klon 14.2, Klon 9.3 und Klon 9.5 zeigten ebenfalls höhere CSC-Fractionen sowie eine erhöhte ZEB1 Expression, teilweise erhöhte ALDH1A1 und E-Cadherin Expression. Diese Klone wiesen zwei intakte *BRCA1* Allele auf und waren gegen unterschiedliche DNA-schädigende Agenzien resistent.

3.5) Endogen war die Menge der cytosolischen dsDNA in den meisten *BRCA1*-Klonen reduziert. Die Mehrheit der *BRCA1*-Klone zeigte jedoch Exon-unabhängig und unabhängig von der Anzahl an Allelen eine strahlungsinduzierte Akkumulation von dsDNA im Cytosol, mit Ausnahme von Klon 9.2 und Klon 9.4, bei denen sich die Expression immunrelevanter Gene nach Bestrahlung nur geringfügig veränderte.

Schließlich verursachte eine reduzierte *BRCA1* Expression eine veränderte Expression von HR-Proteinen und eine teilweise Exon-abhängig veränderte Proliferationsrate und Zellzyklusverteilung. Die HR-Kapazität war reduziert, die endogene DNA-Schäden waren unterschiedlich. Es wurden sowohl erhöhte Sensitivitäten als auch Resistenzen beobachtet. Eine Veränderung in Exon 14 und ein intaktes *BRCA1* Allel führten hauptsächlich zu einer erhöhten Sensitivität. Im Gegensatz dazu führten ein verändertes Exon 9 und zwei intakte Allele teilweise zu Resistenzen. Endogen reduzierte cytosolische dsDNA in den *BRCA1*-Klonen erhöhte sich nach Bestrahlung in unterschiedlichem Ausmaß, aber es wurde nur eine leicht veränderte intrazelluläre Immunantwort beobachtet. Als Ursache für die auftretende Resistenz wurde ein erhöhter CSC-Anteil, der von der Anzahl intakter *BRCA1* Allele abhängig war, definiert.

4 Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, die Auswirkungen einer reduzierten Proteinexpression von BRCA1 und spezifischer Veränderungen des *BRCA1* Gens auf die HR in einem isogenen Zellsystem zu analysieren. Weiterhin wurden die Folgen einer veränderten HR auf den Anteil an Tumorstammzellen und auf eine Aktivierung der intrazellulären Immunantwort untersucht. Für Tumorstammzellen ist bekannt, dass diese DNA-Doppelstrang-Reparaturwege wie die HR hochregulieren [203] und eine erhöhte BRCA1 Expression aufweisen [228]. Eine andere Studie beobachtete einen erhöhten Tumorstammzellanteil nach einem *BRCA1* Verlust [231]. Darüber hinaus wurde ein HR-Defekt unter anderem von Bhattacharya et al., 2017 beschrieben, der zu einer Akkumulation cytosolischer dsDNA und damit zur Aktivierung der intrazellulären Immunantwort führte [190]. Bislang fehlen Kenntnisse darüber, wie sich eine reduzierte BRCA1 Expression und eine gezielte Modifikation des *BRCA1* Gens auf die HR, den Anteil an CSCs und die intrazelluläre Immunantwort auswirken, da hierfür keine geeigneten Systeme zur Verfügung stehen.

In der vorliegenden Arbeit wurde erfolgreich ein isogenes Zellsystem mit stabil reduzierten BRCA1 Expressionsniveaus in der MCF7 etabliert. Die genetischen Veränderungen in Exon 9 und Exon 14 der *BRCA1* Allele der MCF7-Klone wurden zunächst in der PCR und im *Bioanalyzer* validiert, die Expression HR-relevanter Proteine bestimmt und endogene DNA-Schäden, das Proliferationsverhalten und die Zellzyklusverteilung untersucht. Anschließend wurden die Auswirkungen auf die HR untersucht. Dazu wurde die relative HR-Kapazität im Plasmid-Rekonstruktionsassay bestimmt und die Bildung von RAD51 Foci und DNA-Schäden nach MMC-Schädigung analysiert. Außerdem wurde die Funktionalität der HR über das zelluläre Überleben nach MMC, PARP1-Inhibition (Olaparib) und ionisierender Strahlung nachgewiesen. Die Ursachen für die beobachteten Unterschiede in den Sensitivitäten der BRCA1-Klone wurden daher in den nächsten Schritten fokussiert. Dazu wurde die CSC-Fraktion auf Grundlage spezifischer Eigenschaften über die Zellmorphologie, die Expression von Markern der EMT und von Tumorstammzellen sowie die ALDH-Aktivität im *ALDEFLUORTM* Assay definiert. Ein erhöhtes Signal für die Immunantwort sowie die Aktivierung der intrazellulären Immunantwort nach BRCA1 Reduktion wurden über die immunocytochemische Färbung und die Analyse der cytosolischen dsDNA im *Picogreen* Assay und über die veränderte Expression immunrelevanter Gene nach Bestrahlung in der *Quantitativen Echtzeit-PCR* untersucht.

4.1 Notwendigkeit der Entwicklung eines isogenen Zellsystems zur Untersuchung einer reduzierten HR

4.1.1 Ansatz für die Etablierung eines isogenen Zellsystems

In der vorliegenden Arbeit wurde ein isogenes Zellsystem entwickelt, das erstmals stabil unterschiedliche Expressionsniveaus von *BRCA1* im Kontext des Mammakarzinoms aufweist. Eine Besonderheit der verwendeten epithelialen Mammakarzinomzelllinie MCF7 ist die Amplifikation des *BRCA1* Gens auf drei Genkopien (Allele) [248]. Neben Veränderungen des einzelnen *BRCA1* Gens konnte daher eine unterschiedliche Anzahl von Allelen funktionell ausgeschaltet werden. Eine erhöhte Expression von HR-relevanten Genen wie z.B. von *BRCA1* tritt in Mammakarzinomzelllinien häufig und unabhängig vom Subtyp auf [273], weshalb die MCF7 Zelllinie ein geeignetes Zellmodell darstellt.

4.1.2 Nachteile bisher verfügbarer Systeme

Frühere Studien zur veränderten HR haben sich auf Prozesse in der Tumorgenese des Mammakarzinoms konzentriert. Der spätere Einfluss im Tumorgewebe wurde bisher vernachlässigt. Die nicht-tumorigene, epitheliale Brustzelllinie MCF10A (engl. *Michigan Cancer Foundation-10A*) wurde häufig zur Analyse der frühen Entwicklung des Mammakarzinoms verwendet. Mit dieser Zelllinie generierten Feng und Jasin 2017 in einer Studie über CRISPR/Cas9 einen vollständigen *Knockout* und einen heterozygoten Zustand (*BRCA2^{mut/-}*) [274]. Der Nachteil der diploiden MCF10A ist daher, dass nur zwei Zustände untersucht werden können. Die Vorteile des CRISPR/Cas9-Systems sind jedoch eine dauerhafte und stabile Veränderung der Gene und die Möglichkeit, einen vollständigen *Knockout* zu erhalten [275]. Andere verfügbare Systeme wie siRNA (engl. *small interfering RNA*) haben den Nachteil, dass sie nur transient sind und es daher nicht erlauben, ein stabiles System mit unterschiedlichen HR-Kapazitäten zu generieren. Problematisch sind die schnelle Degradation der siRNA aufgrund geringer chemischer Stabilität und das Ausschalten stark transkribierter Gene [276]. Zudem ist in den meisten Fällen kein vollständiger *Knockdown* möglich. In einigen Studien wurden siRNAs bereits eingesetzt, um an der HR beteiligte Gene wie *RAD51* [277] oder *BRCA1* [89, 234] in Mammakarzinomzelllinien transient auszuschalten. Die bereits erwähnten Nachteile traten auch in diesen Studien auf.

Feinere Abstufungen der Genexpression, wie eine Überexpression oder einen *Knockout*, erlauben Tetrazyklin-induzierbare *Tet-on* und *Tet-off* Systeme. Nachteile dieser Systeme sind das An- bzw. Ausschalten der shRNA (engl. *small hairpin RNA*) Expression durch Zugabe von Tetrazyklinen wie Doxyzyklin und die Kontrolle der Expression über Fluoreszenzfarbstoffe wie turboRFP (RFP, engl. *red fluorescent protein*). Darüber hinaus können Wechselwirkungen mit anderen Antibiotika im Zellkulturmedium die Expression beeinflussen. Auch Studien, in denen HR-Gene wie *RAD51* [278] und *BRCA1* [279] über shRNA in Mammakarzinomzellen ausgeschaltet wurden, zeigten häufig das Fehlen eines vollständigen *Knockdowns*.

Tumorentstehung und Überleben nach Therapie stehen im Fokus der Analyse von Primärzellen von Mutationsträgerinnen wie von *BRCA1*. Heterozygote Zustände und die

daraus resultierenden Effekte der Haploinsuffizienz wurden an primären Zellen von Trägerinnen mit *BRCA1*- [238] und *BRCA2*-Mutationen [280] bzw. in retrospektiven Studien in Bezug auf das Überleben nach Chemotherapie [281] untersucht. Diese Ansätze basieren auf spezifischen Mutationen in den HR-Genen und werden durch diese limitiert. Außerdem untersuchen solche Studien bereits vorhandene Keimbahnmutationen, später erworbene Mutationen wie z.B. in *BRCA1* im Tumorgewebe sind sekundär.

4.1.3 Notwendigkeit eines neuen Zellsystems

Es fehlen dementsprechend Ansätze, in denen der Einfluss spezifischer genetischer Veränderungen zusammen mit einer stabil reduzierten Proteinexpression beim Mammakarzinom untersucht wird. Zudem ist es in diesem Zusammenhang wichtig, den Einfluss auf das Ansprechen auf eine Chemo- oder Radiotherapie zu berücksichtigen. Das vorliegende System kombiniert die Vorteile einer stabilen genetischen Veränderung über CRISPR/Cas9 mit der Erzeugung einer unterschiedlichen Anzahl ausgeschalteter *BRCA1* Allele im Kontext einer Tumorzelllinie. Daher stellt das neu etablierte MCF7 Zellsystem ein adäquates System dar, um Auswirkungen einer veränderten HR isogen zu untersuchen.

4.2 Isogenes MCF7 Zellsystem mit gezielt veränderter und stabil reduzierter *BRCA1* Expression

4.2.1 Etablierung eines isogenen Zellsystems

Die *BRCA1* Allele in MCF7 wurden spezifisch in zwei Exons (Exon 9 und 14) verändert, welche Regionen zwischen essenziellen Domänen kodieren. Exon 9 kodiert die Region zwischen der *RING finger* Domäne und einem Kernlokalisierungssignal, Exon 14 die Region innerhalb der SCD-Domäne zwischen dem Proteinstrukturmotiv *Coiled coil* und der ersten BRCT-Domäne. Frühere Untersuchungen dieser Exons beschränkten sich auf Spleißvarianten, die zum Überspringen dieser Exons [282] oder zu einem Stoppcodon aufgrund einer *frame shift* Mutation (in Exon 14) führten und den Abbruch der Translation zur Folge hatten [283]. Ein großer Anteil der bisherigen Studien [284, 285] befasste sich mit Mutationen in dem Exon 11 von *BRCA1*, welches die größte Protein-kodierende Region umfasst [114]. In dieser Region werden essenzielle Domänen des *BRCA1*-Proteins kodiert wie z.B. die DNA-Bindedomäne [125], Domänen für die Interaktion mit dem MRN-Komplex [72] und für die Interaktion mit RAD51 [286]. Es fehlen daher Studien, in denen eine spezifische Veränderung von jeweils Exon 9 und Exon 14 in Kombination mit einer reduzierten *BRCA1* Expression untersucht wird. In der vorliegenden Arbeit wurde die primäre Validierung der in Exon 9 bzw. Exon 14 veränderten *BRCA1* Allele in MCF7 durch die PCR-Analyse (vgl. Abb. 3.2) durchgeführt und im *Bioanalyzer* spezifiziert (vgl. Tab. 3.1 und Abb. 3.3). Bei beiden Ansätzen konnten positive MCF7-Klone identifiziert werden, fünf waren in Exon 9, drei in Exon 14 verändert. Exon-unabhängig wurden ein bis zwei *BRCA1* Allele verändert, ohne einen vollständigen *Knockout* aller drei Allele zu erhalten. Veränderungen in Exon 9 waren hauptsächlich auf kleinere

Deletionen oder Insertionen zurückzuführen, ein Klon (Klon 9.4) zeigte eine größere Deletion von 177 bp. Hingegen wiesen die in Exon 14 veränderten BRCA1-Klone größere (Klon 14.2) und kleinere Insertionen (Klon 14.1 und Klon 14.3) auf. Insgesamt wurde eine größere Anzahl an Klonen generiert, die in Exon 9 verändert waren. Es ist daher möglich, dass in der MCF7 Zelllinie eine Veränderung in Exon 9 tolerierbarer ist als in Exon 14. Die von Exon 9 kodierte Region beinhaltet keine wichtigen funktionellen Domänen des BRCA1-Proteins. Außerdem ist eine niedrige Mutationsrate in Exon 9 bekannt [133] und es wurden nur wenige Keimbahnmutationen für Exon 9 von *BRCA1* beschrieben: In der Datenbank *ARUP* [287] sind lediglich vier Mutationen in Exon 9 aufgeführt, wovon zwei pathogen sind.

Andererseits kodiert Exon 14 wichtige Regionen des BRCA1-Proteins, zu denen Teile der SCD-Domäne gehören, in denen Serinreste für die Phosphorylierung über ATM und ATR lokalisiert sind [105, 58, 127, 128]. Im Vergleich zu Exon 9, gibt es eine höhere Mutationsrate in Exon 14, und die Datenbank *ARUP* [288] listet 28 Mutationen, von denen 27 pathogen sind. Somit haben Einschränkungen in dieser Region einen größeren Einfluss auf die Funktionalität des BRCA1-Proteins, was die höhere Rate an pathogenen Mutationen und die niedrige Anzahl expandierter BRCA1-Klone mit einer Veränderung in Exon 14 erklärt. Jedoch sind die Mutationsraten beider Exons (Exon 9 und 14) im Vergleich zu anderen Regionen des *BRCA1* Gens (Exon 2 bis 6, Exon 11 bis 13 und Exon 18 bis 20 [133]) deutlich niedriger. Das Fehlen eines vollständigen *Knockouts* der drei *BRCA1* Allele in MCF7 ist auf fehlende Zusatzmutationen in dieser Zelllinie zurückzuführen. In *BRCA1*-defizienten Zelllinien liegt in der Regel eine hohe Mutationslast vor und es sind kompensierende Zusatzmutationen wie beispielsweise in *TP53* (engl. *tumor protein 53*) vorhanden [140]. Die *BRCA1*-defiziente HCC1937 trägt eine homozygote Mutation in *BRCA1* (Insertion an Position 5382 (*5382insC*)), welche ein verkürztes BRCA1-Protein kodiert [250], und eine homozygote Mutation (c.916C>T) in *TP53*.

Unabhängig von einem fehlenden vollständigen *Knockout* wurde in der MCF7 Zelllinie eine unterschiedliche Anzahl an *BRCA1* Allelen in zwei Exons erfolgreich verändert, wodurch unterschiedliche Klone generiert wurden. Die Auswirkungen dieser genetischen Veränderung auf die BRCA1 Proteinexpression und die Expression anderer DNA-Reparaturproteine wurden anschließend untersucht.

4.2.2 BRCA1 Reduktion verändert Expression HR-relevanter Proteine in MCF7 Zellen

4.2.2.1 Reduzierte BRCA1 Expression in MCF7-Klonen

Entgegen der Erwartung war die BRCA1 Expression in den MCF7 Klonen stets höher als die von einem (0,66) bzw. zwei (0,33) veränderten Allelen erwartete Expression. Eine Reduktion der relativen BRCA1 Expression auf 0,97 bis 0,68 lag in den Klonen vor, bis hin zur maximalen Reduktion auf 0,57 in Klon 9.3 (vgl. Abb. 3.4). Das 220 kDa schwere BRCA1-Protein wurde in den BRCA1-Klonen, in der MCF7 und in schwacher Ausprägung in der *BRCA1*-defizienten HCC1937 nachgewiesen. Für die HCC1937 wird jedoch in der Literatur ein am C-Terminus verkürztes BRCA1-Protein beschrieben [250]. Der verwendete Antikörper (#9010, *Cell Signaling*) erkennt Aminosäuren in der Nähe des N-Terminus des BRCA1-Proteins, weshalb

auch ein verkürztes Protein immunologisch nachgewiesen werden konnte. Möglicherweise könnte dieses Ergebnis durch ein niederprozentiges Acrylamidgel aufgelöst werden. Außerdem könnten die verbleibenden intakten *BRCA1* Allele die *BRCA1* Expression in den Klonen leicht erhöht haben. Vermutlich handelt es sich jedoch um ein nicht-funktionelles Protein, das dennoch detektiert wurde. Zusammenfassend wurde in den *BRCA1*-Klonen erfolgreich eine reduzierte *BRCA1* Expression um bis zu 43 % erreicht.

4.2.2.2 Erhöhte *FANCD2* Expression und verringerte *CHK1* Expression

Eine erhöhte *FANCD2* Expression lag in sechs der acht *BRCA1*-Klone vor (vgl. Abb. 3.4). Die Expression war unabhängig von dem veränderten Exon und von der Anzahl intakter Allele. Eine kompensatorisch erhöhte *FANCD2* Expression nach einem *BRCA1*-Verlust wurde bereits von Kais et al., 2016 beschrieben [289]. Ein solcher Kompensationsmechanismus über eine erhöhte *FANCD2* Expression könnte daher ebenfalls in den *BRCA1*-Klonen vorliegen. *BRCA1* reguliert die Expression von *CHK1* sowie die Phosphorylierung und zelluläre Lokalisation [110], weshalb eine reduzierte *BRCA1* Expression einen direkten Einfluss auf die Expression von *CHK1* hat. Dies wurde in den MCF7-Klonen mit reduzierter *BRCA1* Expression bestätigt: Mit der reduzierten *BRCA1* Expression verringerte sich gleichzeitig die Expression von *CHK1*, eine Ausnahme war Klon 9.4. Ein direkter Einfluss der *BRCA1* Expression auf die *CHK1* Expression konnte durch eine Korrelation ($R^2= 0,52$; $p: 0,0277$; vgl. Abb. 3.5) bestätigt werden. Die stärkste Reduktion zeigte daher Klon 9.3, der die niedrigste *BRCA1* Expression von 0,57 aufwies (vgl. Abb. 3.4 und 3.5). Darüber hinaus wurde bereits eine niedrige *CHK1* Expression in *BRCA1*-defizienten Zelllinien beschrieben [290]. Erstmals wurde in der vorliegenden Arbeit trotz fehlender Korrelation ($R^2=0,26$) eine reduzierte *CHK1* Expression zusammen mit einer erhöhten *FANCD2* Expression nach einer reduzierten *BRCA1* Expression beobachtet. Daher könnte die erhöhte *FANCD2* Expression ein Kompensationsmechanismus in MCF7 sein, um die reduzierte *BRCA1* und *CHK1* Expression auszugleichen.

4.2.2.3 Kompensatorisch erhöhte *RAD51* Expression

Eine erhöhte *RAD51* Expression wurde in *BRCA1*-defizienten Mammakarzinomen nachgewiesen [291], während eine andere Studie keinen direkten Zusammenhang zwischen der *BRCA1* und *RAD51* Expression beobachtete [292]. Für die MCF7 ist eine *RAD51* Expression im mittleren Bereich bekannt [293]. In der vorliegenden Arbeit wurde nach Reduktion von *BRCA1* in der MCF7 eine leicht erhöhte *RAD51* Expression beobachtet, wobei die höchste Expression in Klon 9.5 (1,67) und in Klon 14.2 (1,36) auftrat (vgl. Abb. 3.4). Ein direkter Zusammenhang der erhöhten *RAD51* Expression mit der reduzierten *BRCA1* Expression konnte jedoch in keiner inversen Korrelation ($R^2= 0,28$) bestätigt werden. Dennoch könnte die erhöhte *RAD51* Expression in einigen der Klone ein Kompensationsmechanismus sein.

Die Veränderung der *BRCA1* Allele in der MCF7 Zelllinie beeinflusste demnach nicht nur die *BRCA1* Expression, sondern veränderte auch die Expression anderer HR-relevanter Proteine. Endogen ist die MCF7 Zelllinie durch hohen Replikationsstress und endogene DNA-Schäden gekennzeichnet. Inwieweit eine Veränderung von *BRCA1* und der anderen untersuchten HR-

Proteine einen Einfluss auf diese Schäden in den BRCA1-Klonen hatte, wurde im Folgenden untersucht.

4.2.3 Reduzierte endogene DNA-Schäden nach reduzierter BRCA1 Expression

4.2.3.1 Endogen reduzierte Aktivierung von FANCD2

Nach endogener DNA-Schädigung z.B. nach Replikationsstress und exogener DNA-Schädigung wird FANCD2 durch Monoubiquitinierung aktiviert. Dies geschieht während des Übergangs von der G1- zur S-Phase und führt zur Bindung von FANCD2 an das Chromatin [103]. Die Deaktivierung erfolgt beim Übergang in die G2-Phase, da die Monoubiquitinierung über USP1 (engl. *ubiquitin specific peptidase 1*) wieder abgebaut wird [103, 294].

Eine reduzierte Aktivierung von FANCD2 lag in den BRCA1-Klonen in Abwesenheit von exogen induzierten DNA-Schäden vor. Diese erhöhte FANCD2 Expression in den meisten BRCA1-Klonen resultierte jedoch nicht in einer erhöhten Aktivierung (inverse Korrelation, $R^2=0,79$; p-Wert: 0,0012, vgl. Abb. 3.6 (B)). Das Ausmaß der reduzierten Monoubiquitinierung war bei den BRCA1-Klonen unterschiedlich (vgl. Abb. 3.6 (A) und (B)). In allen Exon 14 veränderten Klonen war FANCD2 im Vergleich zur MCF7 geringer monoubiquitiniert: Klon 14.1 und Klon 14.3 zeigten eine stark reduzierte Monoubiquitinierung, während Klon 14.2 nur leicht reduziertes monoubiquitiniertes FANCD2 aufwies. Unterschiede in der Aktivierung von FANCD2 wurden auch in den Exon 9 veränderten Klonen beobachtet. Die Klone mit einer erhöhten FANCD2 Expression (Klon 9.1, Klon 9.3 und Klon 9.5) zeigten eine leicht reduzierte FANCD2-Aktivierung (Klon 9.3) oder eine stark reduzierte Aktivierung (Klon 9.1 und Klon 9.5). Im Gegensatz dazu zeigten Klon 9.2 und Klon 9.4 mit leicht reduzierter FANCD2 Expression nur eine leicht reduzierte Monoubiquitinierung.

Folglich war das Ausmaß einer reduzierten Aktivierung von FANCD2 nach einer Veränderung in Exon 14 höher als in Exon 9. Möglicherweise wurde FANCD2 in Exon 14 veränderten Klonen in verminderter Weise aktiviert z.B. über CHK1 oder ATR. Außerdem kann FANCD2 unabhängig von der Monoubiquitinierung die Reparatur einleiten [104], dieser Mechanismus könnte durch die erhöhte Expression von FANCD2 vor allem in Exon 9 veränderten Klonen sichergestellt worden sein. Eine andere Erklärung für die eingeschränkte Aktivierung von FANCD2 könnte eine reduzierte Anzahl endogener DNA-Schäden sein. Andererseits könnte trotz hoher DNA-Schäden und erhöhter FANCD2 Expression in den BRCA1-Klonen eine erhöhte Aktivierung fehlgeschlagen sein. Die eingeschränkte Aktivierung könnte zudem durch die reduzierte CHK1 Expression beeinflusst worden sein. CHK1 ist für die Monoubiquitinierung von FANCD2 essenziell, da diese von der Phosphorylierung durch CHK1 an Serin S331 von FANCD2 abhängig ist [295, 296]. Eine direkte Korrelation ($R^2= 0,05$) zwischen der CHK1 Expression und der reduzierten Monoubiquitinierung von FANCD2 konnte jedoch nicht nachgewiesen werden.

Im Gegensatz dazu beobachteten Kais et al., 2016 nach einem vollständigen *BRCA1*-Verlust eine erhöhte Monoubiquitinierung von FANCD2 und die Lokalisation zu Replikationsgabeln, wo FANCD2 die Stabilität gewährleistet und einen Neustart fördert [289]. Bei DNA-Schäden agiert FANCD2 zusammen mit FANCI und markiert Bereiche unvollständiger Replikation [297].

Aktiviertes FANCD2 erkennt daher diese DNA-Schäden, die den Kontrollpunkten in der S- und G2-Phase entgangen sind, und leitet bestimmte Reparaturmechanismen in der Mitose ein [297]. Solche DNA-Schäden könnten in den BRCA1-Klonen in reduziertem Ausmaß vorliegen, weshalb nur eine reduzierte Aktivierung von FANCD2 notwendig war. Ein möglicher Exon-unabhängiger Einfluss der reduzierten BRCA1 Expression auf die E3 Ubiquitinligase-Funktion von BRCA1 wurde ausgeschlossen, da diese für die Monoubiquitinierung von FANCD2 nicht essenziell ist [298]. Insgesamt war die Quantifizierung der Menge des monoubiquitinierten FANCD2-Proteins anhand der L/S Ratio schwierig, da die L- und S-Bande sehr nahe beieinanderlagen. Dieser Umstand könnte die Ergebnisse ebenfalls beeinflusst haben. Daher war es wichtig, weitere endogene DNA-Schäden wie DSBs in den BRCA1-Klonen zu untersuchen und das Ausmaß zu bestimmen.

4.2.3.2 Exon-abhängig reduzierte endogene DNA-Schäden (γ H2AX Foci)

Endogene DNA-Schäden wurde durch den DSB-Marker γ H2AX in den BRCA1-Klonen nachgewiesen. Die Phosphorylierung an Serin 139 des Histons H2AX (γ H2AX) [252] verändert die Chromatinkonformation im Bereich des DSBs und akkumuliert als intranukleäre Foci [252]. Diese erlauben einen besseren Zugang für Reparaturproteine [299]. Die Phosphorylierung von H2AX kann zudem nach Einzelstrangbrüchen und während Replikationsstress auftreten [92]. Unterschiedliche Level an DSBs waren in den BRCA1-Klonen vorhanden, diese waren abhängig vom veränderten Exon und unabhängig von der Anzahl intakter *BRCA1* Allele (vgl. Abb. 3.7 (A)). Eine Veränderung in Exon 9 reduzierte die endogenen DSBs, aber Klon 9.2 zeigte keine signifikante Veränderung. Im Gegensatz dazu lag ein erhöhtes Niveau endogener DSBs in Exon 14 veränderten Klonen vor. Stark erhöhte Niveaus zeigten Klon 14.1 und Klon 14.3 im Vergleich zur MCF7, während Klon 14.2 ein leicht erhöhtes Level aufwies. Ein ebenfalls hohes Niveau endogener DNA-Schäden wies die HCC1937 auf. Eine andere Studie bestätigt diese Beobachtung, d.h. nach einem *BRCA1 Knockdown* in DT40 Zellen wurden in diesen Zellen ein erhöhtes Niveau an DSBs beobachtet [300], während eine andere Studie dies widerlegte [301]. Das reduzierte Niveau der endogenen DNA-Schäden in den Exon 9 Klonen deutet auf geringeren Replikationsstress in diesen Klonen hin. Möglicherweise bedingt die reduzierte BRCA1 Expression einen verbesserten Umgang mit endogenen DNA-Schäden. Eine Veränderung in Exon 14 zusätzlich zur reduzierten BRCA1 Expression scheint jedoch diesen positiven Effekt aufzuheben und die endogenen DNA-Schäden zu erhöhen. Exon 14 kodiert Teile der SCD-Domäne und damit teilweise wichtige Phosphorylierungsstellen für ATM- und ATR [58]. Die Aktivierung der Kinase ATR ist von herausragender Bedeutung bei endogenen, Replikationsstress in der S-Phase [54]. Möglicherweise ist in den Exon 14 Klonen die ATR-Phosphorylierungsstelle an diesem Serin von BRCA1 verändert, was die Signalkaskade in diesen Klonen beeinflusst und zu einem erhöhten Stressniveau geführt haben könnte. Diese Annahme sollte in zukünftigen Experimenten überprüft werden. Als nächstes wurde die Fähigkeit der BRCA1-Klone untersucht, die HR über die Rekrutierung von RAD51 nach endogenen DNA-Schäden zu initiieren.

4.2.3.3 Reduzierte Bildung spontaner RAD51 Foci

Endogene DNA-Schäden z.B. während der Replikation können über RAD51 die DNA-Reparatur in der Zelle aktivieren und sogar außerhalb der S-Phase zur Rekrutierung von RAD51 führen [251]. RAD51 hat daher nicht nur eine wesentliche Funktion bei der DNA-Reparatur, sondern übernimmt auch eine schützende Funktion während der Replikation. RAD51 schützt zusammen mit BRCA2 die Replikationsgabeln vor nukleolytischem Abbau, wenn diese durch DNA-Schäden angehalten werden mussten [189, 302]. Bei der klassischen DNA-Reparatur und der Erkennung von DNA-Doppelstrangbrüchen agiert RAD51 [286] zusammen mit BRCA1 [303] und bildet nukleäre Foci, die mit γ H2AX interagieren. Eine reduzierte Anzahl endogener RAD51 Foci lag in den BRCA1-Klonen vor, mit Ausnahme von Klon 14.2 und Klon 9.3 (vgl. Abb. 3.7 (B)). Aufgrund der reduzierten BRCA1 Expression in diesen Klonen schien daher nur eine begrenzte Rekrutierung von RAD51 zu den endogenen DNA-Schäden möglich zu sein. Ein vollständiges Fehlen von RAD51 Foci war in den BRCA1-Klonen nicht zu erwarten, da BRCA1 immer noch reduziert exprimiert wurde und die modifizierten Exons keine Regionen für die Interaktion mit RAD51 kodieren. Eine eingeschränkte Bildung von RAD51 Foci zeigte die HCC1937, was von Hill et al., 2014 bestätigt wird [276].

Reduzierte endogene DNA-Schäden wurden mit γ H2AX Foci in den Exon 9 Klonen nachgewiesen, die eine reduzierte RAD51 Foci-Bildung verursacht haben könnten, mit Ausnahme von Klon 9.3. Der reduzierte DNA-Schaden in diesen Klonen erforderte daher nur eine reduzierte Initiierung der HR. Trotz hoher endogener DNA-Schäden (siehe γ H2AX) kam es in Exon 14 Klonen nur zu einer verminderten Bildung von RAD51 Foci, so dass in diesen Klonen nur eine eingeschränkte Einleitung der DNA-Reparatur vorlag. Die begrenzte DNA-Reparatur könnte durch die reduzierte CHK1 Expression verstärkt worden sein, da CHK1 die zentralen Faktoren der HR wie RAD51 und BRCA2 phosphoryliert und damit die Rekrutierung von RAD51 zu dem DSB stimuliert [304].

Abschließend trat in den meisten BRCA1-Klonen mit reduzierter BRCA1 Expression eine verminderte Bildung von spontanen RAD51 Foci auf. Die Folgen der verminderten Reparatur, insbesondere bei Exon 14 veränderten Klonen, wurden anhand von Chromatinbrücken und Mikrokernen weiter analysiert.

4.2.3.4 Endogener Stress anhand vermehrter Chromatinbrücken und Mikrokerne

Eine eingeschränkte Funktion von RAD51 hat schwerwiegende Folgen während der Replikation. Nach endogenen DNA-Schäden und Anhalten der Replikationsgabeln müssen diese durch RAD51 geschützt werden [189, 302]. Fehlt dieser Schutz, entstehen in der Anaphase der Mitose sog. *Chromatinbrücken* oder auch *Anaphasebrücken* genannt, die normalerweise den Arrest der Mitose aktivieren [305]. Die Entstehung von Chromatinbrücken wird gefördert, wenn trotz unvollständiger Replikation durch replikativen Stress der Übergang von der S-Phase in die Mitose erfolgt [306].

Daher können die unterschiedlichen Niveaus der endogenen DNA-Schäden (γ H2AX) in den BRCA1-Klonen die Replikation beeinträchtigt haben, was zu vermehrten Chromatinbrücken in der Mitose geführt haben könnte. Das hohe Niveau der endogenen DSBs in den Exon 14

veränderten Klonen ließ ein vermehrtes Auftreten von Chromatinbrücken erwarten. Chromatinbrücken wurden jedoch nur in einem einzigen Exon 14 veränderten Klon (Klon 14.3) nachgewiesen: Dabei wiesen 50 % der Zellen des Klons 14.3 Chromatinbrücken auf (vgl. Abb. 3.7 (C)). Im Gegensatz dazu wurden in den anderen Exon 14 Klonen und allen Exon 9 Klonen keine Zellen mit Chromatinbrücken beobachtet. Dieser Befund kann auf einen geringen Grad an endogener DNA-Schädigung zumindest in den Exon 9 Klonen zurückgeführt werden. In der Literatur wurde gezeigt, dass eine intakte HR essenziell ist, um Replikationsstress und die daraus resultierenden Chromatinbrücken zu vermeiden: Zum Beispiel wurden eine *RAD51*-Defizienz [307] und ein milder HR-Defekt als Ursache für Chromatinbrücken beobachtet [308]. In der vorliegenden Arbeit konnte ein solcher Defekt nur in Klon 14.3 nachgewiesen werden, der von allen Klonen das höchste Niveau an endogenen DNA-Schäden und Chromatinbrücken aufwies. Ein weiterer Hinweis auf erhöhte endogene DNA-Schädigung sind die sog. *Mikrokerne* im Cytosol. Nach endogenem Stress können Mikrokerne aus Chromatinbrücken entstehen, die bei der Mitose zu chromosomalen Fragmenten und azentrischen Chromosomen führen, von einer nukleären Membran umschlossen werden und in der G1-Phase sichtbar werden [254]. Sie können auch nach einem vollständigen Verlust von Chromosomen in der Anaphase auftreten [309]. Mikrokerne haben gravierende Folgen in der anschließenden S-Phase, da keine vollständige Replikation stattfinden kann und chromosomale Aberrationen auftreten [310], die bei einer Fusion mit dem Nukleus sogar zu größeren chromosomalen Anomalien führen können [310]. Auf diese Weise akkumulieren Zellen irreversible DNA-Schäden, die die genomische Instabilität unterstützen. Die Untersuchung der BRCA1-Klone auf Zellen mit Mikrokernen ergab Folgendes: Nur ein BRCA1-Klon (Klon 14.3) wies einen hohen Anteil an Zellen mit Mikrokernen auf (vgl. Abb. 3.7 (D)). Dieser Klon war bereits durch einen hohen Anteil an Zellen mit Chromatinbrücken gekennzeichnet. Dagegen zeigten die anderen Exon 14 Klone und alle Exon 9 Klone einen Anteil an Zellen mit Mikrokernen, der mit dem der MCF7 vergleichbar war (vgl. Abb. 3.7 (D)). Für MCF7 Zellen sind endogen nur wenige Zellen mit Mikrokernen bekannt [311]. Dieses niedrige endogene Niveau wurde durch die spezifische Veränderung des Exons 14 von *BRCA1* in Klon 14.3 erhöht. Trotz hoher endogener DNA-Schäden wurden in diesem Klon nur eine reduzierte Zahl an RAD51 Foci gebildet, was auf eine eingeschränkte Initiierung der HR und einen mangelnden Schutz der Replikationsgabeln hinwies. Die ebenfalls hohen Niveaus an endogenen DSBs in den anderen Exon 14 Klonen äußerten sich jedoch nicht in dem Auftreten von Chromatinbrücken und Mikrokernen. Das niedrige Niveau endogener DNA-Schäden in den in Exon 9 veränderten Klonen deutet jedoch auf eine effizientere HR in der Reparatur der DSBs und beim Schutz der Replikationsgabeln hin.

Die Aktivierung der HR für die DNA-Reparatur oder für den Schutz der Replikationsgabel erfolgt über zwei Unterwege in der DNA-Schadensantwort: Nach replikationsassoziierten DNA-Schäden werden ATR und CHK1 [53] aktiviert, nach DSBs jedoch hauptsächlich ATM und CHK2 [54]. Folgen der reduzierten CHK1 Expression in den BRCA1-Klonen könnten die Reparatur replikationsassoziiierter Schäden zusätzlich zur DSB-Reparatur beeinflusst haben. Diese Annahme muss jedoch in zukünftigen Experimenten verifiziert werden.

Zusammenfassend wirkte sich die reduzierte BRCA1 Expression in unterschiedlichem Ausmaß

auf die endogenen DNA-Schäden aus, wobei eine Veränderung in Exon 14 das Niveau endogener Schäden erhöhte. Ein Klon zeigte die höchsten Werte und wies neben endogenen DSBs auch Chromatinbrücken und Mikrokerne auf. Im Gegensatz dazu verursachte eine Veränderung in Exon 9 zusammen mit der BRCA1 Reduktion ein reduziertes Auftreten an DSBs. Trotz dieser Unterschiede war bei den meisten BRCA1-Klonen die Initiierung der RAD51 Foci begrenzt. Die reduzierte BRCA1 Expression und damit verminderte CHK1 Expression beeinflussen nicht nur die DNA-Reparatur, sondern wirken sich aufgrund ihrer Funktionen im Zellzyklus auch auf diesen aus. BRCA1 reguliert in einem heterodimeren Komplex mit BARD1 verschiedene Kontrollpunkte im Zellzyklus und kann die Kontrollpunkte in der G1- und S-Phase, der Intra-S-Phase [128] und in der G2- und M-Phase aktivieren [110, 131]. Phosphoryliertes CHK1 hingegen kann den Kontrollpunkt der G2- und M-Phase aktivieren [110] und sowohl den Intra-S- [312] als auch den G2-Phase-Arrest [313] vermitteln. Bei DNA-Schäden und Replikationsstress interagiert BRCA1 mit CHK1 und stabilisiert angehaltene Replikationsgabeln und verzögert den Übergang zur Mitose [314]. Die Auswirkungen einer reduzierten BRCA1 und CHK1 Expression auf die Proliferation und Zellzyklusverteilung wurden daher in den BRCA1-Klonen untersucht.

4.2.4 Exon-abhängig veränderte Proliferationsrate und Exon-unabhängig veränderte Zellzyklusverteilung

4.2.4.1 Exon-abhängig erhöhte bzw. verringerte Proliferationsrate

Abhängig von dem betroffenen Exon veränderte sich die Proliferationsrate in den BRCA1-Klonen, mit einer erhöhten Proliferationsrate in den Exon 9 veränderten Klonen (vgl. Abb. 3.8 (A)). Eine Ausnahme war Klon 9.2, der insgesamt die niedrigste Proliferationsrate aufwies. Eine niedrige Proliferationsrate wurde bei den in Exon 14 veränderten Klonen beobachtet (vgl. Abb. 3.8 (A)). Bei einem vollständigen Verlust von *BRCA1* wurde bisher eine erhöhte Wachstumsrate der Tumorzellen des Ovarialkarzinoms beobachtet [315]. Studien, die spezifisch die Auswirkungen von Mutationen in Exon 9 bzw. Exon 14 von *BRCA1* zusammen mit einer reduzierten BRCA1 Expression auf die Proliferation untersucht haben, fehlen bisher, weshalb in der vorliegenden Arbeit erstmals solche Beobachtungen gemacht wurden. Die Auswirkungen eines Verlusts von Exon 9 sind bisher nur mit dem Verlust zusätzlicher Exons (wie Exon 10 und Exon 11) in verschiedenen Spleißvarianten von *BRCA1* untersucht worden [316]. In einer weiteren Studie wurde bei einer erhöhten Expression dieser Spleißvarianten eine Lokalisation in den Mitochondrien beobachtet, wo sie eine anti-proliferative Aktivität zeigten [317]. Diese Beobachtungen bei einer alleinigen Veränderung von Exon 9 des *BRCA1* Gens wurden in der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt. Die reduzierte Proliferationsrate in BRCA1-Klonen, die in Exon 14 verändert waren, könnte durch Veränderungen von Regionen der SCD-Domäne verursacht worden sein. Mutationen in dieser Region, die zu einem Austausch von Serin gegen Alanin führten, wurden in Ovarialkarzinomzellen mit einer Veränderung der DNA-Reparatur und Aufhebung des G2/M-Kontrollpunkts beobachtet [318]. Die Folgen waren ein unkontrollierter Übergang zur Mitose und die Entwicklung mitotischer Aberrationen, die Chromosomenaberrationen und den Zelltod über die mitotische

Katastrophe auslösten [318]. Daher könnten in den in Exon 14 veränderten Klonen die Serinreste für diese Phosphorylierungen verändert worden sein, wodurch die Proliferation beeinträchtigt und verlangsamt wurde. Eine veränderte Zellzyklusverteilung könnte zudem die Proliferationsrate beeinflusst haben.

4.2.4.2 Verkürzte S-Phase in den BRCA1-Klonen

Eine leicht verkürzte S-Phase trat in allen BRCA1-Klonen außer in Klon 9.2 auf, unabhängig vom betroffenen Exon und der Anzahl intakter Allele, welche in einer Akkumulation von Zellen in der G1- bzw. G2-Phase resultierte (vgl. Abb. 3.8 (B)). Aufgrund der Exon-unabhängigen Zellzyklusverteilung in den BRCA1-Klonen könnte die reduzierte Expression von BRCA1 die Zellzyklusverteilung geringfügig verändert haben. Die verkürzte S-Phase in den Klonen könnte die reduzierte BRCA1 [319] und CHK1 Expression [320] verstärkt haben, da diese Proteine vorzugsweise in der S/G2-Phase exprimiert werden. Trotz verkürzter S-Phase kam es in den BRCA1-Klonen zu einer leicht erhöhten RAD51 Expression, obwohl RAD51 in Abhängigkeit vom Zellzyklus in der S/G2-Phase exprimiert wird und in nicht-proliferierenden Zellen keine Expression vorhanden ist [321]. Die Unterschiede in den BRCA1-Klonen waren jedoch im Vergleich zur MCF7 gering (G2: 7,9 %; S: 44,1 % und G1: 48,0 %). Die leicht verkürzte S-Phase in den BRCA1-Klonen könnte durch eine veränderte Bindung von BRCA1 an die hypophosphorylierte Form des Rb Proteins (engl. *retinoblastoma protein*) bedingt worden sein. Normalerweise bindet BRCA1 an das Rb Protein und induziert die De-Phosphorylierung über die Inhibition von CDK2 (engl. *cyclin dependent kinase 2*), was zu einer Akkumulation von Zellen in der G1- oder G2-Phase aufgrund eines Zellzyklusarrests führt [322]. Eine erhöhte Bindung von BRCA1 an Rb könnte daher in den Klonen stattgefunden haben und zu der verkürzten S-Phase geführt haben. Es muss jedoch berücksichtigt werden, dass es sich hierbei um einen momentanen Ausschnitt handelt und dass keine Synchronisierung der Zellen stattgefunden hatte. Ergebnisse bezogen auf die HCC1937 werden weitgehend in der Literatur bestätigt (G2: 14,2 %; S: 42,3 % und G1: 43,5 %) [323].

Zusammenfassend beeinflusste die BRCA1 Reduktion die Expression von Proteinen, die an der DNA-Reparatur beteiligt sind, und verursachte Exon-abhängig ein verändertes Ausmaß an endogenen DNA-Schäden. Die Proliferationsrate war je nach Exon erhöht (Exon 9, mit Ausnahme von Klon 9.2) oder verringert (Exon 14), während sich die Zellzyklusverteilung in allen BRCA1-Klonen nur geringfügig veränderte. Nachdem die BRCA1-Klone hinsichtlich ihrer Proteinexpression, der endogenen DNA-Schäden, der Proliferationsrate und der Zellzyklusverteilung charakterisiert worden waren, wurde der Einfluss dieser Veränderungen auf die Funktionalität der Homologen Rekombination nachgewiesen und überprüft.

4.3 BRCA1 Reduktion beeinflusst speziell die DSB-Reparatur der Homologen Rekombination in MCF7

4.3.1 Reduzierte DSB-Reparatur in den BRCA1-Klonen

BRCA1 ist als essenzielles Protein in die HR involviert, weshalb *BRCA1*-defiziente Zellen einen ausgeprägten HR-Defekt und eine Überempfindlichkeit gegenüber DNA-schädigenden Agenzien aufweisen [258].

In der vorliegenden Arbeit wurden die Auswirkungen einer reduzierten BRCA1 Expression auf die Funktionalität der HR in den BRCA1-Klonen untersucht. Zunächst wurde die relative HR-Kapazität mit dem Plasmid-Rekonstruktionsassay (PRA; *GFP reporter assay*) bestimmt [259, 260]. Eine signifikant reduzierte HR-Kapazität zeigten die meisten der BRCA1-Klone, mit Ausnahme von Klon 14.2 (vgl. Abb. 3.9 (B)). Eine beeinträchtigte HR bei den BRCA1-Klonen wurde aufgrund der reduzierten BRCA1 Expression erwartet und folglich bestätigt. Die niedrigste HR-Kapazität, um 77 % reduziert, zeigte Klon 14.3. Im Gegensatz dazu zeigte ein Klon (Klon 14.2) eine um 33 % gesteigerte HR-Kapazität. In diesem Klon war die BRCA1 Expression lediglich um 10 % reduziert, während die RAD51 Expression leicht erhöht war. Die erhöhte HR-Kapazität wurde durch eine hohe Anzahl von spontanen RAD51 Foci bestätigt (vgl. Abschnitt 4.2.3). Trotz erhöhter Anzahl von RAD51 Foci und relativer HR-Kapazität war dieser Klon durch ein hohes Niveau an DSBs charakterisiert (vgl. Abschnitt 4.2.3). Der Ursprung der hohen endogenen DNA-Schäden in diesem Klon könnte auf eine eingeschränkte Funktion der HR während der Replikation hinweisen. Diese replikationsassoziierte Funktion der HR sowie eine aktivierte DNA-Schadensantwort werden im PRA nicht erfasst. Diese etablierte Methode ist nur für die Untersuchung von artifiziell induzierten DSBs geeignet. Daher können mit diesem Assay nur Rückschlüsse auf die Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen gezogen werden. Ein Defekt in der Reparatur von DSBs wurde in einer Studie von Litman et al., 2005 über die im PRA nachgewiesene HR-Kapazität nach *Knockdown* von *BRCA1* über siRNA in MCF7 bestätigt [89]. Die reduzierte HR-Kapazität in Bezug auf die DSB-Reparatur in den BRCA1-Klonen könnte durch den reduzierten Anteil an S-Phase-Zellen (vgl. 4.2.4) verstärkt worden sein, weshalb in den Klonen möglicherweise eine geringfügig höhere HR-Kapazität vorliegt. Die erhöhte RAD51 Expression in den BRCA1-Klonen führte dagegen nicht zu einer erhöhten HR-Kapazität. Dieser Befund wird durch eine Studie von Parplys et al., 2015 bestätigt, in welcher Zellen mit einer erhöhten RAD51 Expression eine verminderte HR-Kapazität im PRA zeigten und sogar eine erhöhte Sensitivität gegenüber MMC festgestellt wurde [293]. In einer anderen Studie wurde ebenfalls festgestellt, dass Zellen mit einer erhöhten RAD51 Expression keine verbesserte Reparatur aufwiesen und sogar eine exzessive und unkontrollierte HR sowie chromosomale Aberrationen zeigten [291]. Somit führte eine erhöhte RAD51 Expression zu keiner verbesserten Reparaturkapazität.

Für die genaue Charakterisierung eines HR-Defekts ist es daher wichtig, den PRA immer im Kontext weiterer Analysen zu betrachten. In der vorliegenden Arbeit wurde daher lediglich festgestellt, dass in sieben der acht BRCA1-Klone eine reduzierte Reparatur von DSBs durch die HR vorlag.

4.3.2 Exon-abhängige Reparatur residueller DNA-Schäden nach MMC

4.3.2.1 Eingeschränkte RAD51 Rekrutierung nach exogenen DNA-Schäden

Die Funktionalität der HR wurde weiter analysiert, indem die Fähigkeit der BRCA1-Klone untersucht wurde, nach MMC-induzierten DNA-Schäden RAD51 Foci zu bilden (vgl. Abb. 3.10 (B)). Eine reduzierte Fähigkeit lag in allen BRCA1-Klonen, bis auf Klon 9.3, vor und war unabhängig vom veränderten Exon und der Anzahl intakter Allele. Eine reduzierte und eingeschränkte RAD51 Foci-Bildung wurde bereits in Zellen mit einer *BRCA1*-Defizienz beobachtet [117].

Die in der vorliegenden Arbeit nachgewiesene Anzahl von RAD51 Foci in der MCF7 Zelllinie nach MMC-Behandlung wird durch Ergebnisse von Meyer und Becker, 2020 bestätigt [261]. In der HCC1937 wurden trotz eines verkürzten BRCA1-Proteins RAD51 Foci nach Schädigung mit MMC nachgewiesen. Dieser Befund wird von Sy et al., 2009 bestätigt, welche die Bildung von RAD51 Foci in der HCC1937 nach Schädigung durch ionisierende Strahlung beobachteten [126]. Eine andere Studie zeigte ein vollständiges Fehlen von RAD51 Foci in *BRCA1*-defizienten MEF Zellen sechs Stunden nach MMC-Behandlung [324]. Diese Zellen waren zudem durch einen Defekt in p53 gekennzeichnet und wiesen kein verkürztes BRCA1-Protein wie die HCC1937 Zellen auf [324].

Daher kann ein vollständiger Verlust von *BRCA1* in Kombination mit einem Verlust von p53 die Bildung von RAD51 Foci verhindern. Im Gegensatz dazu sind einige Zellen mit einem verkürzten BRCA1-Protein in der Lage, in reduzierter Weise RAD51 Foci zu bilden. Allerdings liegt in den BRCA1-Klonen neben einem *wildtyp TP53* kein vollständiger Verlust von *BRCA1* vor, was die begrenzte, aber vorhandene RAD51 Foci-Bildung erklärt. Darüber hinaus könnte in den BRCA1-Klonen die Bildung von RAD51 Foci teilweise durch eine von BRCA1 unabhängige Rekrutierung von RAD51 stattgefunden haben, wie von Nakada et al., 2012 beschrieben [325]. Zusammenfassend lässt der Zeitpunkt von sechs Stunden nach Behandlung nur die Aussage zu, dass die Initiierung von RAD51 Foci in den BRCA1-Klonen eingeschränkt war. Daher bestand der nächste Schritt darin, das Vorhandensein residueller RAD51 Foci in den BRCA1-Klonen 24 Stunden nach MMC-induzierten DNA-Schäden zu bestimmen.

4.3.2.2 Residuelle DNA-Doppelstrangbrüche nach MMC

Nach DNA-Schädigung durch MMC war der Anstieg an DSBs (γ H2AX Foci) in den BRCA1-Klonen unterschiedlich ausgeprägt und hing vom veränderten Exon ab (vgl. Abb. 3.11 (A)). Hohe Niveaus induzierter DSBs waren in Exon 14 veränderten Klonen (Klon 14.2 und Klon 14.3) vorhanden und lagen in höherem Ausmaß als in der MCF7 und in den Exon 9 veränderten Klonen vor (vgl. Abb. 3.11 (A)). Neben der BRCA1 Reduktion schienen die veränderten Exons das Auftreten der DNA-Schäden beeinflusst zu haben. Eine Zunahme an DSBs (γ H2AX) 24 Stunden nach MMC wurde bereits für die MCF7 beschrieben [326, 261]. Ein höheres Niveau an MMC-induzierten DSBs zeigte die HCC1937 im Vergleich zur MCF7. Diese Beobachtung stimmt mit den Ergebnissen von Krum et al., 2010 überein, die nach einem *Knockdown* von *BRCA1* erhöhte γ H2AX-Level auch ohne exogene Schädigung beobachteten [303]. Die erhöhten residuellen DSBs in den Exon 14 veränderten Klonen deuteten darauf hin, dass diese

Region von BRCA1 eine essenzielle Rolle bei der DNA-Reparatur spielt, wie z.B. die lokalisierten Bereiche der Phosphorylierungsstellen für ATM und ATR [105, 58, 127]. Veränderungen in den Regionen, die von Exon 14 kodiert werden, könnten Bereiche der SCD-Domäne mit Phosphorylierungsstellen von ATM (an den Positionen S1423, S1524, S1387) und ATR (an den Positionen S1423, S1524, S1457) verändert haben [105, 127]. Eine beeinträchtigte Phosphorylierung könnte zu einem vermehrten Auftreten von DSBs nach MMC in diesen Klonen geführt haben, die ineffizienter repariert wurden als z.B. in den Exon 9 veränderten Klonen oder in der MCF7. Die Effizienz der Reparatur dieser DNA-Schäden wurde im nächsten Schritt anhand der Anzahl residueller RAD51 Foci 24 Stunden nach der Schädigung durch MMC untersucht.

4.3.2.3 Auflösung residueller RAD51 Foci

Bei den BRCA1-Klonen lag eine reduzierte Anzahl residueller RAD51 Foci nach MMC-induzierten DNA-Schäden vor (vgl. Abb. 3.11 (B)). Die geringste Anzahl wiesen die in Exon 9 veränderten Klone auf. Ein hoher Anteil von residuellen RAD51 Foci wurde in zwei Klonen, die in Exon 14 verändert waren (Klon 14.2 und Klon 14.3), beobachtet. Der zweifache Anstieg der RAD51 Foci nach der MMC-Behandlung in MCF7 stimmt mit den Ergebnissen der Dissertation von F. Meyer, 2019 [326] überein. Residuelle RAD51 Foci wurden zudem in der HCC1937 Zelllinie beobachtet, jedoch in einem begrenzten Ausmaß im Vergleich zur MCF7. Dieses Ergebnis wird in der Arbeit von Hill et al., 2014 bestätigt, in der eine eingeschränkte DSB-Reparatur durch reduzierte RAD51 Foci-Bildung, jedoch ohne Beeinträchtigung der schützenden replikationsassoziierten Funktion der HR, nachgewiesen wurde [276]. So beeinträchtigt das verkürzte BRCA1-Protein ausschließlich die DNA-Doppelstrang-Reparatur der HR in der HCC1937 [250, 327]. Eine andere Arbeit dagegen zeigte, dass nach *Knockdown* bzw. durch eine Mutation von *BRCA1* keine RAD51 Foci nach DNA-Schädigung wie durch ionisierende Strahlung gebildet wurden [328]. Dagegen wurde in einer weiteren Studie beobachtet, dass MEF-Zellen nach einem homozygoten *Knockout* von Exon 11 von *BRCA1* nach MMC-Schädigung RAD51 Foci bilden können [329]. Weitere Studien identifizierten Mutationen in *BRCA1*, die spezifisch die Interaktion mit PALB2 verhindern, als Ursache für die reduzierte RAD51 Foci-Bildung und verminderte HR [126, 330]. Dementsprechend beeinflusst die veränderte Region des *BRCA1* Gens, die Proteinexpression und die Translation eines verkürzten BRCA1-Proteins die Bildung von RAD51 Foci nach Schädigung.

In der vorliegenden Arbeit könnte daher sowohl die reduzierte BRCA1 Expression als auch das spezifisch veränderte Exon zu der reduzierten RAD51 Foci-Bildung geführt haben. Darüber hinaus könnte die reduzierte BRCA1 Expression in den Exon 9 veränderten Klonen zu einer effizienteren DNA-Reparatur und damit zu einer schnelleren Auflösung der RAD51 Foci nach exogenen DNA-Schäden durch MMC geführt haben. Im Gegensatz dazu zeigten Exon 14 Klone mit reduzierter BRCA1 Expression eine verlangsamte Dynamik bei der Auflösung der RAD51 Foci. Der Vorteil einer reduzierten BRCA1 Expression wurde möglicherweise in diesen Klonen durch die Veränderung in Exon 14 verhindert. Die Auswirkungen der veränderten Dynamik bei der Bildung und Auflösung der RAD51 Foci auf die Entstehung weiterer DNA-Schäden wurden

über die Betrachtung der Chromatinbrücken und Mikrokerne 24 Stunden nach MMC-Behandlung in den BRCA1-Klonen untersucht.

4.3.2.4 Erhöhtes Auftreten von Chromatinbrücken und Mikrokernen nach exogener Schädigung

Endogen wurden bereits deutliche Unterschiede in Bezug auf die DNA-Schäden in den BRCA1-Klonen festgestellt (vgl. Abschnitt 4.2.3). Auffallend war ein in Exon 14 veränderter Klon (Klon 14.3), der bereits endogen Chromatinbrücken und Mikrokerne zeigte. Das Auftreten von Chromatinbrücken in diesem Klon wurde durch exogene Schädigung durch MMC erhöht (vgl. Abb. 3.11 (C)). Die Entstehung von Mikrokernen nach Schädigung durch MMC wurde erstmals von Benning et al., 1992 beschrieben [331]. Klon 14.3 wies einen hohen Anteil von Mikrokernen vor und nach Schädigung durch MMC auf (vgl. Abb. 3.11 (D)). In den anderen BRCA1-Klonen dagegen stieg der Anteil der Zellen mit Mikrokernen vergleichbar zur MCF7 (vgl. Abb. 3.11 (D)). Eine erhöhte Anzahl von Zellen mit Mikrokernen nach Schädigung durch MMC ist in MCF7 bereits bekannt [332]. Diese Anzahl schien in den meisten der BRCA1-Klone unbeeinflusst zu bleiben. Im Gegensatz dazu deutet der hohe Anteil an Chromatinbrücken und Mikrokernen in Klon 14.3 auf erhöhten Replikationsstress im Vergleich zur MCF7 hin, der durch exogene Schädigung weiter gesteigert wurde.

Zusammenfassend erhöhte die MMC-Behandlung das Ausmaß an DNA-Schäden, wobei ein Klon die höchste Anzahl von Chromatinbrücken und Mikrokernen aufwies. Die eingeleitete RAD51-vermittelte DNA-Reparatur zeigte hierbei eine unterschiedliche Effizienz, während Exon 9 veränderte Klone die RAD51 Foci schnell auflösen konnten, zeigten die Exon 14 Klone eine verlangsamte Dynamik. Die Auswirkungen der unterschiedlichen DNA-Schäden und der unterschiedlich schnellen Auflösung des Reparaturkomplexes auf das Überleben nach DNA-schädigenden Agenzien wurden anschließend analysiert.

4.3.3 Exon- und Allel-Abhängigkeit der Sensitivität gegenüber DNA-schädigenden Agenzien

4.3.3.1 Exon- und Allel-abhängige MMC-Sensitivität

Die Funktionalität der HR kann weiter durch das zelluläre Überleben nach MMC charakterisiert werden. Das Agens MMC induziert Schäden, die durch die HR repariert werden müssen. Zu diesen Schäden gehören Quervernetzungen von DNA-Strängen, die hoch toxisch sind, da sie die Transkription und Replikation in der Zelle verhindern [262]. Infolge der beeinträchtigten Replikation werden DSBs verursacht, die über die HR repariert werden müssen [258]. Daher führt ein HR-Defekt zu einer Überempfindlichkeit gegenüber ICL-induzierenden Agenzien, was mit *RAD51*-defizienten Zellen nachgewiesen wurde [333].

In der vorliegenden Arbeit wurde eine erhöhte Sensitivität gegenüber MMC bei den meisten BRCA1-Klonen nachgewiesen (vgl. Abb. 3.12). Die Empfindlichkeit war vom veränderten Exon und der Anzahl intakter Allele abhängig. Die MMC-Sensitivität wurde anhand des IC_{50} -Wertes bestimmt, der die Konzentration des Agens angibt, bei der die halbmaximale Inhibition erreicht wird [263]. Die MCF7 wies einen IC_{50} -Wert von 0,39 $\mu\text{g/ml}$ auf, was in der Literatur

bestätigt wird (0,40 µg/ml) [276]. Eine erhöhte Sensitivität wurde durch eine Veränderung von Exon 14 erreicht, wobei Klon 14.3 mit einem IC₅₀-Wert von 0,18 µg/ml die höchste MMC-Sensitivität aufwies. Dieser Klon war durch ein hohes Maß endogener und MMC-induzierter DNA-Schäden, Chromatinbrücken und Mikrokerne gekennzeichnet (vgl. Abschnitt 4.2.3 und 4.3.1), was zu der hohen Empfindlichkeit geführt haben könnte.

Im Gegensatz dazu führte eine Veränderung in Exon 9 zu Resistenzen und erhöhten Empfindlichkeiten. Zwei in Exon 9 veränderte Klone (Klon 9.2 und Klon 9.3) zeigten eine erhöhte Resistenz, mit einem IC₅₀-Wert von 0,46 µg/ml. Diese Klone wiesen eine reduzierte Anzahl von DNA-Schäden nach MMC im Vergleich zu den in Exon 14 veränderten Klonen auf (vgl. Abschnitt 4.3.1). Die anderen Exon 9 Klone (Klon 9.1, Klon 9.4 und Klon 9.5) waren dagegen durch eine erhöhte MMC-Sensitivität charakterisiert. Die unterschiedlichen MMC-Sensitivitäten hingen demnach nicht nur vom veränderten Exon ab, sondern auch von der Anzahl intakter *BRCA1* Allele. Klone mit einem intakten *BRCA1* Allel zeigten Exon-unabhängig eine erhöhte Sensitivität, während Klone mit zwei intakten Allelen dagegen eine erhöhte Resistenz aufwiesen (vgl. Abb. 3.13). Ein weiterer Faktor, welcher zu den unterschiedlichen Empfindlichkeiten beitrug, könnte eine begrenzte Aktivierung der DNA-Reparatur nach MMC-induzierten DNA-Schäden sein. Durch MMC erzeugte DNA-Schäden sind häufig ICLs [262], die während der Replikation ein Hindernis darstellen und zu einem ein-endiger DSB führen [258]. Nach DNA-Schäden wie z.B. ICLs kann neben der Aktivierung der HR der FA Signalweg induziert werden. In diesem Signalweg bindet monoubiquitiniertes und aktiviertes FANCD2 an das Chromatin, so dass die Replikationsgabel geschützt wird und die Reparatur eingeleitet werden kann [189, 94, 334]. In der vorliegenden Arbeit wurde in den *BRCA1*-Klonen bereits endogen eine eingeschränkte Monoubiquitinierung von FANCD2 nachgewiesen, die überwiegend in Exon 14 veränderten Klonen vorlag (vgl. Abschnitt 4.2.3). Für die Aktivierung von FANCD2 nach MMC-induzierten ICLs ist die Phosphorylierung von FANCD2 an Serin S331 notwendig, die über CHK1 erfolgt und die MMC-Sensitivität bestimmt [296]. Eine reduzierte CHK1 Expression (vgl. Abschnitt 4.2.2) wurde nach reduzierter *BRCA1* Expression in den Klonen nachgewiesen. Die verringerte CHK1 Expression könnte zu einer verminderten Phosphorylierung und Aktivierung von FANCD2 geführt und zu einer erhöhten MMC-Sensitivität in den Exon 14 veränderten Klonen beigetragen haben. Um diese Annahme zu bestätigen, muss jedoch die Monoubiquitinierung von FANCD2 nach Behandlung mit MMC in den *BRCA1*-Klonen in zukünftigen Experimenten untersucht werden.

Die Folgen einer heterozygoten *BRCA1*-Mutation in MCF7 Zellen wurden in einer Studie von Cousineau und Belmaaza, 2007 untersucht [335]. Diese Studie zeigte, dass ein heterozygoter *BRCA1*-Status in MCF7 einen Phänotyp mit einer reduzierter HR-Effizienz (DSB-Reparatur) und erhöhter Sensitivität gegenüber DSB-induzierenden Agenzien wie z.B. MMC erzeugt [335]. Dieser Phänotyp wurde in den Exon 14 veränderten Klonen und in einigen Klonen, die in Exon 9 verändert waren, bestätigt. Ein solcher Phänotyp ist für Mutationen, die für ein verkürztes *BRCA1*-Protein kodierten, jedoch nicht beschrieben [335].

Die weitere Charakterisierung der Funktionalität der HR erfolgte durch Analysen des zellulären Überlebens nach Olaparib.

4.3.3.2 Exon-unabhängige und Allel-abhängige Olaparib-Sensitivität

Die erhöhten MMC-Sensitivitäten und die begrenzte Bildung von RAD51 Foci in den meisten BRCA1-Klonen deuteten auf einen HR-Defekt hin. Um das Vorhandensein einer HR-Defizienz in diesen Klonen zu bestätigen, wurde die Sensitivität gegenüber PARP-Inhibition untersucht. Es wurde der Effekt der synthetischen Letalität bei der Inhibition von PARP und einem gleichzeitigen HR-Defekt bisher beschrieben [141, 142, 143]. Bei der synthetischen Letalität der PARP Inhibitoren und einer HR-Defizienz, ist Funktion von PARP bei der Reparatur von Einzelstrangbrüchen von Bedeutung: PARP erkennt SSBs, synthetisiert polymere Adenosin-Diphosphat-Ribose-(PAR)-Ketten und rekrutiert weitere Reparaturproteine [144, 146].

Die Inhibition von PARP1 durch Olaparib führt dazu, dass PARP1 auf der Replikationsgabel gehalten wird (engl. *trapping*) und keine weiteren Reparaturproteine rekrutiert werden können, weshalb nach Kollision mit der Replikationsgabel ein ein-endiger DSB entsteht [142, 148, 147]. Olaparib wirkt daher hauptsächlich während der Replikation in der S-Phase. Eine fehlerfreie Reparatur in der S-Phase kann demnach nur über die HR erfolgen [149]. Aufgrund der Olaparib-Sensitivität können daher Aussagen über die Reparatur von DNA-Schäden in der S-Phase und damit über die Funktion der HR während der Replikation getroffen werden. Die über den IC_{50} -Wert [263] bestimmte Olaparib-Empfindlichkeit war bei den BRCA1-Klonen unterschiedlich (vgl. Abb. 3.14 (A)). Die Sensitivität war unabhängig vom veränderten Exon, aber abhängig von der Anzahl intakter *BRCA1* Allele (vgl. Abb. 3.14 (A), (B) und Abb. 3.15). Bei vier der acht Klone wurde eine erhöhte Sensitivität durch den IC_{50} -Wert und durch das zelluläre Überleben nach 2 μ M Olaparib beobachtet. Es wurde jedoch eine überwiegend erhöhte Empfindlichkeit aufgrund einer reduzierten HR-Kapazität und verminderten Bildung von RAD51 Foci erwartet. Die MCF7 zeigte einen IC_{50} -Wert von 1,00 μ M, was in der Literatur (0,97 μ M) bestätigt wird [336]. Klon 9.2 wies einen unveränderten IC_{50} -Wert von 1,00 μ M auf. Zwei andere Klone zeigten dagegen eine erhöhte Olaparib-Resistenz, unabhängig vom betroffenen Exon: Klon 14.2 (IC_{50} : 1,40 μ M) und Klon 9.3 (IC_{50} : 1,70 μ M). Der Vergleich der überlebenden Zellfraktion nach 2,00 μ M Olaparib ergab vier resistente Klone (Klon 9.2, Klon 9.3, Klon 9.5 und Klon 14.2) und vier sensitive Klone (Klon 9.1, Klon 9.4, Klon 14.1 und Klon 14.3). Somit zeigte die Mehrheit der in Exon 9 veränderten Klone eine erhöhte Resistenz gegen Olaparib. Es war auffällig, dass alle Olaparib-resistenten Klone zwei intakte *BRCA1* Allele aufwiesen, während die Olaparib-sensitiven Klone nur ein intaktes *BRCA1* Allel besaßen (vgl. Abb. 3.15). Bei diesen Klonen könnten nach Reduktion der drei *BRCA1* Allele auf zwei Allele vor allem die DSB-Reparaturfunktion der HR betroffen gewesen sein, während die replikationsassoziierten HR-Funktionen möglicherweise effizienter waren.

Es sind mehrere Mechanismen bekannt, die in *BRCA*-defizienten Tumoren/ Tumorzellen zu einer Resistenz gegen Inhibition von PARP führen [197]. Dazu gehört die Wiederherstellung der HR, die Nacson et al., 2018 in einer Studie identifizierten [337]. Sie postulierten, dass Olaparib-resistente und *BRCA1*-mutierte Tumorzellen in der Lage waren, mit PALB2 zu interagieren und trotz eines verkürzten *BRCA1*-Proteins RAD51 Foci zu bilden [337]. Diese Zellen zeigten zudem einen Defekt in *53BP1* (engl. *p53-binding protein 1*) [337]. Daher führte der gleichzeitige Verlust von *BRCA1* und ein Defekt in *53BP1*, einem Faktor des NHEJ, zu einer

Reaktivierung der HR [338, 337]. Das 53BP1-Protein würde normalerweise das NHEJ initiieren, indem es die Resektion der DNA-Enden und damit den initialen Schritt der HR unterbindet [339]. Bei den BRCA1-Klonen lag jedoch kein Verlust von *53BP1* vor. Eine andere Erklärung für die unterschiedlichen Empfindlichkeiten könnte eine beeinträchtigte Interaktion von BRCA1 mit PALB2 in den Exon 14 veränderten Klonen sein, da das *Coiled coil*-Strukturmotiv für die Interaktion mit PALB2 in der SCD-Domäne liegt, die teilweise von Exon 14 kodiert wird. Eine andere Studie assoziierte Resistenzen gegen PARP-Inhibition mit Mutationen in der BRCT-Domäne oder einem vollständigen Verlust der BRCT-Domäne von BRCA1 [340]. Dieser Mechanismus wurde in den BRCA1-Klonen ausgeschlossen, da die BRCT-Domäne nicht verändert wurde. In einer weiteren Studie wurde eine erhöhte Abhängigkeit von ATR in *BRCA1*-defizienten und Olaparib-resistenten Zellen nachgewiesen; diese Zellen konnten RAD51 zu DSBs und zu angehaltenen Replikationsgabeln trotz einer *BRCA1*-Defizienz rekrutieren [341]. Durch die Anwendung von ATR-Inhibitoren wurden diese Zellen gegen PARP1-Inhibition resensibilisiert [341]. Daher wäre es wichtig, diesen Mechanismus in weiteren Experimenten bei den BRCA1-Klonen zu untersuchen. Möglicherweise führten Veränderungen in einigen der Exon 14 Klone zu veränderten Bereichen der Phosphorylierungsstelle für ATR, was eine Erklärung für die erhöhte Sensitivität ist, während in Exon 9 veränderten Klonen und einem Exon 14 Klon eine erhöhte ATR-Abhängigkeit die *BRCA1* Reduktion kompensieren könnte. Insgesamt deuteten die unterschiedlichen Olaparib- und MMC-Sensitivitäten auf eine unterschiedlich eingeschränkte HR in den BRCA1-Klonen hin. Der Einfluss dieser beeinträchtigten HR auf die Strahlenempfindlichkeit wurde daher anhand des zellulären Überlebens nach ionisierender Strahlung in den BRCA1-Klonen untersucht.

4.3.3.3 Exon- und Allel-abhängige Strahlenempfindlichkeit

Ionisierende Strahlung erzeugt ein breites Spektrum diverser DNA-Schäden, wobei hauptsächlich Schädigungen der Basen verursacht werden, gefolgt von SSBs und in geringerem Anteil DNA-Protein-Quervernetzungen, DNA-Quervernetzungen und DSBs [245]. Indirekte Schäden werden durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS, engl. *reactive oxygen species*) verursacht [245].

Zellen in der späten G1- und G2-Phase und während der Mitose haben die höchste Strahlenempfindlichkeit, während in der S-Phase eine erhöhte Strahlenresistenz aufgrund eines erhöhten Niveaus von Proteinen der DNA-Synthese und -Reparatur und eines erhöhten Niveaus von intrazellulärem Glutathion, das als Radikalfänger wirkt, vorhanden ist [342, 343]. In der G2/M-Phase kann vor der Trennung der Chromosomen keine adäquate Reparatur stattfinden, was ebenfalls zu der hohen Strahlenempfindlichkeit in dieser Zellphase beiträgt [343]. Von allen durch ionisierende Strahlung verursachten DNA-Schäden ist der DNA-Doppelstrangbruch eine biologisch zytotoxische Läsion, die nur durch die HR fehlerfrei repariert werden kann [149]. Bei einer HR-Defizienz muss die Zelle jedoch auf alternative, fehlerhafte Reparaturwege wie das NHEJ [62] oder das SSA [64] zurückgreifen. Das NHEJ steht in allen Phasen des Zellzyklus zur Verfügung [62], während die HR aufgrund eines notwendigen Schwesterchromatids auf die S/G2-Phase beschränkt ist [63]. Die SSBs oder beschädigten Basen, die durch ionisierende Strahlung erzeugt werden [245], sind ein Hindernis für die

Replikationsgabel während der Replikation, was zu einem ein-endigen DSB führt [39]. Dieser Schaden wird hauptsächlich durch die HR repariert [149], da ein DSB-Ende für das NHEJ fehlt [62]. Ionisierende Strahlung erzeugt jedoch hauptsächlich DSBs mit zwei Enden, die über das NHEJ oder über die HR in der G2-Phase repariert werden können [344]. Das NHEJ ist durch eine hohe Fehleranfälligkeit charakterisiert [62], weshalb Zellen mit einem HR-Defekt eine hohe Strahlenempfindlichkeit aufweisen [345]. Die Strahlenempfindlichkeit ist daher ein Indiz für eine HR-Defizienz bzw. -Profizienz. Daher zeigen *BRCA1*-defizienten Zellen eine hohe Strahlenempfindlichkeit, wie in einer Studie von Foray et al., 1999 unter Verwendung von HCC1937 bestätigt wurde [345].

In der vorliegenden Arbeit zeigten die meisten *BRCA1*-Klone Exon-abhängig eine erhöhte (Exon 14) oder teilweise reduzierte (Exon 9) Strahlenempfindlichkeit (vgl. Abb. 3.16). Die Radiosensitivität wurde durch das zelluläre Überleben nach ionisierender Strahlung unter Verwendung des D_{37} -Wertes bestimmt. Der D_{37} -Wert entspricht der Dosis, bei der statistisch gesehen jede Zelle mindestens ein letales Ereignis erfährt und 37 % der Zellen überleben. Eine erhöhte Radiosensitivität wurde bei den *BRCA1*-Klonen mit einem veränderten Exon 14 beobachtet, wobei Klon 14.3 der radiosensitivste Klon war (D_{37} : 2,0 Gy). Im Gegensatz dazu wurden neben einer erhöhten Strahlenempfindlichkeit in Klon 9.1 und Klon 9.4 und unveränderten Empfindlichkeit (Klon 9.3), einige Exon 9 Klone mit einer erhöhten Radioresistenz beobachtet (Klon 9.2 (D_{37} : 3,6 Gy) und Klon 9.5 (D_{37} : 3,1 Gy)). Der D_{37} -Wert von 3,0 Gy der MCF7 wurde in der Dissertation von F. Meyer, 2019 [326] bestätigt.

Insgesamt waren die Unterschiede in der Radiosensitivität nicht von der *BRCA1* Expression, sondern von der relativen HR-Kapazität abhängig: So korreliert das Überleben nach 4 Gy mit der relativen HR-Kapazität ($R^2=0,85$; p-Wert: 0,0012) (vgl. Abb. 3.17 (A)). Der radiosensitivste Klon 14.3 wies daher die niedrigste HR-Kapazität auf. Die anderen Klone zeigten Unterschiede im zellulären Überleben nach 4 Gy in Abhängigkeit von der relativen HR-Kapazität. Der Klon mit der höchsten HR-Kapazität (Klon 14.2) zeigte ein relativ hohes zelluläres Überleben nach 4 Gy. Darüber hinaus beeinflusste die Anzahl der intakten *BRCA1* Allele das zelluläre Überleben nach 4 Gy (vgl. Abb. 3.17 (B)). *BRCA1*-Klone mit einem intakten Allel wiesen ein signifikant reduziertes zelluläres Überleben auf, im Vergleich zur MCF7 mit drei intakten Allelen und den *BRCA1*-Klonen mit zwei intakten Allelen. Neben der Abhängigkeit von der Anzahl intakter Allele sind veränderte Regionen der ATM-abhängigen Phosphorylierungsstellen in Exon 14 veränderten Klonen ein Grund für die erhöhte Strahlenempfindlichkeit. Die Phosphorylierung von *BRCA1* an diesen Serinresten wurde von Cortez et al., 1999 als ein wichtiger Mechanismus identifiziert, der wesentlich zur Radioresistenz beiträgt [105]. Andere Studien bestätigen diesen Befund und fügen hinzu, dass die ATM-abhängige Phosphorylierung von *BRCA1* wichtig für die Radioresistenz ist, aber nicht essenziell für die HR-vermittelte Reparatur ist [105, 346]. In einigen Exon 14 Klonen (Klon 14.1 und Klon 14.3) könnten veränderte ATM-Phosphorylierungsstellen eine erhöhte Strahlenempfindlichkeit verursacht haben, während Klon 14.2 aufgrund einer erhöhten HR-Kapazität eine erhöhte zelluläre Überlebensrate nach 4 Gy zeigte.

Zusammenfassend lag in den *BRCA1*-Klonen eine Exon- und Allel-abhängige Sensitivität gegenüber MMC und ionisierender Strahlung vor. Die Olaparib-Sensitivität hing von der

Anzahl intakter *BRCA1* Allele ab und nur teilweise vom veränderten Exon. Die durch MMC und Bestrahlung induzierten DNA-Schäden unterschieden sich von den durch Olaparib-induzierten Schäden, die hauptsächlich in der S-Phase auftraten. Weiterhin zeigten Klone, die eine erhöhte Radio- oder MMC-Resistenz aufwiesen, auch eine erhöhte Olaparib-Resistenz. Eine gesteigerte Reparatur von replikationsassoziierten DNA-Schäden in der S-Phase könnte bei diesen Klonen zu einer erhöhten Radio-, MMC- und Olaparib-Resistenz geführt haben. In zukünftigen Experimenten müsste diese Vermutung bestätigt werden, indem replikationsassoziierte Funktionen der HR spezifisch und separiert von den Funktionen der HR in der DSB-Reparatur untersucht werden.

Um die Ursachen für die unterschiedlichen Sensitivitäten zu identifizieren, wurden der Klon mit der höchsten MMC-, Olaparib- und Radio-Resistenz (Klon 9.2) und der mit der höchsten Sensitivität (Klon 14.3) getrennt analysiert.

4.3.4 Eigenschaften des resistentesten und sensitivsten *BRCA1*-Klons

4.3.4.1 Charakteristika des resistentesten Klon 9.2

Der Klon mit den höchsten Resistenzen gegen MMC und ionisierende Strahlung war in Exon 9 verändert (Klon 9.2) und wies zwei intakte *BRCA1* Allele auf. Bei diesem Klon wurde zudem eine erhöhte Resistenz gegen Olaparib festgestellt. Die endogenen Schäden (DSBs) waren in diesem Klon im Vergleich zur MCF7 nur leicht erhöht, die Anzahl der RAD51 Foci war reduziert. Es wurden keine Chromatinbrücken nachgewiesen und dieser Klon wies eine mit der MCF7 vergleichbare Anzahl von mikronukleären Zellen auf. Dieser Klon zeigte die niedrigste Proliferationsrate ohne eine verkürzte S-Phase. Im Gegensatz zur Mehrheit der *BRCA1*-Klone war die Expression von FANCD2 in diesem Klon nicht stark erhöht und der monoubiquitinierte Anteil von FANCD2 nur leicht reduziert. Die CHK1 Expression war auf 0,71 reduziert. Wie bei fast allen *BRCA1*-Klonen war die HR-Kapazität in diesem Klon reduziert und es wurden wenige RAD51-Foci nach MMC induziert. Dieser Befund deutete auf eine eingeschränkte DSB-Reparatur in diesem Klon hin. Die *BRCA1* Expression war lediglich um 18 % reduziert und die RAD51 Expression war geringfügig erhöht.

4.3.4.2 Charakteristika des sensitivsten Klon 14.3

Der sensitivste Klon (Klon 14.3) war in Exon 14 verändert und wies ein intaktes *BRCA1* Allel auf. Dieser Klon zeigte die höchste Empfindlichkeit gegen MMC und ionisierende Strahlung und war zudem gegenüber Olaparib sensitiv. Auffallend hohe Niveaus an endogenen DSBs, Chromatinbrücken und Mikrokernen bei gleichzeitig reduzierter Anzahl an RAD51 Foci deuteten auf einen ausgeprägten Reparaturdefekt in diesem Klon hin. Dieser Klon zeigte im Vergleich zur MCF7 eine nahezu unveränderte Proliferationsrate, jedoch mit einer verkürzten S-Phase. Die CHK1 Expression war auf 0,88 reduziert; die FANCD2 Expression war bei gleichzeitig reduzierter Monoubiquitinierung erhöht. Die niedrigste HR-Kapazität war in diesem Klon vorhanden. Nach Schädigung durch MMC zeigte dieser Klon einen hohen Anteil an DSBs. Außerdem kam es zu einer verzögerten Einleitung der DNA-Reparatur, da nach sechs Stunden nur wenige RAD51 Foci initiiert wurden. Eine verzögerte Auflösung der RAD51 Foci nach 24 Stunden deutete ebenfalls auf eine beeinträchtigte DSB-Reparatur hin. Die *BRCA1*

Expression wurde in diesem Klon ebenfalls nur um 17 % reduziert, während die RAD51 Expression um 31 % erhöht wurde.

Bei dem Vergleich des resistentesten Klons mit dem Klon mit der höchsten Sensitivität lagen die deutlichsten Unterschiede in dem veränderten Exon und in der Anzahl veränderter *BRCA1* Allele vor, ohne einen Zusammenhang mit der reduzierten *BRCA1* Proteinexpression. Darüber hinaus zeigten diese Klone erhebliche Unterschiede in dem Niveau der endogenen und durch MMC-induzierten DNA-Schäden, wobei Klon 14.3 mit der höchsten Sensitivität die höchsten Werte aufwies. Anschließend wurde der Einfluss der veränderten Exons und der Anzahl der *BRCA1* Allele auf den Phänotyp und damit auf den Tumorstammzellanteil als Ursache für die erhöhte Sensitivität bzw. Resistenz untersucht.

4.4 Tumorstammzellanteil bestimmt Resistenz in *BRCA1* reduzierten MCF7-Klonen

Tumorstammzellen und ihr Anteil bestimmen die Chemo- [194] und Radioresistenz [198, 199] im heterogenen Tumorgewebe und sind durch verschiedene Marker charakterisiert [207, 265]. *BRCA1* spielt eine regulatorische Rolle im Kontext der CSCs beim Mammakarzinom [231] und bei Differenzierungsprozessen von Stammzellen des epithelialen Brustgewebes [230]. Neben der Assoziation mit Resistenzen wurde eine erhöhte Expression von CSC-assoziierten Genen beim hochaggressiven Subtyp des Mammakarzinoms TNBC beschrieben [347].

Daher wurde ein veränderter Anteil dieser Zellpopulation als mögliche Ursache für die Resistenzen in den *BRCA1*-Klonen untersucht. Die Auswirkungen einer reduzierten *BRCA1* Expression auf die Eigenschaften der Tumorstammzellen und den Anteil der CSC-Population wurden in den *BRCA1*-Klonen im Vergleich zur MCF7 analysiert. Die erste Bewertung erfolgte anhand der Zellmorphologie. Nur ein Klon (Klon 9.2) zeigte auffällige zellmorphologische Veränderungen (vgl. Abb. 3.18). Dieser Klon war durch mesenchymale Eigenschaften wie spindelförmige Zellen [266] und durch eine veränderte Zellorganisation charakterisiert, wobei dieser mesenchymale Phänotyp einen erhöhten Stammzellcharakter und einen erhöhten CSC-Anteil anzeigte [267]. Daher wurden die epithelialen und mesenchymalen Merkmale auf der Grundlage des EMT-Status über die Expression der an der EMT beteiligten Faktoren weiter spezifiziert. Die EMT bezieht sich auf einen biologisch determinierten Prozess, bei dem sich eine Zelle von einem epithelialen zu einem mesenchymalen Phänotyp verändert [217, 218]. Im Normalgewebe spielt dieser Prozess eine Rolle bei der Differenzierung [217, 218] und bei der Wundheilung [219]. Ein solcher Prozess wurde jedoch auch in Tumorzellen des Mammakarzinoms beobachtet [348]. Der Erwerb eines mesenchymalen, tumorstammzellähnlichen Phänotyps wird durch zahlreiche Transkriptionsfaktoren wie *ZEB1*, *TWIST*, *SNAIL*, usw. erreicht [222]. Eine hohe Expression solcher Faktoren wurde zudem mit einem erhöhten Metastasierungspotenzial von z.B. Mammakarzinomzellen [349] und mit einem erhöhten stammzellähnlichen Phänotyp [350] assoziiert.

4.4.1 Dynamischer EMT-Status in BRCA1-Klonen

Der EMT-Status der BRCA1-Klone wurde im Western Blot unter Verwendung des epithelialen Markers E-Cadherin und des regulatorischen Transkriptionsfaktors ZEB1 charakterisiert. Die Unterdrückung von E-Cadherin führt zu einem invasiven, mesenchymalen Phänotyp [268]. Der Faktor ZEB1 unterdrückt epitheliale Eigenschaften [351] und unterstützt damit die Dedifferenzierung zu einem stammzellähnlichen Phänotyp von Tumorzellen [352] und einen invasiven Phänotyp [353]. ALDH1A1 wurde als unabhängiger Stammzellmarker verwendet, da die Überexpression ein weiteres Merkmal von CSCs ist [215, 267].

In der vorliegenden Arbeit wurde eine erhöhte ZEB1 Expression in den BRCA1-Klonen vorgefunden (vgl. Abb. 3.19). Dieser Befund deutet auf eine erhöhte Stammzellartigkeit in den Klonen hin, da eine erhöhte ZEB1 Expression in CSCs bekannt ist [269]. ZEB1 reguliert und initiiert einen pro-invasiven und stammzellähnlichen Phänotyp über seine regulatorische Rolle in der EMT [353].

Die Charakterisierung der epithelialen Eigenschaften über E-Cadherin zeigte deutliche Unterschiede in den BRCA1-Klonen (vgl. Abb. 3.19). Eine erhöhte Expression von E-Cadherin wurde in allen Exon 14 veränderten Klonen nachgewiesen, die auf einen epithelialen Phänotyp hinwies, da ein Verlust einen mesenchymalen Phänotyp unterstützt [268]. Im Gegensatz dazu war Expression von E-Cadherin nur in zwei in Exon 9 veränderten Klonen erhöht (Klon 9.1 und Klon 9.5), bei jedoch gleichzeitig erhöhter ZEB1 Expression. Dieser Befund widerspricht der Kenntnis, dass ZEB1 die E-Cadherin Expression über epigenetische Mechanismen unterdrückt, indem es Chromatin-Enzyme zum Promoter *CDH1* Gens (E-Cadherin) rekrutiert [354]. Die erhöhte E-Cadherin und gleichzeitig erhöhte ZEB1 Expression in diesen Klonen lässt auf einen Übergangszustand (den „Hybrid“-Phänotyp) zwischen dem epithelialen und mesenchymalen Phänotyp schließen, welcher u.a. schon im Lungenadenokarzinom beschrieben wurde [355]. Dagegen zeigten die anderen Exon 9 Klone (Klon 9.3 und Klon 9.4) eine reduzierte Expression von E-Cadherin oder eine zur MCF7 unveränderte Expression (in Klon 9.2), was einen mesenchymalen, tumorstammzellähnlichen Phänotyp unterstützt. Eine ähnliche E-Cadherin Expression in MCF7 und in der HCC1937 wurde von Dybdal-Hargreaves et al., 2018 bestätigt [356]. Diese zeigten zudem eine cytoplasmatische Lokalisation von E-Cadherin in der HCC1937 mittels Immunfluoreszenz [356]. Daher wäre es sinnvoll, in zukünftigen Ansätzen neben der Expression der EMT-Marker auch die Lokalisation dieser Faktoren immunocytochemisch zu analysieren. Aufgrund der dynamischen Veränderung des EMT-Status darf eine Beurteilung des Tumorstammzellcharakters nicht allein von einzelnen Faktoren abhängen, sondern muss stets in Verbindung mit weiteren unabhängigen Faktoren erfolgen.

Daher wurde die Expression von ALDH1A1 in den BRCA1-Klonen untersucht (vgl. Abb. 3.19). ALDH1 gehört zur Familie der Aldehyd-Dehydrogenasen 1 und fungiert als unabhängiger Stammzellmarker von normalen und malignen Stammzellen [213, 267]. Die Isoform ALDH1A1 wurde bei erhöhter Expression mit dem Tumorstammzellstatus assoziiert [357]. Eine leicht erhöhte ALDH1A1 Expression wurde in einigen BRCA1-Klonen (Klon 14.1, Klon 14.2, Klon 9.1 und Klon 9.5) nachgewiesen, während andere Klone fast keine Veränderung zeigten (Klon 9.2, Klon 9.3, Klon 9.4 und Klon 14.3). Die reduzierte BRCA1 Expression, das veränderte

Exon und die Allel-Anzahl schienen keinen direkten Einfluss auf die Expression von ALDH1A1 zu haben. Dies steht im Widerspruch zu den Ergebnissen der Studie von Kim et al., 2019 in der ein Anstieg in stammzellassozierten Markern nach *BRCA1 Knockdown* über siRNA in der Mammakarzinomzelllinie SKBR3 beobachtet wurde [231]. Außerdem wurde keine Korrelation zwischen der ZEB1 Expression und der ALDH1A1 Expression festgestellt ($R^2 = 0,14$).

Zusammenfassend wurden in den BRCA1-Klonen unterschiedliche Expressionsniveaus der EMT-Faktoren E-Cadherin und ZEB1 sowie des Stammzellmarkers ALDH1A1 vorgefunden. Jedoch wurde lediglich eine Veränderung des EMT-Status festgestellt, aber kein definiertes Expressionsmuster identifiziert. In diesem Zusammenhang ist es wichtig zu beachten, dass es sich bei den Prozessen der EMT- und des CSC-Phänotyps um dynamische und transiente Zustände handelt. Demzufolge können transiente Zustände existieren, die nicht absolut dem epithelialen oder mesenchymalen Status zugeordnet werden können. Diese dynamische Plastizität ist für CSCs bekannt, bei denen die epithelialen Zellen eher proliferativ sind, während die mesenchymalen Zellen durch ein hohes Migrationspotenzial gekennzeichnet sind [267, 268]. Folglich können CSCs unabhängig von ihrer Stammzellartigkeit einen epithelialen oder mesenchymalen Phänotyp aufweisen [267]. Für die Bestimmung des Anteils an CSCs wurde daher die Aktivität der ALDH ermittelt.

4.4.2 Erhöhte ALDH-Aktivität in resistenten BRCA1-Klonen

Ein weiteres wesentliches Merkmal von CSCs ist neben der Expression von ALDH1A1 die Aktivität der Aldehyd-Dehydrogenasen, die mithilfe des *ALDEFLUORTM* Assays bestimmt werden kann [213]. Die Population der CSCs im Mammakarzinom mit dem Subtyp Luminal oder *HER2*-positiv ist spezifisch durch Aldefluor-positive Zellen charakterisiert [358]. Daher erlaubt die Analyse der ALDH-Aktivität eine eindeutige Identifizierung der CSC-Population in der MCF7 Zelllinie mit dem Subtyp Luminal A.

Deutliche Unterschiede in dem Anteil der Zellen mit erhöhter ALDH-Aktivität wurden in den BRCA1-Klonen festgestellt; diese waren von der Anzahl intakter *BRCA1* Allele abhängig (vgl. Abb. 3.20 (B) und Abb. 3.21). Im Gegensatz dazu war die CSC-Population unabhängig vom veränderten Exon, vom Ausmaß der *BRCA1* Reduktion und von der im Western Blot nachgewiesenen ALDH1A1 Expression. Die ALDH1A1 Expression war unabhängig von der ALDH-Aktivität, da der *ALDEFLUORTM* Assay neben der Aktivität von ALDH1A1 auch die Aktivität anderer Isoformen der Aldehyd-Dehydrogenasen misst. Zhou et al., 2019 identifizierten ALDH-Isoformen (ALDH1A2, ALDH1A3, ALDH1B1, ALDH2, ALDH3A1, ALDH3A2, ALDH3B1 und ALDH5A1), die im *ALDEFLUORTM* Assay eine Aktivität zeigten [359]. ALDH1 hat jedoch einen hohen Anteil an der nachgewiesenen Aktivität im Mammakarzinom [213], mit der höchsten Aktivität von ALDH1A3 [360].

Ein erhöhter Anteil Aldefluor-positiver Zellen lag in einigen BRCA1-Klonen (Klon 14.2, Klon 9.2, Klon 9.3 und Klon 9.5) im Vergleich zur MCF7 vor (vgl. Abb. 3.20 (B)). In diesen Klonen war daher der Anteil der CSC-Population erhöht. Den höchsten Anteil zeigte Klon 9.2 mit 46,73 % verglichen zur MCF7 mit 28,63 %. In anderen Klonen (Klon 14.1 mit 20,89 % und Klon 9.4 mit 19,09 %) dagegen war der Anteil an CSCs reduziert oder es wurde keine Veränderung zur MCF7 beobachtet (Klon 9.1 mit 29,05 % und Klon 14.3 mit 28,62 %). In einer Studie von Kim

et al., 2019 wurde nach einem *BRCA1 Knockdown* über siRNA in der Mammakarzinomzelllinie SKBR3 eine Zunahme der Population der Aldefluor-positiven Zellen beschrieben [231]. Der in der vorliegenden Arbeit ermittelte Anteil Aldefluor-positiver Zellen von 24,49 % in der HCC1937 war in dieser Studie deutlich höher (40 %) [231]. In der MCF7 Zelllinie führte, wie in der vorliegenden Arbeit beobachtet, bereits eine Reduktion der amplifizierten drei *BRCA1* Allele auf zwei Allele zu einer signifikant erhöhten ALDH-Aktivität (p-Wert: 0,014 im Vergleich zur MCF7; p-Wert: 0,003 im Vergleich zu einem Allel), während eine Reduktion der Allele auf ein intaktes *BRCA1* Allel diesen Effekt aufhob oder die Aktivität sogar reduzierte (p-Wert: 0,1533, ns) (vgl. Abb. 3.21). Somit hatte die Amplifikation der *BRCA1* Allele auf drei Allele und eine Reduktion auf ein Allel keinen Vorteil in Bezug auf die Tumorstammzellartigkeit in der MCF7. Ein ausgewogenes Niveau von zwei Allelen, wie es in der normalen diploiden Zelle vorhanden ist, schien den stammzellartigen Charakter in MCF7 aufgrund einer erhöhten ALDH-Aktivität zu verursachen.

Ein hoher Anteil an CSCs in den *BRCA1*-Klonen wurde mit einer erhöhten Resistenz gegen verschiedene DNA-schädigenden Agenzien assoziiert, während ein reduzierter CSC-Anteil eine höhere Sensitivität verursachte (vgl. Abb. 3.21). Der erhöhte Anteil an Tumorstammzellen wurde daher als ein Resistenzmechanismus in den *BRCA1*-Klonen identifiziert. Der Klon mit dem höchsten CSC-Anteil (Klon 9.2 mit 46,75 %) wies die höchste Resistenz gegen MMC und ionisierende Strahlung auf und war resistent gegen Olaparib, gefolgt von Klon 9.3 mit 39,67 % und einer erhöhten MMC- und Olaparib-Resistenz (MCF7: 28,63 %). Klon 9.5 zeigte eine erhöhte Radio- und Olaparib-Resistenz und einen Anteil an CSCs von 36,91 %. Nur in einem in Exon 14 veränderten Klon (Klon 14.2) war der CSC-Anteil mit 38,83 % erhöht; dieser Klon zeigte eine erhöhte Olaparib-Resistenz. Unter Verwendung der PE (nach 2,00 μ M Olaparib) wurde bei allen *BRCA1*-Klonen mit erhöhtem CSC-Anteil eine erhöhte Olaparib-Resistenz beobachtet (vgl. Abb. 3.14 und Abb. 3.15). Es konnte ein Zusammenhang des Anteils an CSCs mit der Anzahl intakter *BRCA1* Allele nachgewiesen werden, aber es wurde kein Einfluss der reduzierten *BRCA1* Proteinexpression beobachtet. Darüber hinaus war in einigen der resistenten Klone (Klon 9.2 und Klon 14.2) die Proliferationsrate reduziert (vgl. Abschnitt 4.2.4), was ebenfalls einen tumorstammzellartigen Phänotyp unterstützt. Ähnlich wie normale Stammzellen besteht die chemo- und radio-resistente CSC-Population aus langsam proliferierenden oder ruhenden Zellen (engl. *quiescent cells*) [361]. Bei einem reduzierten Anteil von CSCs (Klon 14.1 mit 20,89 % und Klon 9.4 mit 19,09 %) oder unverändertem Anteil (Klon 9.1 mit 29,05 % und Klon 14.3 mit 28,62 %) zeigten die *BRCA1*-Klone eine erhöhte Empfindlichkeit.

Zusammenfassend wurde durch eine reduzierte *BRCA1* Expression und in Abhängigkeit von der Anzahl intakter *BRCA1* Allele bei einigen Klonen der Tumorstammzellanteil erhöht und eine phänotypische Veränderung eingeleitet. Ein Klon (Klon 9.2) zeigte sehr ausgeprägte Veränderungen der Zellmorphologie und des EMT-Status sowie den höchsten Anteil an CSCs. Im Gegensatz dazu zeigten die anderen *BRCA1*-Klone, hauptsächlich Exon 14 veränderte Klone, nur geringe Veränderungen und eine dynamisch veränderte Expression der EMT-Faktoren und wiesen mit Ausnahme von Klon 14.2 eine überwiegend reduzierte Anzahl an

CSCs auf. Ein erhöhter Anteil an CSCs, bestimmt durch die Aktivität von ALDH, hing von der Anzahl intakter *BRCA1* Allele ab und war mit dem Auftreten verschiedener Resistenzen in den Klonen assoziiert. Abschließend stellt der erhöhte Anteil von Tumorstammzellen eine Ursache für das Auftreten von Resistenzen in den *BRCA1*-Klonen dar.

Eine Vielzahl von hochregulierten DNA-Reparaturwegen wie z.B. die HR wurden bisher als Ursache für die erhöhte Resistenz der Tumorstammzellen identifiziert [203, 202]. Bei Tumorstammzellen des hochaggressiven Subtyps TNBC wurde trotz eines *BRCA1*-Defekts eine Resistenz über *RAD51* vermittelt [194]. Aufgrund der erhöhten Reparaturkapazität wäre in Tumorstammzellen mit weniger DNA-Schäden zudem weniger cytosolische DNA zu erwarten, was zu einer reduzierten Aktivierung der intrazellulären Immunantwort führen würde. Es ist jedoch nicht bekannt, ob eine hochregulierte HR und weniger DNA-Schäden bei CSCs zu einer reduzierten Akkumulation von dsDNA im Cytosol führen und damit die Aktivierung der intrazellulären Immunantwort beeinflussen. Daher wurden die Akkumulation cytosolischer dsDNA in den *BRCA1*-Klonen und eine veränderte Aktivierung der intrazellulären Immunantwort nach Bestrahlung untersucht. Es wurde angenommen, dass die *BRCA1*-Klone mit einem hohen Tumorstammzellanteil weniger endogene DNA-Schäden aufweisen und dadurch weniger dsDNA im Cytosol akkumulieren.

4.5 Endogen reduzierte Level cytosolischer dsDNA und keine Aktivierung der intrazellulären Immunantwort trotz strahlungsinduzierter Akkumulation

Zur Identifizierung einer reduzierten Akkumulation von dsDNA im Cytosol — möglicherweise in Abhängigkeit vom Anteil der CSCs — wurde die cytosolische dsDNA endogen und nach Bestrahlung in den *BRCA1*-Klonen untersucht. Weiterhin wurde eine aktivierte intrazelluläre Immunantwort durch Analyse der Expression immunrelevanter Gene überprüft.

Für einen HR-Defekt über einen *Knockdown* von *RAD51* zeigten Bhattacharya et al., 2017 bereits, dass diese Zellen endogen oder nach Schädigung durch ionisierende Strahlung DNA im Cytosol akkumulieren, die über den cGAS-STING Signalweg die intrazelluläre Immunantwort aktiviert [190]. Die cytosolische DNA kann aus Fragmenten stammen, die von einer nukleären Membran umgeben sind, aber fragil und instabil sind [362, 163]. cGAS kann zu diesen umschlossenen DNA-Fragmenten lokalisieren und die intrazelluläre Immunantwort auslösen [363] und dadurch die Expression von Interferon-stimulierenden Genen aktivieren [364]. In Tumorzellen kann nach endogenen oder exogenen DNA-Schäden wie durch ionisierende Strahlung DNA ins Cytosol freigesetzt werden [365] und den cGAS-STING Signalweg aktivieren, der zur anschließenden Produktion von Typ 1 Interferonen führt [365].

4.5.1 Hinweis auf eine strahlungsinduzierte Akkumulation cytosolischer dsDNA, ohne Aktivierung der Expression immunrelevanter Gene in zwei BRCA1-Klonen

Ein veränderter Anteil von CSCs in der Zellpopulation und ein unterschiedliches Niveau an endogenen DNA-Schäden wurden bereits in den BRCA1-Klonen festgestellt (vgl. Abschnitt 4.4.2 und 4.2.3). Ob dieser Befund das Niveau der cytosolischen dsDNA endogen und 16 Stunden nach 8 Gy Bestrahlung beeinflusst, wurde in den BRCA1-Klonen untersucht.

In der ersten immuncytochemischen Analyse von zwei BRCA1-Klonen (Klon 9.2 und Klon 9.5) konnte nach Bestrahlung ein Anstieg der cytosolischen dsDNA nachgewiesen werden (vgl. Abb. 3.22 (B)). Obwohl sich hauptsächlich ssDNA im Cytosol anreichert, ist die Menge der dsDNA entscheidend für die intrazelluläre Immunantwort [179, 366, 367]. Dies ist auf eine erhöhte Affinität von cGAS für dsDNA zurückzuführen, die nach der Erkennung durch STING die Signalkaskade induziert [368].

Daher wurde eine mögliche Aktivierung der intrazellulären Immunantwort in zwei BRCA1-Klonen (Klon 9.2 und Klon 9.5) testweise analysiert, indem die Expression immunrelevanter Gene (*IL-6*, *TLR-9* und *CXCR4*) nach ionisierender Strahlung in der *Quantitativen Echtzeit PCR* untersucht wurde [270, 272, 271]. Trotz erhöhter cytosolischer dsDNA nach Bestrahlung trat in diesen Klonen nur eine geringfügig veränderte Genexpression auf, die keine exakten Rückschlüsse auf eine aktivierte Immunantwort zulässt (vgl. Abb. 3.23). Für andere Zellen mit einem HR-Defekt wie z.B. *RAD51*-depletierten HT1080 Zellen wurde nach Bestrahlung eine erhöhte Expression der Gene *IL-6*, *TLR-9* und *CXCR4* beschrieben [190]. Ein solcher Effekt wurde in den BRCA1-Klonen und der MCF7 nicht festgestellt. Generell ist die MCF7 durch eine niedrige basale *IL-6* und *TLR-9* Expression [369] und eine niedrige Expression von *CXCR4* charakterisiert [370]. In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression dieser Gene in den BRCA1-Klonen durch eine reduzierte BRCA1 Expression oder strahlungsinduziert weder verändert noch erhöht. In anderen Studien wird jedoch häufig der Subtyp TNBC mit einem *BRCA1*-Defekt in Verbindung mit einer strahlungsinduzierten intrazellulären Immunantwort untersucht [163]. Diese Zellen zeigten einen hochregulierten cGAS-STING Signalweg, insbesondere in der S-Phase, und waren durch hohe Mengen cytosolischer DNA gekennzeichnet [163]. Häufig wurde dabei eine chronisch aktivierte Immunantwort über cGAS-STING beobachtet [371], die auf eine erhöhte genomische Instabilität zurückgeführt wurde und mit einer hohen Expression von Neo-Antigenen assoziiert war [372].

In der vorliegenden Arbeit wurde jedoch in der MCF7 Zelllinie des Subtyps Luminal A trotz strahlungsinduzierter cytosolischer DNA keine Aktivierung des cGAS-STING Signalweges beobachtet. Dies könnte auf die niedrige basale Expression der immunrelevanten Gene und auf keinen vollständigen Verlust von *BRCA1* (wie in den TNBCs) zurückzuführen sein.

Neben dem verwendeten Subtyp und der fehlenden *BRCA1*-Defizienz ist auch die verwendete Dosis der ionisierenden Strahlung eine weitere mögliche Ursache für die fehlende Aktivierung der intrazellulären Immunantwort.

In einer Studie wurde gezeigt, dass hohe Einzeldosen (10 bis 15 Gy) keine intrazelluläre Immunantwort induzieren, da die cytosolische DNA bereits vor Erkennung durch die Exonuklease TREX1 (engl. *three prime repair exonuclease 1*) degradiert wird [365]. Im

Gegensatz dazu führte fraktionierte Bestrahlung (8 Gy x 3) im Vergleich zu einer Einzeldosis von 20 Gy zu einer Aktivierung der intrazellulären Immunantwort aufgrund fehlender Aktivierung von TREX1 [365]. Gegensätzlich zu diesem Befund wurden in einer anderen Studie hohe Mengen cytosolischer DNA (ssDNA) in TNBC Zelllinien nach einer Einzeldosis von 10 Gy nachgewiesen [367]. In dieser Studie wurde eine erhöhte strahlungsinduzierte Expression immunrelevanter Gene in der TNBC Zelllinie MDA-MB-231 im Vergleich zur luminalen MCF7 festgestellt [367].

Daher tritt in Zelllinien mit TNBC Subtyp unabhängig von einer *BRCA1*-Defizienz eine erhöhte strahlungsinduzierte Aktivierung der intrazellulären Immunantwort auf. Dagegen sind für luminale Zelllinien wie für die MCF7 nur minimale Effekte beschrieben worden [367]. Die Akkumulation von cytosolischer DNA nach Bestrahlung wurde nicht nur bei *BRCA1*- oder HR-defizienten Tumorzellen [163] beobachtet, sondern auch bei HR-profizienten Tumorzellen [373]. Eine chronische Stimulation von cGAS-STING kann neben der Aktivierung des kanonischen cGAS-STING Signalweges über IRF3 auch zur Aktivierung des nicht-kanonischen Signalweges über den Faktor NF- κ B (engl. *nuclear factor kappa B*) führen, wie in der triple-negativen Mammakarzinomzelllinie MDA-MB-231 bereits beobachtet wurde [371]. Der nicht-kanonische cGAS-STING Signalweg spielt eine entscheidende Rolle bei Migrations- und Metastasierungsprozessen und wurde bei Tumorzelllinien mit hoher chromosomaler Instabilität beschrieben [371].

Für die in der vorliegenden Arbeit verwendete MCF7 Zelllinie ist jedoch keine chronische Aktivierung des cGAS-STING Signalweges bekannt. Eine fehlende Aktivierung des cGAS-STING Signalweges nach Bestrahlung muss jedoch in allen *BRCA1*-Klonen abschließend bestätigt werden. Neben dem kanonischen cGAS-STING Signalweg über die Aktivierung von IRF3 [374] müsste auch der nicht-kanonische cGAS-STING Signalweg über NF- κ B [371] untersucht werden. Weiterhin wäre es unerlässlich, die Produktion von Typ 1 Interferonen und der chemo-attraktiven Cytokinen wie *CXCL10* (engl. *C-X-C motif chemokine ligand 10*) und *CCL5* (engl. *CC-chemokine ligand 5*) auf Proteinebene zu untersuchen.

Nach dieser primären Analyse der cytosolischen dsDNA und einer aktivierten intrazellulären Immunantwort in Klon 9.2 und Klon 9.5, wurden alle *BRCA1*-Klone vor und nach Bestrahlung im *Picogreen*-Assay auf dsDNA im Cytosol analysiert.

4.5.2 Reduzierte endogene Level cytosolischer dsDNA und Akkumulation nach Bestrahlung

Ein strahlungsinduzierter Anstieg der dsDNA im Cytosol wurde in der Analyse aller *BRCA1*-Klone, der MCF7 und der HCC1937 im *Picogreen*-Assay bestätigt (vgl. Abb. 3.24). Auch andere Studien bestätigen einen Anstieg in der MCF7 Zelllinie: In einer Studie von Erdal et al., 2017 wurde bei MCF7 nach 24 Stunden nach Bestrahlung mit 10 Gy ein Anstieg an cytosolischer ssDNA festgestellt, der nicht so ausgeprägt war wie bei den TNBC Zelllinien [367]. Nach DNA-Schädigung (hier durch Mafosfamid) beobachteten Gaston et al., 2016 einen Anstieg der cytosolischen dsDNA in MCF7 [375]. Entgegen der Erwartung, dass ein erhöhter Tumorstammzellanteil endogen und nach Bestrahlung zu einem reduzierten Niveau

cytosolischer dsDNA führt, zeigten die meisten BRCA1-Klone unabhängig vom CSC-Anteil, dem veränderten Exon und der Anzahl intakter *BRCA1* Allele ein niedrigeres endogenes Niveau (bei sechs der acht BRCA1-Klone). Eine erhöhte strahlungsinduzierte Akkumulation cytosolischer dsDNA wurde in allen Exon 14 veränderten Klonen und einigen Exon 9 Klonen, bis auf Klon 9.2 und Klon 9.4, nachgewiesen. Das höchste Niveau cytosolischer dsDNA war bereits endogen in Klon 14.1 vorhanden und erhöhte sich daher nach Bestrahlung nur geringfügig. Klon 14.3 zeigte ebenfalls hohe Mengen cytosolischer dsDNA und endogener DNA-Schäden (vgl. Abschnitt 4.2.3), während das niedrigste Niveau endogen und nach Bestrahlung Klon 14.2 aufwies, was durch eine hohe relative HR-Kapazität in diesem Klon erklärt werden kann (vgl. Abschnitt 4.3.1). Der Befund, dass die Mehrheit der Klone nach Bestrahlung dsDNA im Cytosol akkumulierte, stimmt mit einer anderen Studie [163] überein, in der eine strahlungsinduzierte Anreicherung cytosolischer dsDNA nach einem vollständigen *BRCA1*-Verlust beobachtet wurde. In einigen der Exon 9 veränderten Klone (Klon 9.3 und Klon 9.5) wurde ein hoher strahlungsinduzierter Anstieg der cytosolischen dsDNA nachgewiesen. Diese Klone waren jedoch nicht durch ein hohes Ausmaß endogener DNA-Schäden charakterisiert (vgl. Abschnitt 4.2.3) und zeigten Resistenzen gegen MMC, Olaparib und Bestrahlung (vgl. Abschnitt 4.3.2). Ein weiterer Exon 9 veränderter Klon (Klon 9.1) zeigte ebenfalls eine erhöhte strahlungsinduzierte Akkumulation cytosolischer dsDNA, aber eine erhöhte Sensitivität (vgl. Abschnitt 4.3.2). Klon 9.2 und Klon 9.4 zeigten nahezu keine oder nur geringfügige strahlungsinduzierte Veränderungen in der cytosolischen dsDNA. Klon 9.2 zeigte eine erhöhte Resistenz, keine Mikrokerne und ein niedriges Niveau an endogenen DNA-Schäden, während Klon 9.4 eine hohe Sensitivität aufwies (vgl. Abschnitt 4.3.2 und 4.2.3). Somit entsprachen nur Klon 9.1 und Klon 9.2 dem erwarteten Phänotyp. Ein Zusammenhang der cytosolischen dsDNA (endogen, $R^2=0,049$ bzw. nach Bestrahlung, $R^2=0,001$) mit dem Anteil der Tumorstammzellen konnte nicht identifiziert werden (vgl. Abb. 3.25 (A) und (B)). Weiterhin wurde keine Korrelation der cytosolischen dsDNA (endogen bzw. nach Bestrahlung) mit der Strahlenempfindlichkeit (zelluläres Überleben nach 0 Gy bzw. 8 Gy) (vgl. Abb. 3.26 (A) und (B)) und dem strahlungsinduzierten Anstieg festgestellt (vgl. Abb. 3.26 (C) und (D)). Folglich verursachte die Reduktion von BRCA1, unabhängig vom Exon und der Anzahl intakter Allele, ein endogen niedrigeres Niveau an dsDNA im Cytosol und in den meisten BRCA1-Klonen eine erhöhte strahlungsinduzierte Akkumulation. Der Zustand war unabhängig vom Anteil der Tumorstammzellen und wurde daher als Ursache für die unterschiedlichen Radiosensitivitäten ausgeschlossen.

4.6 Zusammenfassung und Modell

4.6.1 Zusammenfassung

Die HR verhindert das Auftreten von genomischer Instabilität [65], einem Kennzeichen (engl. *hallmark*) von Tumorzellen [2, 3]. Eine hochregulierte HR in Tumorstammzellen führt daher zu einer hohen chromosomalen Stabilität und weniger DNA-Schäden in der S-Phase [203] und verursacht Chemo- [194] und Radioresistenzen [198, 199]. Dagegen haben andere Studien

einen erhöhten Tumorstammzellanteil nach einem *BRCA1* Verlust beobachtet [231]. Für eine reduzierte HR, z.B. durch eine *BRCA1*-Defizienz, wurden erhöhte DNA-Schäden in der S-Phase beschrieben [258], die als Fragmente im Cytosol akkumulieren und die intrazelluläre Immunantwort aktivieren können [190]. In Tumorstammzellen würde man daher aufgrund der hohen *BRCA1* Expression [228] und der verbesserten HR [194] weniger DNA im Cytosol und eine verminderte Aktivierung der intrazellulären Immunantwort erwarten. Diese Erkenntnisse fehlen jedoch, da keine geeigneten Systeme zur Verfügung stehen, um den Einfluss einer reduzierten Menge an HR-Proteinen wie z.B. von *BRCA1* auf den Anteil an CSCs und auf die intrazelluläre Immunantwort zu untersuchen.

Deshalb wurde in dieser Arbeit ein isogenes Zellsystem etabliert, um dieser Frage nachzugehen. Dazu wurde die epitheliale Mammakarzinomzelllinie MCF7 verwendet, um die Folgen einer reduzierten *BRCA1* Expression auf die HR, den Tumorstammzellanteil und die intrazelluläre Immunantwort zu analysieren. Hierfür wurden die drei *BRCA1* Allele der MCF7 über CRISPR/Cas9 in Exon 9 bzw. in Exon 14 spezifisch verändert. MCF7-Klone wurden erfolgreich in Exon 9 bzw. Exon 14 von *BRCA1* verändert, wobei fünf Klone validierte Veränderungen in Exon 9, drei in Exon 14 zeigten. Darüber hinaus wurden in der Hälfte der Klone zwei *BRCA1* Allele verändert und ein Allel in der anderen Hälfte, unabhängig vom Exon. Dementsprechend erlaubten die MCF7-Klone mit stabil reduzierten *BRCA1* Expressionsniveaus die Analyse einer veränderten HR in einem isogenen System.

Die *BRCA1* Proteinexpression war auf 0,97 bis maximal 0,57 reduziert, unabhängig von der Anzahl der veränderten Allele. Diese Reduktion war mit einer verringerten *CHK1* sowie einer erhöhten *FANCD2* und *RAD51* Expression assoziiert. In den meisten Klonen traten endogen weniger DNA-Schäden auf und eine erhöhte *FANCD2* Expression korrelierte invers mit einer verringerten Monoubiquitinierung. Veränderungen in Exon 9 verursachten eine erhöhte Proliferationsrate (mit Ausnahme von Klon 9.2), während ein verändertes Exon 14 eine verringerte bzw. unveränderte Proliferationsrate zur Folge hatte. Eine geringfügig verkürzte S-Phase trat bei nahezu allen Klonen auf. Auswirkungen auf die HR waren eine Exon-unabhängig reduzierte relative HR-Kapazität (Ausnahme Klon 14.2) und eine eingeschränkte *RAD51* Foci-Initiierung nach MMC (Ausnahme Klon 9.3). Die Anzahl residueller *RAD51* Foci nach 24 Stunden blieb in allen *BRCA1*-Klonen niedrig, mit einem Anstieg residueller DSBs überwiegend in Exon 14 veränderten Klonen. Eine verlangsamte Dynamik und Auflösung der residuellen *RAD51* Foci wurde teilweise in Exon 14 Klonen beobachtet. Die höchsten Niveaus an DNA-Schäden, endogen und nach Behandlung, zeigte Klon 14.3, der zudem die höchste MMC- und Radio-Sensitivität aufwies. Insgesamt führte eine Veränderung in Exon 14 zu einer erhöhten MMC- und Radio-Sensitivität. Im Gegensatz dazu waren MMC- und radio-resistente Klone in Exon 9 verändert. Die Sensitivität gegen Olaparib war Exon-unabhängig und ein Exon 14 Klon (Klon 14.2) war Olaparib-resistent. Die MMC- und radio-resistenten Klone waren zudem gegenüber Olaparib resistent. Als Ursache für die unterschiedlichen Sensitivitäten wurde in dem Anteil an CSCs in Abhängigkeit von der Anzahl intakter *BRCA1* Allele definiert. Resistente Klone mit zwei intakten *BRCA1* Allelen wiesen im Vergleich zur MCF7 einen erhöhten Anteil an CSCs auf. Ein Klon (Klon 9.2) zeigte zusätzliche zellmorphologische Veränderungen. Aufgrund transienter und dynamischer Veränderungen des EMT-Status

konnte kein definiertes Expressionsmuster der EMT-Faktoren in den Klonen festgestellt werden. Unabhängig vom Anteil an CSCs und der Anzahl intakter Allele war der Anteil endogener dsDNA im Cytosol bei den meisten BRCA1-Klonen reduziert. Nach Bestrahlung stieg dieser Anteil in den meisten Klonen an. Die Untersuchung von zwei BRCA1-Klonen auf eine strahlungsinduzierte Expression immunrelevanter Gene ergab nur geringe Veränderungen und keinen Hinweis auf eine aktivierte Immunantwort.

4.6.2 Modell

Die Reduktion der *BRCA1* Allele auf eine diploide Anzahl erhöhte den Anteil der Tumorstammzellen und damit die Resistenz in MCF7 Zellen. Aufgrund der Radio- und Chemo-Resistenz der CSCs [198, 199, 194] ist der Anteil dieser Population im Vergleich zu den Nicht-Tumorstammzellen (Non-CSCs) entscheidend für die Resistenzvermittlung. In Abb. 4.1 ist in einem Modell dargestellt, wie sich die DSB-Reparatur und die Reparatur von replikationsassoziierten DNA-Schäden nach *BRCA1* Reduktion in Non-CSCs und CSCs verändert hat.

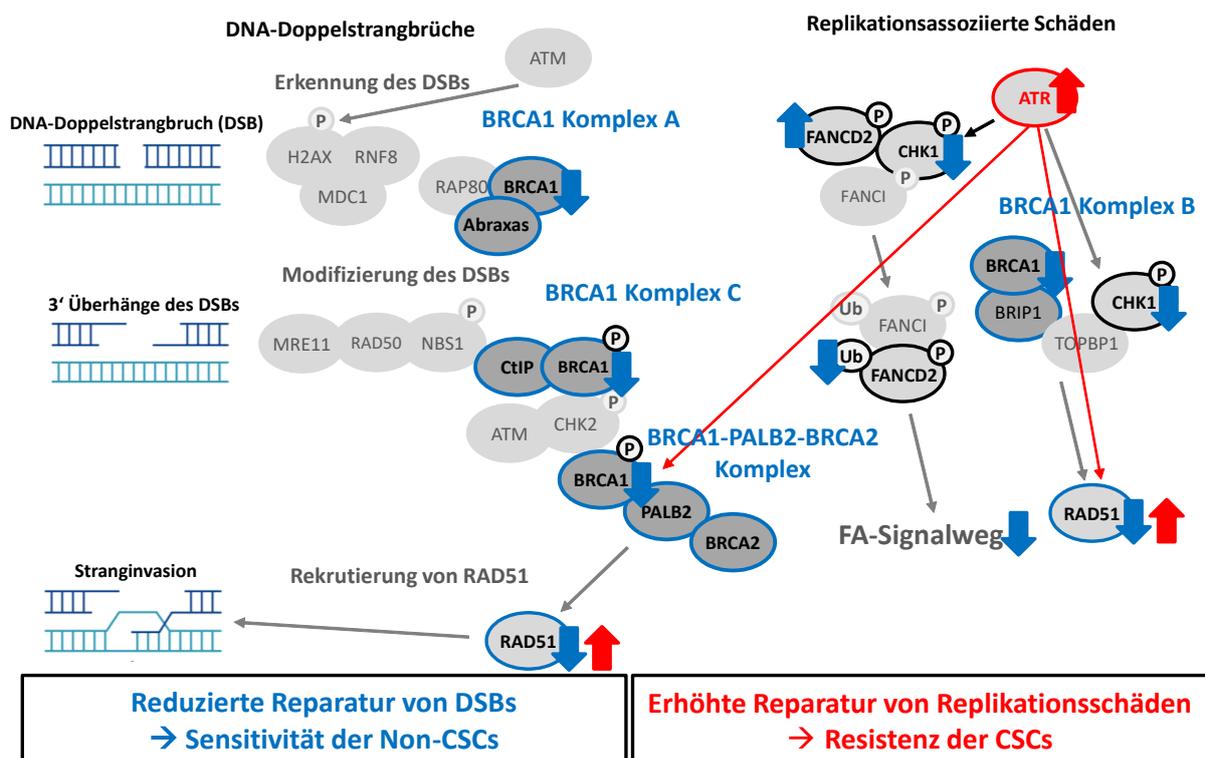


Abbildung 4.1: Modell der ATR-abhängigen Aktivierung in der S-Phase als Ausgleich für die BRCA1 Reduktion in Tumorstammzellen (CSCs) nach [55, 341]. Dargestellt sind die Homologe Rekombination mit allen involvierten BRCA1 Makrokomplexen (BRCA1 Komplex A, B, C, BRCA1-PALB2-BRCA2), sowie Teile des FA-Signalwegs. Dabei wird die Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen (DSBs) über ATM initiiert (links), während die Reparatur replikationsassoziiierter Schäden in der S-Phase über ATR eingeleitet wird (rechts). In der S-Phase steht zusätzlich der FA-Signalweg zur Verfügung. Blaue Pfeile markieren Prozesse in den Nicht-Tumorstammzellen (Non-CSCs), während rote Pfeile Resistenzmechanismen in CSCs kennzeichnen.

Die DSB-Reparatur (links dargestellt) ist bei Non-CSCs aufgrund der reduzierten BRCA1 Expression und der Beeinträchtigung aller BRCA1 Makrokomplexe (A, B, C, BRCA1-PALB2-BRCA2) reduziert und dadurch die Rekrutierung von RAD51 vermindert, was zu einer erhöhten Sensitivität führt (blaue Pfeile). Bei den Non-CSCs kommt es zu einer eingeschränkten DSB-Reparatur und zu einer beeinträchtigten Reparatur replikationsassoziierter DNA-Schäden (rechts dargestellt). Diese Beeinträchtigung ist auf den Einfluss einer reduzierten BRCA1 Expression auf den BRCA1 Komplex B zurückzuführen (blaue Pfeile). Auf der anderen Seite konnte FANCD2 trotz erhöhter Expression in den Non-CSCs nicht vermehrt über eine Monoubiquitinierung aktiviert werden. Eine Ursache für die eingeschränkte FANCD2 Aktivierung könnte die reduzierte CHK1 Expression sein (blaue Pfeile). CHK1 ist notwendig, um FANCD2 und FANCI durch Phosphorylierung zu aktivieren und eine nachfolgende Monoubiquitinierung dieses Komplexes (FANCD2-FANCI) einzuleiten [296]. Daher lag eine reduzierte Monoubiquitinierung von FANCD2 vor und der Kompensationsmechanismus über den FA-Signalweg wurde nicht initiiert (blaue Pfeile).

Dagegen haben Tumorstammzellen (CSCs) einen BRCA1-unabhängigen Mechanismus, der die BRCA1 Reduktion kompensiert, um die Reparatur zu initiieren (rechts dargestellt). Dieser Mechanismus beinhaltet eine erhöhte Aktivierung der Kinase ATR (dicke rote Pfeile), die entweder indirekt über PALB2 und BRCA2 oder direkt RAD51 zum Schaden rekrutiert (dünne rote Pfeile) [341]. Aufgrund der kompensatorischen Aktivierung von ATR in der S-Phase können CSCs besser mit replikationsassozierten Schäden umgehen, weshalb ein hoher Anteil an CSCs zu einer erhöhten Resistenz beiträgt [341]. Im Gegensatz dazu ist der reduzierte Anteil an CSCs in den sensitiven BRCA1-Klonen nicht ausreichend, um die reduzierte DSB-Reparatur und replikationsassozierte Reparatur in der S-Phase in den Non-CSCs auszugleichen.

4.7 Konklusion und Ausblick

4.7.1 Konklusion

Erstmalig konnte anhand eines isogenen Zellsystems gezeigt werden, dass eine diploide Anzahl von *BRCA1* Allelen den Anteil von Tumorstammzellen der MCF7 (Subtyp Luminal A) erhöht, einen tumorstammzellähnlichen Phänotyp erzeugt und durch eine verbesserte Reparatur in der S-Phase Resistenzen hervorruft. Die reduzierte BRCA1 Expression verringerte endogen auftretende dsDNA im Cytosol, verhinderte aber keinen strahlungsinduzierten Anstieg und führte zu keiner Aktivierung der intrazellulären Immunantwort.

4.7.2 Ausblick

In zukünftigen Experimenten wäre es notwendig, neben der Anzahl veränderter Allele, auch die induzierten Mutationen durch Sequenzierung der einzelnen *BRCA1* Allele zu identifizieren. Anhand der exakten Mutationen können dann Rückschlüsse auf veränderte Aminosäuren gezogen werden, die möglicherweise eine veränderte Proteinfaltung erzeugen oder *gain-of-function* bzw. *loss-of-function* Eigenschaften verursachen. Weiterhin könnte eine immunologische Untersuchung der Phosphorylierungsstellen von ATM und ATR in den Exon

14 veränderten Klonen weitere Informationen über die beobachteten Empfindlichkeiten geben.

Neben veränderter Proteinfaltung und Phosphorylierungsstellen des BRCA1-Proteins wäre es zudem von Bedeutung, die Interaktion von BRCA1 mit PALB2 und mit RAD51 in den BRCA1-Klonen durch immuncytochemische Analysen oder durch eine Co-Immunpräzipitation zu untersuchen. Darüber hinaus muss in zukünftigen Ansätzen, die in der vorliegenden Arbeit beeinträchtigte HR durch die Analyse replikationsassoziierter HR-Funktionen mithilfe des *DNA-Fiber Assays* erweitert werden.

Für eine weitere Charakterisierung der Tumorstammzellen wäre es sinnvoll, die Lokalisation von EMT-Faktoren oder ALDH-positiven Zellen immuncytochemisch nachzuweisen. Außerdem sollte die Expression weiterer ALDH-Isoformen, die Aktivitäten im *ALDEFLUORTM* Assay zeigen, in Western Blot-Analysen bestimmt werden.

Eine Validierung, dass die CSCs ursächlich für die beobachteten Resistenzen sind, könnte durch die Isolation der Aldefluor-positiven Zellen in der Durchflusszytometrie erfolgen. Auf diese Weise könnte die Population von ALDH-positiven getrennt von den ALDH-negativen Zellen untersucht werden. Des Weiteren könnte diese Population im Hinblick auf weitere CSC-Marker wie die Oberflächenproteine CD44 und CD24 in der Durchflusszytometrie charakterisiert und die Sensitivitäten gegen MMC, Olaparib und Bestrahlung bestimmt werden. In den ALDH-positiven Zellen könnte der Nachweis einer erhöhten ATR Expression und Aktivierung nach DNA-Schäden erfolgen und eine mögliche Sensibilisierung über ATR-Inhibition untersucht werden. Für den Nachweis, dass die phänotypischen Veränderungen und der veränderte Anteil an CSCs auf die unterschiedliche Anzahl der veränderten *BRCA1* Allele zurückzuführen sind, könnten weitere Allele verändert werden. Bei diesen Analysen könnte in den resistenten BRCA1-Klonen, die zwei intakte *BRCA1* Allele aufweisen, entweder ein weiteres Allel verändert werden oder *BRCA1* über Vektoren hochreguliert werden, um den ursprünglichen Zustand und die Sensitivität in der MCF7 wiederherzustellen. CRISPR/Cas9- oder siRNA-basierte Systeme könnten für diesen Ansatz genutzt werden.

Hinsichtlich der intrazellulären Immunantwort wurde lediglich festgestellt, dass weniger endogene dsDNA im Cytosol akkumulierte, jedoch nahezu alle BRCA1-Klone einen strahlungsinduzierten Anstieg zeigten. Untersuchungen der intrazellulären Immunantwort sollten daher nach unterschiedlicher Dosis ionisierender Strahlung, die auf den Analysen des zellulären Überlebens basieren, durchgeführt werden (2 Gy, 4 Gy und 6 Gy). Außerdem sollten Proteine der intrazellulären Immunantwort wie cGAS oder STING in Bezug auf ihre Expression im Western Blot und ihre Lokalisation über immuncytochemische Analysen untersucht werden. Dabei sollten sowohl Faktoren des „kanonischen“ über IRF3 als auch des „nicht-kanonischen, alternativen“ cGAS-STING Signalweges über NF- κ B analysiert werden.

Abkürzungsverzeichnis

Einheiten

°C	–	Grad Celsius
<i>g</i>	–	Erdbeschleunigung
μl	–	Mikroliter
μg	–	Mikrogramm
μM	–	Mikromolar (Mikromol pro Liter)
bp	–	Basenpaar
cm ²	–	Quadratcentimeter
cm	–	Zentimeter
d	–	<i>day</i> , Tag
g	–	Gramm
Gy	–	Gray
h	–	<i>hour</i> , Stunde
kDa	–	Kilo-Dalton
kV	–	Kilo-Volt
l	–	Liter
M	–	Molar (Mol pro Liter)
mA	–	Milli-Ampere
mg	–	Milligramm
min	–	Minute
ml	–	Milliliter
mM	–	Millimolar (Millimol pro Liter)
mm	–	Millimeter
ng	–	Nanogramm
nm	–	Nanometer
pmol	–	Picomol
rpm	–	<i>revolutions per minute</i> (Umdrehung pro Minute)
s	–	Sekunde
U	–	Unit (Substratumsatz pro Zeiteinheit)
V	–	Volt

Bezeichnungen

δ	–	delta
γ	–	gamma
53BP1	–	<i>p53-binding protein 1</i>
A	–	<i>adenine</i>
ADP	–	<i>adenosine diphosphate</i>
ALDH	–	<i>aldehyde dehydrogenase</i>
ALDH1A1	–	<i>aldehyde dehydrogenase 1A1</i>
AS	–	Aminosäure
ATM	–	<i>ataxia-telangiectasia mutated</i>
ATR	–	<i>ATM- and Rad3-related</i>
ATRIP	–	<i>ATR interacting protein</i>
BAAA	–	<i>BODIPY-aminoacetaldehyd</i>
BAA	–	<i>BODIPY-aminoacetat</i>
BARD1	–	<i>BRCA1 associated RING domain protein 1</i>
BCA	–	<i>bicinchoninic acid</i>
BCSC	–	<i>breast cancer stem cell</i>
BLM	–	<i>bloom</i>
BRCA1	–	<i>breast cancer gene 1</i>
BRCA2	–	<i>breast cancer gene 2</i>
BRCT	–	<i>BRCA1 C-terminus</i>
BRIP1	–	<i>BRCA1 interacting protein C-terminal helicase 1</i>
BSA	–	<i>Bovine Serum Albumin</i>
C	–	<i>cytosine</i>
C	–	<i>Carboxy-Terminus</i>
Cas9	–	<i>CRISPR-associated 9</i>
CCL5	–	<i>CC-chemokine ligand 5</i>
CDK2	–	<i>cyclin dependent kinase 2</i>
cDNA	–	<i>copy DNA</i>
CER I	–	<i>Cytoplasmic Extraction Reagent I</i>
CER II	–	<i>Cytoplasmic Extraction Reagent II</i>
cGAMP	–	<i>cyclic guanosine monophosphate-adenosine monophosphate</i>
cGAS	–	<i>cyclic GMP-AMP synthase</i>

CHK1	–	<i>checkpoint kinase 1</i>
CHK2	–	<i>checkpoint kinase 2</i>
CMG	–	<i>Cdc45-Mcm-GINS</i>
CO ₂	–	Kohlenstoffdioxid
COX IV	–	<i>cytochrome c oxidase 4</i>
CP	–	<i>crossing point</i>
CRISPR	–	<i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats</i>
CSC	–	<i>cancer stem cell</i>
Ct	–	<i>threshold cycle</i>
CtIP	–	<i>CtBP interacting protein</i>
CTLA-4	–	<i>cytotoxic T lymphocyte antigen-4</i>
Cu ⁺	–	Kupfer-Ionen
CXCR4	–	<i>C-X-C motif chemokine receptor type 4</i>
CXCL10	–	<i>C-X-C motif chemokine ligand 10</i>
DAPI	–	<i>Diamidinophenylindole</i>
dATP	–	<i>deoxyadenosine triphosphate</i>
dCTP	–	<i>deoxycytosine triphosphate</i>
ddH ₂ O	–	Destilliertes Wasser
DDR	–	<i>DNA damage response</i>
DEAB	–	<i>N,N-diethylaminobenzaldehyd</i>
Del	–	Deletionen
dGTP	–	<i>deoxyguanosine triphosphate</i>
DMEM	–	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	–	Dimethylsulfoxid
DNA	–	<i>deoxyribonucleic acid</i>
DSB	–	<i>DNA double-strand break</i>
dsDNA	–	<i>double-stranded DNA</i>
DTT	–	Dithiothreitol
dTTP	–	<i>deoxythymidine triphosphate</i>
D-Loop	–	<i>displacement loop</i>
EDTA	–	Ethylendiamintetraessigsäure
EdU	–	<i>5-ethynyl-2'-deoxyuridine</i>
EMT	–	<i>epithelial-to-mesenchymal transition</i>

EpCAM	–	<i>epithelial cell adhesion molecule</i>
ER	–	<i>estrogen receptor</i>
Ex	–	Exon
FA	–	<i>fanconi anaemia</i>
FACS	–	<i>fluorescence-activated cell sorting</i>
FANCD2	–	<i>fanconi anaemia group D2 protein</i>
FANCDT	–	<i>fanconi anaemia group T protein</i>
FANCI	–	<i>fanconi anaemia group I protein</i>
FANCL	–	<i>fanconi anaemia group L protein</i>
FANCS	–	<i>fanconi anaemia group S protein</i>
FITC	–	Fluorescein Isothiocyanat
FKS	–	Fötales Kälberserum
FSC	–	<i>Forward-Scatter</i>
G	–	<i>guanine</i>
G1-Phase	–	<i>gap1 phase</i>
G2-Phase	–	<i>gap2 phase</i>
GAPDH	–	<i>glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase</i>
gDNA	–	genomische DNA
GFP	–	<i>green fluorescent protein</i>
H2AX	–	<i>H2A histone family member X</i>
H ₂ O	–	Wasser
HCl	–	Wasserstoffchlorid, Salzsäure
HER2	–	<i>human epidermal growth factor receptor 2</i>
HR	–	Homologe Rekombination, <i>homologous recombination</i>
HRD	–	<i>homologous recombination deficiency</i>
HSC70	–	<i>heat shock 70</i>
hSSB1	–	<i>single-strand DNA binding protein 1</i>
ICLs	–	<i>interstrand cross links</i>
IFN- α	–	<i>interferone α</i>
IFN- β	–	<i>interferone β</i>
IRF3	–	<i>interferon regulatory transcription factor 3</i>
IL-6	–	Interleukin 6
Ins	–	Insertionen

JAK	–	<i>januskinase</i>
KAc	–	Kaliumacetat
KCl	–	Kaliumchlorid
KH ₂ PO ₄	–	Kaliumdihydrogenphosphat
Lum A	–	Luminal A
M	–	Marker
MCF10A	–	<i>Michigan Cancer Foundation-10A</i>
MCF7	–	<i>Michigan Cancer Foundation 7</i>
MDC1	–	<i>mediator of DNA damage checkpoint protein 1</i>
<i>Merge</i>	–	überlagerte mikroskopische Aufnahmen
MFI	–	<i>mean fluorescence intensity</i>
MgCl ₂	–	Magnesiumchlorid
MMC	–	<i>mitomycin C</i>
M-Phase	–	Mitose-Phase
MRE11	–	<i>meiotic recombination 11</i>
mRNA	–	<i>messenger RNA</i>
N	–	Amino-Terminus
NaCl	–	Natriumchlorid
NaOH	–	Natriumhydroxid
Na ₂ HPO ₄	–	Dinatriumhydrogenphosphat
NBS1	–	<i>Nijmegen breakage syndrom 1</i>
NER	–	<i>Nuclear Extraction Reagent</i>
NF-κB	–	<i>nuclear factor kappa</i>
NHEJ	–	<i>Non-Homologous Endjoining</i>
NLS	–	<i>nuclear localisation signal</i>
ns	–	nicht signifikant
OH	–	Hydroxid
PALB2	–	<i>partner and localizer of BRCA2</i>
PARP	–	<i>poly ADP-ribose polymerase</i>
PARP1	–	<i>poly ADP-ribose polymerase 1</i>
PBS	–	<i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	–	<i>polymerase chain reaction</i>
PD-1	–	<i>programmed cell death protein 1</i>

PD-L1	–	<i>programmed cell death protein ligand 1</i>
PE	–	<i>plating efficiency</i>
PE	–	Phycoeryhtrin
PE-A	–	<i>PE-Area</i>
PE-W	–	<i>PE-Width</i>
PFA	–	<i>Paraformaldehyd</i>
pH	–	<i>potentia hydrogenii</i>
PI	–	Propidiumiodid
PI3K	–	Phosphoinositid-3-Kinasen
PMSF	–	Phenylmethylsulfonylfluorid
PRA	–	Plasmid-Rekonstruktionsassay
qPCR	–	quantitative Echtzeit PCR
RAD50	–	<i>radiation 50</i>
RAD51	–	<i>radiation 51</i>
RAP80	–	<i>receptor-associated protein 80</i>
Rb	–	<i>retinoblastoma protein</i>
RFP	–	<i>red fluorescent protein</i>
RING	–	<i>really interesting new gene</i>
ROS	–	<i>reactive oxygen species</i>
RNA	–	<i>ribonucleic acid</i>
RNase A	–	Ribonuklease A
RNF8	–	<i>RING finger protein 8</i>
RPA	–	<i>replication protein A</i>
RPMI	–	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RT	–	Raumtemperatur
RT	–	Radiotherapie
RT	–	Reverse Transkription
SCD	–	<i>serine containing domain</i>
SDS	–	<i>sodium dodecyl sulfat</i>
SDS-PAGE	–	<i>sodium dodecyl sulfat-polyacrylamide gel electrophoresis</i>
sgRNA	–	<i>single-guide RNA</i>
shRNA	–	<i>small hairpin RNA</i>
siRNA	–	<i>small interfering RNA</i>

S-Phase	–	Synthese-Phase
SSA	–	<i>Single-Strand Annealing</i>
SSB	–	<i>single-strand break</i>
SSC	–	<i>Sideward-Scatter</i>
ssDNA	–	<i>single stranded DNA</i>
STAT	–	<i>signal transducers and activators of transcription</i>
STING	–	<i>stimulator of interferon genes</i>
T	–	<i>thymine</i>
Taq	–	<i>Thermus aquaticus</i>
TBK1	–	<i>TANK-binding kinase 1</i>
TG	–	<i>Tris-Glycerin</i>
Tris	–	<i>Tris(hydroxymethyl)aminomethan</i>
TLR-9	–	<i>toll-like receptor 9</i>
T _m	–	<i>melting temperature</i>
TNBC	–	<i>triple negative breast cancer</i>
TOPBP1	–	<i>DNA topoisomerase II binding protein 1</i>
TP53	–	<i>tumor protein 53</i>
TREX1	–	<i>three prime repair exonuclease 1</i>
USP1	–	<i>ubiquitin specific peptidase 1</i>
XRCC1	–	<i>x-ray cross complementing 1</i>
γH2AX	–	<i>phosphorylated (γ) H2A histone family member</i>
ZEB1	–	<i>Zinc finger E-box homeobox 1</i>

Abbildungsverzeichnis

<i>Abbildung 1.1:</i>	<i>Subtypen des Mammakarzinoms mit deren Häufigkeit und Aggressivität .</i>	<i>1</i>
<i>Abbildung 1.2:</i>	<i>Kaplan-Meier-Überlebenskurven der Patientinnen mit verschiedenen Subtypen des Mammakarzinoms</i>	<i>2</i>
<i>Abbildung 1.3:</i>	<i>Kaplan-Meier-Überlebenskurven von Patientinnen mit einem Rezidiv (verändert von Luminal A zu TNBC) im Vergleich zu Patientinnen mit unverändertem Luminal A-Rezidiv</i>	<i>3</i>
<i>Abbildung 1.4:</i>	<i>Schritte der Homologen Rekombination und involvierte BRCA1 Makrokomplexe und Überlappungen mit dem FA-Signalweg</i>	<i>6</i>
<i>Abbildung 1.5:</i>	<i>Beispielhafte Domänen des BRCA1-Proteins</i>	<i>10</i>
<i>Abbildung 1.6:</i>	<i>Mutationsraten der verschiedenen Exons des BRCA1 Gens und betroffene Proteindomänen</i>	<i>11</i>
<i>Abbildung 1.7:</i>	<i>Hierarchisches Modell der CSC-Hypothese</i>	<i>16</i>
<i>Abbildung 3.1:</i>	<i>Schematische Darstellung der gezielten Veränderung des BRCA1 Gens mit CRISPR/Cas9 in MCF7 Zellen</i>	<i>64</i>
<i>Abbildung 3.2:</i>	<i>Herstellung von fünf in Exon 9 und drei in Exon 14 veränderten BRCA1-Klonen..</i>	<i>65</i>
<i>Abbildung 3.3:</i>	<i>Veränderte BRCA1 Allele des Klons 14.2. Dargestellt ist das Elektropherogramm des BRCA1-Klons 14.2.</i>	<i>66</i>
<i>Abbildung 3.4:</i>	<i>Vergleich der Expression von DNA-Reparaturproteinen in den acht BRCA1-Klonen..</i>	<i>68</i>
<i>Abbildung 3.5:</i>	<i>Korrelation der relativen CHK1 Expression mit der relativen BRCA1 Expression</i>	<i>69</i>
<i>Abbildung 3.6:</i>	<i>Erhöhte FANCD2 Expression mit geringerer Monoubiquitinierung in BRCA1-Klonen</i>	<i>70</i>
<i>Abbildung 3.7:</i>	<i>Veränderte endogene DNA-Schäden in BRCA1-Klonen</i>	<i>71</i>
<i>Abbildung 3.8:</i>	<i>Proliferationsrate und veränderte Zellzyklusverteilung in BRCA1-Klonen</i>	<i>73</i>
<i>Abbildung 3.9:</i>	<i>Reduzierte HR-Kapazität in BRCA1-Klonen</i>	<i>75</i>
<i>Abbildung 3.10:</i>	<i>Verminderte RAD51 Foci-Bildung in BRCA1-Klonen</i>	<i>77</i>
<i>Abbildung 3.11:</i>	<i>Veränderte Level an DNA-Schäden nach MMC in BRCA1-Klonen</i>	<i>78</i>
<i>Abbildung 3.12:</i>	<i>Signifikante Unterschiede im Überleben nach MMC in BRCA1-Klonen</i>	<i>80</i>

<i>Abbildung 3.13: Abhängigkeit der MMC-Sensitivität von der Anzahl intakter BRCA1 Allele in MCF7.</i>	<i>81</i>
<i>Abbildung 3.14: Signifikante Unterschiede im Überleben nach PARP1-Inhibition in BRCA1-Klonen</i>	<i>82</i>
<i>Abbildung 3.15: Abhängigkeit der Olaparib-Sensitivität von der Anzahl intakter BRCA1 Allele in MCF7</i>	<i>83</i>
<i>Abbildung 3.16: Signifikante Unterschiede im Überleben nach Bestrahlung in BRCA1-Klonen</i>	<i>84</i>
<i>Abbildung 3.17: Abhängigkeit des zellulären Überlebens nach 4 Gy von der relativen HR-Kapazität und Anzahl intakter BRCA1 Allele</i>	<i>85</i>
<i>Abbildung 3.18: Zellmorphologische Veränderungen von Klon 9.2</i>	<i>86</i>
<i>Abbildung 3.19: Veränderte Expression von EMT- und Tumorstammzellmarkern in BRCA1-Klonen</i>	<i>87</i>
<i>Abbildung 3.20: BRCA1 Reduktion beeinflusst Stammzellartigkeit in MCF7.</i>	<i>88</i>
<i>Abbildung 3.21: Abhängigkeit des CSC-Anteils (Aldefluor-positive Zellen (%)) von der Zahl intakter BRCA1 Allele in MCF7</i>	<i>89</i>
<i>Abbildung 3.22: Minimaler strahlungsinduzierter Anstieg der cytosolischen dsDNA in Klon 9.2 und Klon 9.5.</i>	<i>91</i>
<i>Abbildung 3.23: Geringfügig strahlungsinduzierte Veränderung der Expression von Genen der intrazellulären Immunantwort in Klon 9.2 und Klon 9.5</i>	<i>92</i>
<i>Abbildung 3.24: Strahlungsinduzierter Anstieg cytosolischer dsDNA in BRCA1-Klonen</i>	<i>93</i>
<i>Abbildung 3.25: Keine Korrelation der endogenen cytosolischen dsDNA bzw. cytosolischen dsDNA nach 8 Gy mit den Aldefluor-positiven Zellen (CSCs) in den BRCA1-Klonen und der MCF7</i>	<i>94</i>
<i>Abbildung 3.26: Keine Korrelation der cytosolischen dsDNA endogen bzw. nach 8 Gy mit der Radiosensitivität (zelluläres Überleben nach 0 Gy bzw. 8 Gy) in den BRCA1-Klonen und der MCF7</i>	<i>95</i>
<i>Abbildung 4.1: Modell der ATR-abhängigen Aktivierung in der S-Phase als Ausgleich für die BRCA1 Reduktion in Tumorstammzellen (CSCs)</i>	<i>127</i>

Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 2.1: Übersicht über die verwendeten Tumorzelllinien</i>	<i>20</i>
<i>Tabelle 2.2: Übersicht über die CRISPR/Cas9-modifizierten Zelllinien</i>	<i>20</i>
<i>Tabelle 2.3: Verwendete Plasmide</i>	<i>21</i>
<i>Tabelle 2.4: Verwendete single guide RNAs</i>	<i>21</i>
<i>Tabelle 2.5: Verwendete Primer</i>	<i>21</i>
<i>Tabelle 2.6: Verwendete Primer</i>	<i>22</i>
<i>Tabelle 2.7: Verwendete Erstantikörper für die Detektion im Western Blot</i>	<i>22</i>
<i>Tabelle 2.8: Verwendete Zweitantikörper für die Detektion im Western Blot</i>	<i>23</i>
<i>Tabelle 2.9: Verwendete Erstantikörper für die Immunfluoreszenz (RAD51, γH2AX) . . .</i>	<i>23</i>
<i>Tabelle 2.10: Verwendete Zweitantikörper für die Immunfluoreszenz (RAD51, γH2AX) . .</i>	<i>23</i>
<i>Tabelle 2.11: Verwendete Erstantikörper für die Immunfluoreszenz (cytosolische dsDNA, COX IV)</i>	<i>23</i>
<i>Tabelle 2.12: Verwendete Zweitantikörper für die Immunfluoreszenz (cytosolische dsDNA, COX IV)</i>	<i>24</i>
<i>Tabelle 2.13: Chemikalien (verwendet am UKE in Hamburg)</i>	<i>24</i>
<i>Tabelle 2.14: Chemikalien (verwendet am FLI in Jena)</i>	<i>26</i>
<i>Tabelle 2.15: Fertige Lösungen (verwendet am FLI in Jena)</i>	<i>26</i>
<i>Tabelle 2.16: Medien für die Kultivierung von Bakterien (verwendet am FLI in Jena) . . .</i>	<i>26</i>
<i>Tabelle 2.17: Selektionsantibiotika für die Kultivierung von Bakterien (verwendet am FLI in Jena)</i>	<i>26</i>
<i>Tabelle 2.18: Medien und Lösungen für die Zellkultivierung (verwendet am FLI in Jena) .</i>	<i>27</i>
<i>Tabelle 2.19: Zusammensetzung der Medien für die Zellkultivierung (verwendet am UKE in Hamburg)</i>	<i>27</i>
<i>Tabelle 2.20: Puffer und Lösungen für die Agarose-Gelelektrophorese</i>	<i>27</i>
<i>Tabelle 2.21: Puffer für Western Blot und Proteinextraktion</i>	<i>28</i>
<i>Tabelle 2.22: Lösungen für die Zellzyklus-Analyse (DNA-Gehalt)</i>	<i>28</i>
<i>Tabelle 2.23: Puffer und Lösungen für die Immunfluoreszenz (RAD51, γH2AX)</i>	<i>28</i>
<i>Tabelle 2.24: Puffer und Lösungen für die Immunfluoreszenz (cytosolische dsDNA, COX VI)</i>	<i>29</i>
<i>Tabelle 2.25: Puffer und Lösungen für den Mikrokern-Nachweis</i>	<i>29</i>
<i>Tabelle 2.26: Puffer und Lösungen für den Kolonietest</i>	<i>30</i>
<i>Tabelle 2.27: Verwendete Enzyme (verwendet am UKE in Hamburg)</i>	<i>30</i>

<i>Tabelle 2.28: Verwendete Enzyme (verwendet am FLI in Jena)</i>	30
<i>Tabelle 2.29: Verwendete Bakterienstämme (verwendet am FLI in Jena)</i>	30
<i>Tabelle 2.30: Inhalt vom GeneJET Plasmid Mini Prep Kit</i>	30
<i>Tabelle 2.31: Inhalt vom Plasmid Miniprep Kit I, peqGOLD</i>	30
<i>Tabelle 2.32: Inhalt vom GeneJET Plasmid Maxiprep Kit</i>	31
<i>Tabelle 2.33: Inhalt vom QIAGEN Plasmid Plus Maxi Kit (25)</i>	31
<i>Tabelle 2.34: Inhalt vom Applied Biosystems™ Big Dye™ Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit</i>	32
<i>Tabelle 2.35: Inhalt vom DNeasy Blood & Tissue Kit (50)</i>	32
<i>Tabelle 2.36: Inhalt vom High-Performance GoTaq® G2 DNA Polymerase with Mg-Free Buffer System</i>	32
<i>Tabelle 2.37: Inhalt vom dNTP Mix, PCR Grade</i>	32
<i>Tabelle 2.38: Inhalt vom Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System</i>	32
<i>Tabelle 2.39: Inhalt vom Click-iT®EdU imaging Kit</i>	33
<i>Tabelle 2.40: Inhalt vom ALDEFUOR™-Kit</i>	33
<i>Tabelle 2.41: Inhalt vom NE-PER™ Extraction Kit</i>	33
<i>Tabelle 2.42: Inhalt vom Quant-iT™ PicoGreen™ dsDNA Assay-Kit</i>	33
<i>Tabelle 2.43: Inhalt vom RNeasy Mini Kit (250)</i>	33
<i>Tabelle 2.44: Inhalt vom Quanti®Tect Reverse Transcription Kit (200)</i>	34
<i>Tabelle 2.45: Inhalt vom AccuPower®2xGreenStar™qPCR Master Mix</i>	34
<i>Tabelle 2.46: Verbrauchsmaterialien (verwendet am FLI in Jena)</i>	34
<i>Tabelle 2.47: Verbrauchsmaterialien (verwendet am UKE in Hamburg)</i>	35
<i>Tabelle 2.48: Geräte (verwendet am FLI in Jena)</i>	36
<i>Tabelle 2.49: Geräte (verwendet am UKE in Hamburg)</i>	36
<i>Tabelle 2.50: Eingesetzte Software (verwendet am FLI in Jena)</i>	38
<i>Tabelle 2.51: Eingesetzte Software (verwendet am UKE in Hamburg)</i>	38
<i>Tabelle 2.52: Zusammensetzung eines einfachen Ligationsansatzes</i>	39
<i>Tabelle 2.53: Ansatz für Sequenzierung</i>	41
<i>Tabelle 2.54: PCR-Programm für Sequenzierung</i>	41
<i>Tabelle 2.55: Zusammensetzung des Mastermix für die PCR</i>	45
<i>Tabelle 2.56: PCR-Programm für Exon 9 short und long; Exon 14 short und long</i>	45
<i>Tabelle 2.57: Verwendete Volumina für die jeweiligen Zell-Volumina</i>	58

Tabelle 2.58: Standardkurve für den Quant-iT™ PicoGreen™ dsDNA Assay 58

Tabelle 2.59: Komponenten der Reaktion zur Eliminierung der genomischen DNA (Angaben von Qiagen). 60

Tabelle 2.60: Komponenten der Reaktion für die Reverse Transkription. 60

Tabelle 2.61: Zusammensetzung des Master Mix für die Quantitative Echtzeit PCR 61

Tabelle 2.62: Programm für die Quantitative Echtzeit PCR im CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System 61

Tabelle 3.1: Veränderte BRCA1 Allele in MCF7 Zellen 67

Literaturverzeichnis

1. International Agency for Research on Cancer, World Health Organization, 2018, <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/276-germany-fact-sheets.pdf> (Stand 12.09.2018)
2. **Hanahan D, Weinberg RA** (2000) The hallmarks of cancer. *Cell*, **100** (1): 57-70, doi: 10.1016/S0092-8674(00)81683-9
3. **Hanahan D, Weinberg RA** (2011) Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, **144** (5): 646-674, doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013
4. **Perou CM, Sørlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, Pollack JR, Ross DT, Johnsen H, Akslen LA, Fluge O, Pergamenschikov A, Williams C, Zhu SX, Lønning PE, Børresen-Dale AL, Brown PO, Botstein D** (2000) Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*, **406** (6797): 747-752, doi: 10.1038/35021093
5. https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/Brustkrebs/brustkrebs_node.html (aufgerufen am 11.08.20, 14:17 Uhr)
6. **Sørlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, Hastie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Thorsen T, Quist H, Matese JC, Brown PO, Botstein D, Lønning PE, Børresen-Dale AL** (2001) Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, **98** (19): 10869-10874, doi: 10.1073/pnas.191367098
7. **Sørlie T, Tibshirani R, Parker J, Hastie T, Marron JS, Nobel A, Deng S, Johnsen H, Pesich R, Geisler S, Demeter J, Perou CM, Lønning PE, Brown PO, Børresen-Dale AL, Botstein D** (2003) Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, **100** (14): 8418-8423, doi: 10.1073/pnas.0932692100
8. **Harvey JM, Clark GM, Osborne CK, Allred DCJ** (1999) Estrogen receptor status by immunohistochemistry is superior to the ligand-binding assay for predicting response to adjuvant endocrine therapy in breast cancer. *Journal of Clinical Oncology*, **17** (5): 1474-1481, doi: 10.1200/JCO.1999.17.5.1474
9. **Li Y, Yang D, Yin X, Zhang X, Huang J, Wu Y, Wang M, Yi Z, Li H, Li H, Ren G** (2020) Clinicopathological Characteristics and Breast Cancer-Specific Survival of Patients With Single Hormone Receptor-Positive Breast Cancer. *JAMA Network Open*, **3** (1): e1918160, doi: 10.1001/jamanetworkopen.2019.18160
10. **Cheang MCU, Chia SK, Voduc D, Gao D, Leung S, Snider J, Watson M, Davies S, Bernard PS, Parker JS, Perou CM, Ellis MJ, Nielsen TO** (2009) Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, **101** (10): 736-750, doi: 10.1093/jnci/djp082
11. **Abubakar M, Figueroa J, Ali HR, Blows F, Lissowska J, Caldas C, Easton DF, Sherman ME, Garcia-Closas M, Dowsett M, Pharoah PD** (2019) Combined quantitative measures of ER, PR, HER2, and Ki67 provide more prognostic information than categorical combinations in luminal breast cancer. *Modern Pathology*, **32** (9): 1244-1256, doi: 10.1038/s41379-019-0270-4
12. **Park S, Koo JS, Kim MS, Park HS, Lee JS, Lee JS, Kim SI, Park B-W** (2012) Characteristics and outcomes according to molecular subtypes of breast cancer as classified by a panel of four biomarkers using immunohistochemistry. *The Breast*, **21** (1): 50-57, doi: 10.1016/j.breast.2011.07.008
13. **Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL** (1987) Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science*, **235** (4785): 177-182, doi: 10.1126/science.3798106
14. **Bauer KR, Brown M, Cress RD, Parise CA, Caggiano V** (2007) Descriptive analysis of estrogen receptor (ER)-negative, progesterone receptor (PR)-negative, and HER2-negative invasive breast cancer, the so-called triple-negative phenotype: a population-based study from the California cancer Registry. *Cancer*, **109** (9): 1721-1728, doi: 10.1002/cncr.22618

15. **Millikan** RC, Newman B, Tse C-K, Moorman PG, Conway K, Dressler LG, Smith LV, Labbok MH, Geradts J, Bensen JT, Jackson S, Nyante S, Livasy C, Carey L, Earp HS, Perou CM (2008) Epidemiology of basal-like breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, **109** (1): 123-139, doi: 10.1007/s10549-007-9632-6
16. **Ryu** DW, Jung MJ, Choi WS, Lee CH (2011) Clinical significance of morphologic characteristics in triple negative breast cancer. *Journal of the Korean Surgical Society*, **80** (5): 301-306, doi: 10.4174/jkss.2011.80.5.301
17. **Dai** X, Cheng H, Bai Z, Li J (2017) Breast Cancer Cell Line Classification and Its Relevance with Breast Tumor Subtyping. *Journal of Cancer*, **8** (16): 3131-3141, doi: 10.7150/jca.18457
18. **Peto** R, Davies C, Godwin J, Gray R, Pan HC, Clarke M, Cutter D, Darby S, McGale P, Wang YC, Bergh J, Di Leo A, Albain K, Swain S, Piccart M, Pritchard K (Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group) (2012) Comparisons between different polychemotherapy regimens for early breast cancer: meta-analyses of long-term outcome among 100,000 women in 123 randomised trials. *Lancet*, **379** (9814): 432-444, doi: 10.1016/S0140-6736(11)61625-5
19. **Blumenthal** GM, Scher NS, Cortazar P, Chattopadhyay S, Tang S, Song P, Liu Q, Ringgold K, Pilaro AM, Tilley A, King KE, Graham L, Rellahan BL, Weinberg WC, Chi B, Thomas C, Hughes P, Ibrahim A, Justice R, Pazdur R (2013) First FDA approval of dual anti-HER2 regimen: pertuzumab in combination with trastuzumab and docetaxel for HER2-positive metastatic breast cancer. *Clinical Cancer Research*, **19** (18): 4911-4916, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-13-1212
20. **Wang** Y, Yin Q, Yu Q, Zhang J, Liu Z, Wang S, Lv S, Niu Y (2011) A retrospective study of breast cancer subtypes: the risk of relapse and the relations with treatments. *Breast Cancer Research and Treatment*, **130** (2): 489-498, doi: 10.1007/s10549-011-1709-6
21. **Kyndi** M, Sørensen FB, Knudsen H, Overgaard M, Nielsen HM, Overgaard J, Danish Breast Cancer Cooperative Group (2008) Estrogen receptor, progesterone receptor, HER-2, and response to postmastectomy radiotherapy in high-risk breast cancer: the Danish Breast Cancer Cooperative Group. *Journal of Clinical Oncology*, **26** (9): 1419-1426, doi: 10.1200/JCO.2007.14.5565
22. **McAnena** PF, McGuire A, Ramli A, Curran C, Malone C, McLaughlin R, Barry K, Brown JAL, Kerin MJ (2018) Breast cancer subtype discordance: impact on post-recurrence survival and potential treatment options. *BMC Cancer*, **18** (203): 1-8, doi: 10.1186/s12885-018-4101-7
23. **Tung** N, Lin NU, Kidd J, Allen BA, Singh N, Wenstrup RJ, Hartman AR, Winer EP, Garber JE (2016) Frequency of Germline Mutations in 25 Cancer Susceptibility Genes in a Sequential Series of Patients With Breast Cancer. *Journal of Clinical Oncology*, **34** (13): 1460-1468, doi: 10.1200/JCO.2015.65.0747
24. **Peto** J, Collins N, Barfoot R, Seal S, Warren W, Rahman N, Easton DF, Evans C, Deacon J, Stratton MR (1999) Prevalence of BRCA1 and BRCA2 Gene Mutations in Patients With Early-Onset Breast Cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, **91** (11): 943-949, doi: 10.1093/jnci/91.11.943
25. **Newman** LA, Reis-Filho JS, Morrow M, Carey LA, King TA (2015) The 2014 Society of Surgical Oncology Susan G. Komen for the Cure Symposium: Triple-Negative Breast Cancer. *Annals of Surgical Oncology*, **22** (3): 874-882, doi: 10.1245/s10434-014-4279-0
26. **Armstrong** N, Ryder S, Forbes C, Ross J, Quek RG (2019) A systematic review of the international prevalence of BRCA mutation in breast cancer. *Clinical Epidemiology*, **11**: 543-561, doi: 10.2147/CLEP.S206949
27. **Telli** M (2014) Optimizing chemotherapy in triple-negative breast cancer: the role of platinum. *American Society of Clinical Oncology*: e37-42, doi: 10.14694/EdBook_AM.2014.34.e37
28. **Mavaddat** N, Barrowdale D, Andrulis IL, Domchek SM, Eccles D, Nevanlinna H, Ramus SJ, Spurdle A, Robson M, Sherman M et al. (2012) Pathology of breast and ovarian cancers among BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: Results from the Consortium of Investigators of Modifiers of BRCA1/2 (CIMBA). *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, **21** (1): 134-147, doi: 10.1158/1055-9965.EPI-11-0775
29. **Sharma** P, Klemp JR, Kimler BF, et al. (2014) Germline BRCA mutation evaluation in a prospective triple-negative breast cancer registry: implications for hereditary breast and/or ovarian cancer

- syndrome testing. *Breast Cancer Research and Treatment*, **145** (3): 707-714, doi: 10.1007/s10549-014-2980-0
30. **Couch** FJ, Hart SN, Sharma P, et al. (2015) Inherited mutations in 17 breast cancer susceptibility genes among a large triple-negative breast cancer cohort unselected for family history of breast cancer. *Journal of Clinical Oncology*, **33** (4): 304-311, doi: 10.1200/JCO.2014.57.1414
 31. **Sønderstrup** IMH, Jensen M-B R, Ejlersen B, Eriksen JO, Gerdes A-M, TA Kruse, Larsen MJ, Thomassen M, Laenkholm A-V (2019) Subtypes in *BRCA*-mutated breast cancer. *Human Pathology*, **84**: 192-201, doi: 10.1016/j.humpath.2018.10.005
 32. **Telli** ML, et al. (2016) Homologous Recombination Deficiency (HRD) Score Predicts Response to Platinum-Containing Neoadjuvant Chemotherapy in Patients with Triple-Negative Breast Cancer. *Clinical Cancer Research*, **22** (15): 3764-3773, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-15-2477
 33. **Turner** NC (2017) Signatures of DNA-repair deficiencies in breast cancer. *The New England Journal of Medicine*, **377** (25): 2490-2492, doi: 10.1056/NEJMcibr1710161
 34. **Lips** EH, Mulder L, Oonk A, van der Kolk LE, Hogervorst FBL, Imholz ALT, Wesseling J, Rodenhuis S, Nederlof PM (2013) Triple-negative breast cancer: BRCAness and concordance of clinical features with *BRCA1*-mutation carriers. *British Journal of Cancer*, **108** (10): 2172-2177, doi: 10.1038/bjc.2013.144
 35. **Telli** ML, et al. (2018) Homologous recombination deficiency (HRD) status predicts response to standard neoadjuvant chemotherapy in patients with triple-negative or *BRCA1/2* mutation-associated breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, **168** (3): 625-630, doi: 10.1007/s10549-017-4624-7
 36. **Popova** T, Manié E, Rieunier G, Caux-Moncoutier V, Tirapo C, Dubois T, Delattre O, Sigal-Zafrani B, Bollet M, Longy M, Houdayer C, Sastre-Garau X, Vincent-Salomon A, Stoppa-Lyonnet D, Stern MH (2012) Ploidy and large-scale genomic instability consistently identify basal-like breast carcinomas with *BRCA1/2* inactivation. *Cancer Research*, **72** (21): 5454-5462, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-12-1470
 37. **Birnbak** NJ, Wang ZC, Kim JY, Eklund AC, Li Q, Tian R, Bowman-Colin C, Li Y, Greene-Colozzi A, Iglehart JD, Tung N, Ryan PD, Garber JE, Silver DP, Szallasi Z, Richardson AL (2012) Telomeric allelic imbalance indicates defective DNA repair and sensitivity to DNA-damaging agents. *Cancer Discovery*, **2** (4): 366-375, doi: 10.1158/2159-8290.CD-11-0206
 38. **Timms** KM, Abkevich V, Hughes E, Neff C, Reid J, Morris B, Kalva S, Potter J, Tran TV, Chen J, Iliev D, Sangale Z, Tikishvili E, Perry M, Zharkikh A, Gutin A, Lanchbury JS (2014) Association of *BRCA1/2* defects with genomic scores predictive of DNA damage repair deficiency among breast cancer subtypes. *Breast Cancer Research*, **16** (6): 475, doi: 10.1186/s13058-014-0475-x
 39. **Saleh-Gohari** N, Bryant HE, Schultz N, Parker KM, Cassel TN, Helleday T (2005) Spontaneous homologous recombination is induced by collapsed replication forks that are caused by endogenous DNA single-strand breaks. *Molecular and Cellular Biology*, **25** (16): 7158-7169, doi: 10.1128/MCB.25.16.7158-7169.2005
 40. **Wong** JL, **Fuchs** DS (1971) Reactivities and electronic aspects of nucleic acid heterocycles. II. Diazomethane methylation of uracil and its methyl derivatives. *The Journal of Organic Chemistry*, **36** (6): 848-850, doi: 10.1021/jo00805a028
 41. **Pouget** JP, Frelon S, Ravanat J-L, Testard I, Odin F, Cadet J (2002) Formation of modified DNA bases in cells exposed either to gamma radiation or to high-LET particles. *Radiation Research*, **157** (5): 589-595, doi: 10.1667/0033-7587(2002)157[0589:fomdbi]2.0.co;2
 42. **Dudouet** B, Burnett R, Dickinson LA, Wood MR, Melander C, Belitsky JM, Edelson B, Wurtz N, Briehn C, Dervan PB, Gottesfeld JM (2003) Accessibility of nuclear chromatin by DNA binding polyamides. *Chemistry and Biology*, **10** (9): 859-867, doi: 10.1016/j.chembiol.2003.09.001
 43. **Nambiar** M, **Raghavan** SC (2011) How does DNA break during chromosomal translocations? *Nucleic Acids Research*, **39** (14): 5813-5825, doi: 10.1093/nar/gkr223
 44. **Zhu** C, Mills KD, Ferguson DO, Lee C, Manis J, Fleming J, Gao Y, Morton CC, Alt FW (2002) Unrepaired DNA breaks in *p53*-deficient cells lead to oncogenic gene amplification subsequent to translocations. *Cell*, **109** (7): 811-821, doi: 10.1016/s0092-8674(02)00770-5

45. **Blackford AN, Jackson SP** (2017) ATM, ATR, and DNA-PK: the trinity at the heart of the DNA damage response. *Molecular Cell*, **66** (6): 801-817, doi: 10.1016/j.molcel.2017.05.015
46. **Xu Y, Baltimore D** (1996) Dual roles of ATM in the cellular response to radiation and in cell growth control. *Genes & Development*, **10** (19): 2401-2410, doi: 10.1101/gad.10.19.2401
47. **Wright JA, Keegan KS, Herendeen DR, Bentley NJ, Carr AM, Hoekstra MF, Concannon P** (1998) Protein kinase mutants of human ATR increase sensitivity to UV and ionizing radiation and abrogate cell cycle checkpoint control. *Cell Biology*, **95** (13): 7445-7450, doi: 10.1073/pnas.95.13.7445
48. **Bakkenist CJ, Kastan MB** (2003) DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature*, **421** (6922): 499-506, doi: 10.1038/nature01368
49. **Cortez D, Guntuku S, Qin J, Elledge SJ** (2001) ATR and ATRIP: partners in checkpoint signaling. *Science*, **294** (5547): 1713-1716, doi: 10.1126/science.106552
50. **Kim S-T, Lim D-S, Canman CE, Kastan MB** (1999) Substrate Specificities and Identification of Putative Substrates of ATM Kinase Family Members. *The Journal of Biological Chemistry*, **274** (53): 37538-37543, doi: 10.1074/jbc.274.53.37538
51. **Maréchal A, Zou L** (2013) DNA damage sensing by the ATM and ATR kinases. *Cold Spring Harb Perspectives in Biology*, **5** (9): a012716, doi: 10.1101/cshperspect.a012716
52. **Shechter D, Costanzo V, Gautier J** (2004) Regulation of DNA replication by ATR: signaling in response to DNA intermediates. *DNA Repair (Amst)*, **3** (8-9): 901-908, doi: 10.1016/j.dnarep.2004.03.020
53. **Gatei M, Sloper K, Sørensen CS, Syljuåsen R, Falck J, Hobson K, Savage K, Lukas J, Zhou B-B, Bartek, J, Khanna KK** (2003) Ataxia-telangiectasia-mutated (ATM) and NBS1-dependent phosphorylation of Chk1 on Ser-317 in response to ionizing radiation. *The Journal of Biological Chemistry*, **278** (17): 14806-14811, doi: 10.1074/jbc.M210862200
54. **Matsuoka S, Rotman G, Ogawa A, Shiloh Y, Tamai K, Elledge SJ** (2000) Ataxia telangiectasia-mutated phosphorylates Chk2 *in vivo* and *in vitro*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, **97** (19): 10389-10394, doi: 10.1073/pnas.190030497
55. **Roy R, Chun J, Powell SN** (2011) BRCA1 and BRCA2: different roles in a common pathway of genome protection. *Nature Reviews Cancer*, **12** (1): 68-78, doi:10.1038/nrc3181
56. **Taniguchi T, Garcia-Higuera I, Xu B, Andreassen PR, Gregory RC, Kim S-T, Lane WS, Kastan MB, D'Andrea AD** (2002) Convergence of the Fanconi Anemia and Ataxia Telangiectasia Signaling Pathways. *Cell*, **109** (4): 459-472, doi: 10.1016/s0092-8674(02)00747-x
57. **Burma S, Chen BP, Murphy M, Kurimasa A, Chen DJ** (2001) ATM phosphorylates histone H2AX in response to DNA double-strand breaks. *The Journal of Biological Chemistry*, **276** (45): 42462-42467, doi: 10.1074/jbc.C100466200
58. **Gatei M, Scott SP, Filippovitch I, Soronika N, Lavin MF, Weber B, Khanna KK** (2000) Role for ATM in DNA Damage-induced Phosphorylation of BRCA1. *Cancer Research*, **60** (12): 3299-3304
59. **Wang B, Matsuoka S, Ballif BA, Zhang D, Smogorzewska A, Gygi SP, Elledge SJ** (2007) Abraxas and RAP80 form a BRCA1 protein complex required for the DNA damage response. *Science*, **316** (5828): 1194-1198, doi:10.1126/science.1139476
60. **Savic V, Yin B, Maas NL, Bredemeyer AL, Carpenter AC, Helmink BA, Yang-Lott KS, Sleckman BP, Bassing CH** (2009) Formation of dynamic gamma-H2AX domains along broken DNA strands is distinctly regulated by ATM and MDC1 and dependent upon H2AX densities in chromatin. *Molecular Cell*, **34** (3): 298-310, doi: 10.1016/j.molcel.2009.04.012
61. **Chapman JR, Taylor MRG, Boulton SJ** (2012) Playing the end game: DNA double-strand break repair pathway choice. *Molecular Cell*, **47** (4): 497-510, doi:10.1016/j.molcel.2012.07.029
62. **Escribano-Díaz C, Orthwein A, Fradet-Turcotte A, Xing M, Young JTF, Tkáč J, Cook MA, Rosebrock AP, Munro M, Canny MD, Xu D, Durocher D** (2013) A cell cycle-dependent regulatory circuit composed of 53BP1-RIF1 and BRCA1-CtIP controls DNA repair pathway choice. *Molecular Cell*, **49** (5): 872-883, doi: 10.1016/j.molcel.2013.01.001

63. **Karanam** K, Kafri R, Loewer A, Lahav G (2012) Quantitative live cell imaging reveals a gradual shift between DNA repair mechanisms and a maximal use of HR in mid S phase. *Molecular Cell*, **47** (2): 320-329, doi: 10.1016/j.molcel.2012.05.052
64. **Ivanov** EL, Sugawara N, Fishman-Lobell J, Haber JE (1996) Genetic requirements for the single-strand annealing pathway of double-strand break repair in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, **142** (3): 693-704
65. **Heyer** W-D, Ehmsen KT, Liu J (2010) Regulation of homologous recombination in eukaryotes. *The Annual Review of Genetics*, **44**: 113-139, doi: 10.1146/annurev-genet-051710-150955
66. **Kim** H, Chen J, Yu X (2007) Ubiquitin-binding protein RAP80 mediates BRCA1-dependent DNA damage response. *Science*, **316** (5828): 1202-1205, doi: 10.1126/science.1139621
67. **Stucki** M, Clapperton JA, Mohammad D, Yaffe MB, Smerdon SJ, Jackson SP (2005) MDC1 directly binds phosphorylated histone H2AX to regulate cellular responses to DNA double-strand breaks. *Cell*, **123** (7): 1213-1226, doi: 10.1016/j.cell.2005.09.038
68. **Mailand** N, Bekker-Jensen S, Fastrup H, Melander F, Bartek J, Lukas C, Lukas J (2007) RNF8 Ubiquitylates Histones at DNA Double-Strand Breaks and Promotes Assembly of Repair Proteins. *Cell*, **131**(5): 887-900, doi: 10.1016/j.cell.2007.09.040
69. **Lou** Z, Minter-Dykhouse K, Franco S, Gostissa M, Rivera MA, Celeste A, Manis JP, van Deursen J, Nussenzweig A, Paull TT, Alt FW, Chen J (2006) MDC1 Maintains Genomic Stability by Participating in the Amplification of ATM-Dependent DNA Damage Signals. *Molecular Cell*, **21** (2): 187-200, doi: 10.1016/j.molcel.2005.11.025
70. **Chen** H, Lisby M, Symington LS (2013) RPA coordinates DNA end resection and prevents formation of DNA hairpins. *Molecular Cell*, **50** (4): 589-600, doi: 10.1016/j.molcel.2013.04.032
71. **Cruz-García** A, López-Saavedra A, Huertas P (2014) BRCA1 accelerates CtIP-mediated DNA-end resection. *Cell Reports*, **9** (2): 451-459, doi: 10.1016/j.celrep.2014.08.076
72. **Zhong** Q, Chen CF, Li S, Chen Y, Wang CC, Xiao J, Chen PL, Sharp ZD, Lee WH (1999) Association of BRCA1 with the hRad50-hMre11-p95 complex and the DNA damage response. *Science*, **285** (5428): 747-750, doi: 10.1126/science.285.5428.747
73. **De Jager** M, van Noort J, van Gent DC, Dekker C, Kanaar R, Wyman C (2001) Human Rad50/Mre11 is a flexible complex that can tether DNA ends. *Molecular Cell*, **8** (5): 1129-1135, doi: 10.1016/s1097-2765(01)00381-1
74. **Paull** TT, **Gellert** M (1998) The 3' to 5' exonuclease activity of Mre 11 facilitates repair of DNA double-strand breaks. *Molecular Cell*, **1** (7): 969-979, doi: 10.1016/s1097-2765(00)80097-0
75. **Sartori** AA, Lukas C, Coates J, Mistrik M, Fu S, Bartek J, Baer R, Lukas J, Jackson SP (2007) Human CtIP promotes DNA end resection. *Nature*, **450** (7169): 509-514, doi: 10.1038/nature06337
76. **Wold** MS (1997) Replication protein A: a heterotrimeric, single-stranded DNA-binding protein required for eukaryotic DNA metabolism. *Annual Review of Biochemistry*, **66**: 61-92, doi: 10.1146/annurev.biochem.66.1.61
77. **Xia** B, Sheng Q, Nakanishi K, Ohashi A, Wu J, Christ N, Liu X, Jasin M, Couch FJ, Livingston DM (2006) Control of BRCA2 cellular and clinical functions by a nuclear partner, PALB2. *Molecular Cell*, **22** (6): 719-729, doi: 10.1016/j.molcel.2006.05.022
78. **Buisson** R, Niraj J, Rodrigue A, Ho CK, Kreuzer J, Foo TK, Hardy EJ, Delleire G, Haas W, Xia B, Masson J-Y, Zou L (2017) Coupling of Homologous Recombination and the Checkpoint by ATR. *Molecular Cell*, **65** (2): 336-346, doi: 10.1016/j.molcel.2016.12.007
79. **Jensen** RB, Carreira A, Kowalczykowski SC (2010) Purified human BRCA2 stimulates RAD51-mediated recombination. *Nature*, **467** (7316): 678-683, doi: 10.1038/nature09399
80. **Liu** J, Doty T, Gibson B, Heyer W-D (2010) Human BRCA2 protein promotes RAD51 filament formation on RPA-covered single-stranded DNA. *Nature Structural and Molecular Biology*, **17** (10): 1260-1262, doi: 10.1038/nsmb.1904
81. **Sung** P (1994) Catalysis of ATP dependent homologous DNA pairing and strand exchange by yeast RAD51 protein. *Science*, **265** (5176): 1241-1243, doi: 10.1126/science.8066464

82. **Sung P**, Robberson DL (1995) DNA strand exchange mediated by a RAD51-ssDNA nucleoprotein filament with polarity opposite to that of RecA. *Cell*, **82** (3): 453-461, doi: 10.1016/0092-8674(95)90434-4
83. **San Filippo J**, Sung P, Klein H (2008) Mechanism of eukaryotic homologous recombination. *Annual Review of Biochemistry*, **77**: 229-257, doi: 10.1146/annurev.biochem.77.061306.125255
84. **Maloisel L**, Fabre F, Gangloff S (2008) DNA Polymerase δ Is Preferentially Recruited during Homologous Recombination To Promote Heteroduplex DNA Extension. *Molecular and Cellular Biology*, **28** (4): 1373-1382, doi: 10.1128/MCB.01651-07
85. **Wright WD**, **Heyer W-D** (2014) Rad54 functions as a Heteroduplex DNA Pump Modulated by Its DNA Substrates and Rad51 during D loop Formation. *Molecular Cell*, **53** (3): 420-432, doi: 10.1016/j.molcel.2013.12.027
86. **Cantor SB**, Bell DW, Ganesan S, Kass EM, Drapkin R, Grossman S, Wahrer DC, Sgroi DC, Lane WS, Haber DA, Livingston DM (2001) BACH1, a novel helicase-like protein, interacts directly with BRCA1 and contributes to its DNA repair function. *Cell*, **105** (1): 149-160, doi: 10.1016/s0092-8674(01)00304-x
87. **Sen D**, **Gilbert W** (1988) Formation of parallel four-stranded complexes by guanine-rich motifs in DNA and its implications for meiosis. *Nature*, **334** (6180): 364-366, doi: 10.1038/334364a0
88. **Wu Y**, Shin-ya K, Brosh RM Jr (2008) FANCI helicase defective in Fanconi anemia and breast cancer unwinds G-quadruplex DNA to defend genomic stability. *Journal of Molecular Cell Biology*, **28** (12): 4116-4128, doi: 10.1128/MCB.02210-07
89. **Litman R**, Peng M, Jin Z, Zhang F, Zhang J, Powell S, Andreassen PR, Cantor SB (2005) BACH1 is critical for homologous recombination and appears to be the Fanconi anemia gene product FANCI. *Cancer Cell*, **8** (3): 255-265, doi: 10.1016/j.ccr.2005.08.004
90. **Greenberg RA**, Sobhian B, Pathania S, Cantor SB, Nakatani Y, Livingston DM (2006) Multifactorial contributions to an acute DNA damage response by BRCA1/BARD1-containing complexes. *Genes & Development*, **20** (1): 34-46, doi: 10.1101/gad.1381306
91. **Zou L**, **Elledge SJ** (2003) Sensing DNA damage through ATRIP recognition of RPA-ssDNA complexes. *Science*, **300** (5625): 1542-1548, doi: 10.1126/science.1083430
92. **Ward IM**, **Chen J** (2001) Histone H2AX Is Phosphorylated in an ATR-dependent Manner in Response to Replicational Stress. *Journal of Biological Chemistry*, **276** (51): 47759-47762, doi: 10.1074/jbc.C100569200
93. **D'Andrea AD**, **Grompe M** (2003) The Fanconi anaemia/BRCA pathway. *Nature Reviews Cancer*, **3** (1): 23-34, doi: 10.1038/nrc970
94. **Schlacher K**, Wu H, Jasin M (2012) A distinct replication fork protection pathway connects Fanconi anemia tumor suppressors to RAD51-BRCA1/2. *Cancer Cell*, **22** (1): 106-116, doi: 10.1016/j.ccr.2012.05.015
95. **Andreassen PR**, **D'Andrea AD**, Taniguchi T (2004) ATR couples FANCD2 monoubiquitination to the DNA-damage response. *Genes & Development*, **18** (16): 1958-1963, doi: 10.1101/gad.1196104
96. **Ishiai M**, Kitao H, Smogorzewska A, Tomida J, Kinomura A, et al. (2008) FANCI phosphorylation functions as a molecular switch to turn on the Fanconi anemia pathway. *Nature Structural and Molecular Biology*, **15** (11): 1138-1146, doi: 10.1038/nsmb.1504
97. **Sareen A**, Chaudhury I, Adams N, Soback A (2012) Fanconi anemia proteins FANCD2 and FANCI exhibit different DNA damage responses during S-phase. *Nucleic Acids Research*, **40** (17): 8425-8439, doi: 10.1093/nar/gks638
98. **Meetei AR**, de Winter JP, Medhurst AL, Wallisch M, Waisfisz Q, et al. (2003) A novel ubiquitin ligase is deficient in Fanconi anemia. *Nature Genetics*, **35** (2): 165-170, doi: 10.1038/ng1241
99. **Rickman KA**, Lach FP, Abhyankar A, Donovan FX, Sanborn EM, et al. (2015) Deficiency of UBE2T, the E2 ubiquitin ligase necessary for FANCD2 and FANCI ubiquitination, causes FA-T subtype of Fanconi anemia. *Cell Reports*, **12** (1): 35-41, doi: 10.1016/j.celrep.2015.06.014

100. **Montes de Oca** R, Andreassen PR, Margossian SP, Gregory RC, Taniguchi T, Wang X, Houghtaling S, Grompe M, D'Andrea AD (2005) Regulated interaction of the Fanconi anemia protein, FANCD2, with chromatin. *Blood*, **105** (3): 1003-1009, doi: 10.1182/blood-2003-11-3997
101. **Moldovan** GL, **D'Andrea** AD (2009) How the Fanconi anemia pathway guards the genome. *Annual Review of Genetics*, **43**: 223-249, doi: 10.1146/annurev-genet-102108-134222
102. **Long** DT, Joukov V, Budzowska M, Walter JC (2014) BRCA1 promotes unloading of the CMG helicase from a stalled DNA replication fork. *Molecular Cell*, **56** (1): 174-185, doi: 10.1016/j.molcel.2014.08.012
103. **Taniguchi** T, Garcia-Higuera I, Andreassen PR, Gregory RC, Grompe M, D'Andrea AD (2002) S-phase-specific interaction of the Fanconi anemia protein, FANCD2, with BRCA1 and RAD51. *Blood*, **100** (7): 2414-2420, doi: 10.1182/blood-2002-01-0278
104. **Chaudhury** I, Sareen A, Raghunandan M, Sobek A (2013) FANCD2 regulates BLM complex functions independently of FANCI to promote replication fork recovery. *Nucleic Acids Research*, **41** (13): 6444-6459, doi: 10.1093/nar/gkt348
105. **Cortez** D, Wang Y, Qin J, Elledge SJ (1999) Requirement of ATM-dependent phosphorylation of Brca1 in the DNA damage response to double-strand breaks. *Science*, **286** (5442): 1162-1166, doi: 10.1126/science.286.5442.1162
106. **Tibbetts** RS, Cortez D, Brumbaugh KM, Scully R, Livingston D, Elledge SJ, Abraham RT (2000) Functional interactions between BRCA1 and the checkpoint kinase ATR during genotoxic stress. *Genes & Development*, **14** (23): 2989-3002, doi: 10.1101/gad.851000
107. **Lee** JS, Collins KM, Brown AL, Lee CH, Chung JH (2000) hCds1-mediated phosphorylation of BRCA1 regulates the DNA damage response. *Nature*, **404** (6774): 201-204, doi: 10.1038/35004614
108. **Chen** J (2000) Ataxia telangiectasia-related protein is involved in the phosphorylation of BRCA1 following deoxyribonucleic acid damage. *Cancer Research*, **60** (18): 5037-5039
109. **Mullan** PB, Quinn JE, Gilmore PM, McWilliams S, Andrews H, Gervin C, McCabe N, McKenna S, Wihte P, Song YH, Maheswaran S, Liu E, Haber DA, Johnston PG, Harkin DP (2001) BRCA1 and GADD45 mediated G2/M cell cycle arrest in response to antimicrotubule agents. *Oncogene*, **20** (43): 6123-6131, doi: 10.1038/sj.onc.1204712
110. **Yarden** RI, Pardo-Reoyo S, Sgagias M, Cowan KH, Brody LC (2002) BRCA1 regulates the G2/M checkpoint by activating Chk1 kinase upon DNA damage. *Nature Genetics*, **30** (3): 285-289, doi: 10.1038/ng837
111. **Hsu** L-C, **White** RL (1998) BRCA1 is associated with the centrosome during mitosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, **95** (22): 12983-12988, doi: 10.1073/pnas.95.22.12983
112. **Stewart** GS, Wang B, Bignell CR, Taylor AMR, Elledge SJ (2003) MDC1 is a mediator of the mammalian DNA damage checkpoint. *Nature*, **421** (6926): 961-966, doi: 10.1038/nature01446
113. **Wang** R-H, Yu H, Deng C-X (2004) A requirement for breast-cancer-associated gene 1 (BRCA1) in the spindle checkpoint. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, **101** (49): 17108-17113, doi: 10.1073/pnas.0407585101
114. **Miki** Y, Swensen J, Shattuck-Eidens D, Futreal PA, Harshman K, Tavtigian S, Liu Q, Cochran C, Bennett LM, Ding W, Bell R, Rosenthal J, Hussey C, Tran T, McClure M, Frye C, Hattier T, Phelps R, Haugen-Strano A, Katcher H, Yakumo K, Gholami Z, Shaffer D, Stone S, Bayer S, Wray C, Bogden R, Dayananth P, Ward J, Tonin P, Narod S, Bristow PK, Norris FH, Helvering L, Morrison P, Rostek P, Lai M, Barrett JC, Lewis C, Neuhausen S, Cannon-Albright L, Goldgar D, Wiseman R, Kamb A, Skolnick MH (1994) A Strong Candidate for the Breast and Ovarian Cancer Susceptibility Gene *BRCA1*. *Science*, **266** (5182): 66-71, doi:10.1126/science.7545954
115. **Hall** JM, Lee MK, Newman B, Morrow JE, Anderson LA, Huey B, King MC (1990) Linkage of early-onset familial breast cancer to chromosome 17q21. *Science*, **250** (4988): 1684-1689, doi: 10.1126/science.2270482
116. **Chen** C-F, Li S, Chen Y, Chen P-L, Sharp ZD, Lee W-H (1996) The Nuclear Localization Sequences of the BRCA1 Protein Interact with the Importin-alpha Subunit of the Nuclear Transport Signal

- Receptor. *The Journal of Biological Chemistry*, **271** (51): 32863-32868, doi: 10.1074/jbc.271.51.32863
117. **Moynahan** ME, Chiu JW, Koller BH, Jasin M (1999) Brca1 controls homology-directed DNA repair. *Molecular Cell*, **4** (4): 511-518, doi: 10.1016/s1097-2765(00)80202-6
118. **Nadeau** G, Boufaied N, Moisan A, Lemieux KM, Cayanan C, Monteiro ANA, Gaudreau L (2000) BRCA1 can stimulate gene transcription by a unique mechanism. *EMBO Reports*, **1** (3): 260-265, doi: 10.1093/embo-reports/kvd059
119. **Bienstock** RJ, Darden T, Wiseman R, Pedersen L, Barrett JC (1996) Molecular modeling of the amino-terminal zinc ring domain of BRCA1. *Cancer Research*, **56** (11): 2539-2545
120. **Wu** LC, Wang ZW, Tsan JT, Spillman MA, Phung A, Xu XL, Yang MC, Hwang LY, Bowcock AM, Baer R (1996) Identification of a RING protein that can interact in vivo with the BRCA1 gene product. *Nature Genetics*, **14** (4): 430-440, doi: 10.1038/ng1296-430
121. **Hashizume** R, Fukuda M, Maeda I, Nishikawa H, Oyake D, Yabuki Y, Ogata H, Ohta T (2001) The RING heterodimer BRCA1-BARD1 is a ubiquitin ligase inactivated by a breast cancer-derived mutation. *The Journal of Biological Chemistry*, **276** (18): 14537-14540, doi: 10.1074/jbc.C000881200
122. **Chen** A, Kleiman FE, Manley JL, Ouchi T, Pan Z-Q (2002) Autoubiquitination of the BRCA1*BARD1 RING ubiquitin ligase. *The Journal of Biological Chemistry*, **277** (24): 22085-22092, doi: 10.1074/jbc.M201252200
123. **Simons** AM, Horwitz AA, Starita LM, Griffin K, Williams RS, Glover JNM, Parvin JD (2006) BRCA1 DNA-binding activity is stimulated by BARD1. *Cancer Research*, **66** (4): 2012-2018, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-3296
124. **Yu** X, Fu S, Lai M, Baer R, Chen J (2006) BRCA1 ubiquitinates its phosphorylation-dependent binding partner CtIP. *Genes & Development*, **20** (13): 1721-1726, doi: 10.1101/gad.1431006
125. **Paull** TT, Cortez D, Bowers B, Elledge SJ, Gellert M (2001) Direct DNA binding by Brca1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, **98** (11): 6086-6091, doi: 10.1073/pnas.111125998
126. **Sy** SM, Huen MS, Chen J (2009) PALB2 is an integral component of the BRCA complex required for homologous recombination repair. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, **106** (17): 7155-7160, doi: 10.1073/pnas.0811159106
127. **Gatei** M, Zhou BB, Hobson K, Scott S, Young D, Khanna KK (2001) Ataxia telangiectasia mutated (ATM) kinase and ATM and Rad3 related kinase mediate phosphorylation of Brca1 at distinct and overlapping sites. In vivo assessment using phospho-specific antibodies. *The Journal of Biological Chemistry*, **276** (20): 17276-17280, doi: 10.1074/jbc.M011681200
128. **Xu** B, O'Donnell AH, Kim ST, Kastan MB (2002) Phosphorylation of serine 1387 in Brca1 is specifically required for the Atm-mediated S-phase checkpoint after ionizing irradiation. *Cancer Research*, **62** (16): 4588-4591
129. **Yu** X, Chini CCS, He M, Mer G, Chen J (2003) The BRCT domain is a phospho-protein binding domain. *Science*, **302** (5645): 639-642, doi: 10.1126/science.1088753
130. **Yu** X, Wu LC, Bowcock AM, Aronheim A, Baer R (1998) The C-terminal (BRCT) domains of BRCA1 interact in vivo with CtIP, a protein implicated in the CtBP pathway of transcriptional repression. *The Journal of Biological Chemistry*, **273** (39): 25388-25392, doi: 10.1074/jbc.273.39.25388
131. **Kim** H, Huang J, Chen J (2007) CCDC98 is a BRCA1-BRCT domain-binding protein involved in the DNA damage response. *Nature Structural and Molecular Biology*, **14**: 710-715, doi: 10.1038/nsmb1277
132. **King** MC, Marks JH, Mandell JB, New York Breast Cancer Study Group (2003) Breast and ovarian cancer risks due to inherited mutations in BRCA1 and BRCA2. *Science*, **302** (5645): 643-646, doi: 10.1126/science.1088759
133. **Clark** SL, Rodriguez AM, Snyder RR, Hankins GDV, Boehning D (2012) Structure-Function of the Tumor Suppressor BRCA1. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, **1** (1): 1-8, doi: 10.5936/csbj.201204005

134. **Castilla** LH, Couch FJ, Erdos MR, Hoskins KF, Calzone K, Garber JE, Boyd J, Lubin MB, Deshano ML, Brody LC, et al. (1994) Mutations in the BRCA1 gene in families with early-onset breast and ovarian cancer. *Nature Genetics*, **8** (4): 387-391, doi: 10.1038/ng1294-387
135. **Zhang** H, Somasundaram K, Peng Y, Tian H, Zhang H, Bi D, Weber BL, El-Deiry WS (1998) BRCA1 physically associates with p53 and stimulates its transcriptional activity. *Oncogene*, **16** (13): 1713-1721, doi: 10.1038/sj.onc.1201932
136. **Futreal** PA, Liu Q, Shattuck-Eidens D, Cochran C, Harshman K, Tavtigian S, Bennett LM, Haugen-Strano A, Swensen J, Miki Y, et al. (1994) BRCA1 mutations in primary breast and ovarian carcinomas. *Science*, **266** (5182): 120-122, doi: 10.1126/science.7939630
137. **Rennert** G, Bisland-Naggan S, Barnett-Griness O, Bar-Joseph N, Zhang S, Rennert HS, Narod SA (2007) Clinical outcomes of breast cancer in carriers of BRCA1 and BRCA2 mutations. *New England Journal of Medicine*, **357** (2): 115-123, doi: 10.1056/NEJMoa070608
138. **Zhong** Q, Peng HL, Zhao X, Zhang L, Hwang WT (2015) Effects of BRCA1- and BRCA2-related mutations on ovarian and breast cancer survival: a meta-analysis. *Clinical Cancer Research*, **21** (1): 211-220, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-14-1816
139. **Tutt** A, Tovey H, Cheang MCU, et al. (2018) Carboplatin in BRCA1/2-mutated and triple-negative breast cancer BRCAness subgroups: the TNT Trial. *Nature Medicine*, **24** (5): 628-637, doi: 10.1038/s41591-018-0009-7
140. **The Cancer Genome Atlas Network (2012)**
141. **Bryant** HE, Schultz N, Thomas HD, Parker KM, Flower D, Lopez E, Kyle S, Meuth M, Curtin NJ, Helleday T (2005) Specific killing of BRCA2-deficient tumours with inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase. *Nature*, **434** (7035): 913-917, doi: 10.1038/nature03443
142. **Farmer** H, McCabe N, Lord CJ, Tutt ANJ, Johnson DA, Richardson TB, Santarosa M, Dillon KJ, Hickson I, Knights C, Martin NMB, Jackson SP, Smith GCM, Ashworth A (2005) Targeting the DNA repair defect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy. *Nature*, **434** (7035): 917-921, doi: 10.1038/nature03445
143. **McCabe** N, Turner NC, Lord CJ, Kluzek K, Bialkowska A, Swift S, Giavara S, O'Connor MJ, Tutt AN, Zdzienicka MZ, Smith GC, Ashworth A (2006) Deficiency in the Repair of DNA Damage by Homologous Recombination and Sensitivity to poly(ADP-Ribose) Polymerase Inhibition. *Cancer Research*, **66** (16): 8109-8115, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-0140
144. **Gradwohl** G, Ménissier de Murcia JM, Molinete M, Simonin F, Koken M, Hoeijmakers JH, de Murcia G (1990) The second zinc-finger domain of poly(ADP-ribose) polymerase determines specificity for single-stranded breaks in DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, **87** (8): 2990-2994, doi: 10.1073/pnas.87.8.2990
145. **Benjamin** RC, **Gill** DM (1980) ADP-ribosylation in mammalian cell ghosts. Dependence of poly(ADP-ribose) synthesis on strand breakage in DNA. *The Journal of Biological Chemistry*, **255** (21): 10493-14501
146. **Ikejima** M, Noguchi S, Yamashita R, Ogura T, Sugimura T, Gill DM, Miwa M (1990) The zinc fingers of human poly(ADP-ribose) polymerase are differentially required for the recognition of DNA breaks and nicks and the consequent enzyme activation. *Journal of Biological Chemistry*, **265** (35): 21907-21913
147. **Murai** J, Huang SY, Das BB, Renaud A, Zhang Y, Doroshow JH, Ji J, Takeda S, Pommier Y (2012) Trapping of PARP1 and PARP2 by clinical PARP Inhibitors. *Cancer Research*, **72** (21): 5588-5599, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-12-2753
148. **Godon** C, Cordelières FP, Biard D, Giocanti N, Mégnin-Chanet F, Hall J, Favaudon V (2008) PARP inhibition versus PARP-1 silencing: different outcomes in terms of single-strand break repair and radiation susceptibility. *Nucleic Acids Research*, **36** (13): 4454-4464, doi: 10.1093/nar/gkn403
149. **Jasin** M, de Villiers J, Weber F, Schaffner W (1985) High frequency of homologous recombination in mammalian cells between endogenous and introduced SV40 genomes. *Cell*, **43** (3 Pt 2): 695-703, doi: 10.1016/0092-8674(85)90242-9

150. **Helleday T** (2011) The underlying mechanism for the PARP and BRCA synthetic lethality: Clearing up the misunderstandings. *Molecular Oncology*, **5** (4): 387-393, doi: 10.1016/j.molonc.2011.07.001
151. **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** (2017) Olaparib for Metastatic Breast Cancer in Patients with a Germline BRCA Mutation. *New England Journal of Medicine*, **377** (6): 523-533, doi: 10.1056/NEJMoa1706450
152. **Litton JK, Rugo HS, Ettl J, Hurvitz SA, Gonçalves A, Lee K-H, Fehrenbacher L, Yerushalmi R, Mina LA, Martin M, et al.** (2018) Talazoparib in Patients with Advanced Breast Cancer and a Germline BRCA Mutation. *New England Journal of Medicine*, **379** (8): 753-763, doi: 10.1056/NEJMoa1802905
153. **Inbar-Rozensal D, Castiel A, Visochek L, Castel D, Dantzer F, Izraeli S, Cohen-Armon M** (2009) A Selective Eradication of Human Nonhereditary Breast Cancer Cells by Phenanthridine-Derived polyADP-Ribose Polymerase Inhibitors. *Breast Cancer Research*, **11** (6): R78, doi: 10.1186/bcr2445
154. **Lord CJ, Ashworth A** (2016) BRCAness revisited. *Nature Reviews Cancer*, **16** (2): 110-120, doi: 10.1038/nrc.2015.21
155. **Chopra N, Tovey H, Pearson A, Cutts R, Toms C, Proszek P, Hubank M, Dowsett M, Dodson A, Daley F, Kriplani D, Gevensleben H, Davies HR, Degasperi A, Roylance R, Chan S, Tutt A, Skene A, Evans A, Bliss JM, Nik-Zainal S, Turner NC** (2020) Homologous recombination DNA repair deficiency and PARP inhibition activity in primary triple negative breast cancer. *Nature Communications*, **11** (1): 2662, doi: 10.1038/s41467-020-16142-7
156. **Gilmore E, McCabe N, Kennedy RD, Parkes EE** (2019) DNA Repair Deficiency in Breast Cancer: Opportunities for Immunotherapy. *Journal of Oncology*, **2019** (4325105): 1-14, doi: 10.1155/2019/4325105
157. **Schumacher TN, Scheper W, Kvistborg P** (2019) Cancer neoantigens. *Annual Review of Immunology*, **37**: 173-200, doi: 10.1146/annurev-immunol-042617-053402
158. **Solinás C, Marcoux D, Garaud S, Vitória JR, Van den Eynden G, De Wind A, De Silva P, Boisson A, Craciun L, Larsimont D, et al.** (2019) BRCA gene mutations do not shape the extent and organization of tumor infiltrating lymphocytes in triple negative breast cancer. *Cancer Letters*, **450**: 88-97, doi: 10.1016/j.canlet.2019.02.027
159. **Liang SC, Latchman YE, Buhlmann JE, Tomczak MF, Horwitz BH, Freeman GJ, Sharpe AH** (2003) Regulation of PD-1, PD-L1, and PD-L2 expression during normal and autoimmune responses. *European Journal of Immunology*, **33** (10): 2706-2716, doi: 10.1002/eji.200324228
160. **Good-Jacobson KL, Szumilas CG, Chen L, Sharpe AH, Tomayko MM, Shlomchik MJ** (2010) PD-1 regulates germinal center B cell survival and the formation and affinity of long-lived plasma cells. *Nature Immunology*, **11** (6): 535-542, doi: 10.1038/ni.1877
161. **Rodig N, Ryan T, Allen JA, Pang H, Grabie N, Chernova T, Greenfield EA, Liang SC, Sharpe AH, Lichtman AH, Freeman GJ** (2003) Endothelial expression of PD-L1 and PD-L2 down-regulates CD8+ T cell activation and cytolysis. *European Journal of Immunology*, **33** (11): 3117-3126, doi: 10.1002/eji.200324270
162. **Sato H, Niimi A, Yasuhara T, et al.** (2017) DNA double-strand break repair pathway regulates PD-L1 expression in cancer cells. *Nature Communications*, **8** (1751): 1-11, doi: 10.1038/s41467-017-01883-9
163. **Parkes EE, Walker SM, Taggart LE, et al.** (2017) Activation of STING-dependent innate immune signaling by S-phase-specific DNA damage in breast cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, **109** (1): djw199, doi: 10.1093/jnci/djw199
164. **Keir ME, Liang SC, Guleria I, Latchman YE, Qipo A, Albacker LA, Koulmanda M, Freeman GF, Sayegh MH, Sharpe AH** (2006) Tissue expression of PD-L1 mediates peripheral T cell tolerance. *Journal of Experimental Medicine*, **203** (4): 883-895, doi: 10.1084/jem.20051776

165. **Sun Z**, Fourcade J, Pagliano O, Chauvin J-M, Sander C, Kirkwood JM, Zarour HM (2015) IL-10 and PD-1 cooperate to limit the activity of tumor-specific CD8+ T cells. *Cancer Research*, **75** (8): 1635-1644, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-14-3016
166. **Mittendorf EA**, Philips AV, Meric-Bernstam F, et al. (2014) PD-L1 expression in triple-negative breast cancer. *Cancer Immunology Research*, **2** (4): 361-370, doi: 10.1158/2326-6066.CIR-13-0127
167. **Brahmer JR**, Tykodi SS, Chow LQM, Hwu W-J, Topalian SL, Hwu P, Drake CG, Camacho LH, Kauh J, Odunsi K, Pitot HC, Hamid O, Bhatia S, Martins R, Eaton K, Chen S, Salay TM, Alaparthi S, Grosso JF, Korman AJ, Parker SM, Agrawal S, Goldberg SM, Pardoll DM, Gupta A, Wigginton JM (2012) Safety and activity of anti-PD-L1 antibody in patients with advanced cancer. *New England Journal of Medicine*, **366** (26): 2455-2465, doi: 10.1056/NEJMoa1200694
168. **Wong RM**, Scotland RR, Lau RL, Wang C, Korman AJ, Kast WM, Weber JS (2007) Programmed death-1 blockade enhances expansion and functional capacity of human melanoma antigen-specific CTLs. *International Immunology*, **19** (10): 1223-1234, doi:10.1093/intimm/dxm091
169. **Dirix LY**, Takacs I, Jerusalem G, Nikolinakos P, Arkenau H-T, Forero-Torres A, Boccia R, Lippman ME, Somer R, Smakal M, Emes LA, Hrinchenko B, Edenfield W, Gurtler J, Von Heydebreck A, Grote HJ, Chin K, Hamilton EP (2018) Avelumab, an anti-PD-L1 antibody, in patients with locally advanced or metastatic breast cancer: a phase 1b JAVELIN Solid Tumor study. *Breast Cancer Research and Treatment*, **167** (3): 671-686, doi: 10.1007/s10549-017-4537-5
170. **Rugo HS**, Delord J-P, Im S-A, Ott PA, Piha-Paul SA, Bedard PL, Jasgit Sachdev, Le Tourneau C, van Brummelen EMJ, Varga A, Salgado R, Loi S, Saraf S, Pietrangelo D, Karantza V, Tan AR (2018) Safety and Antitumor Activity of Pembrolizumab in Patients with Estrogen Receptor–Positive/Human Epidermal Growth Factor Receptor 2–Negative Advanced Breast Cancer. *Clinical Cancer Research*, **24** (12): 2804-2811, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-17-3452
171. **Tolaney SM**, Kalinsky K, Kaklamani VG, D'Adamo DR, Aktan G, Tsai ML, O'Regan R, Kaufman PA, Wilks S, Andreopoulou E, Patt DA, Yuan Y, Wang G, Xing D, Kleynerman E, Karantza V, Diab S (2020) A phase Ib/II study of eribulin (ERI) plus pembrolizumab (PEMBRO) in metastatic triple-negative breast cancer (mTNBC) (ENHANCE 1). *Journal of Clinical Oncology*, **38** (15): 1015
172. **Adams S**, Loi S, Toppmeyer D, Cescon DW, De Laurentiis M, Nanda R, Winer EP, Mukai H, Tamura K, Armstrong A, Liu MC, Iwata H, Ryvo L, Wimberger P, Rugo HS, Tan AR, Jia L, Ding Y, Karantza V, Schmid P (2019) Pembrolizumab monotherapy for previously untreated, PD-L1-positive, metastatic triple-negative breast cancer: cohort B of the phase II KEYNOTE-086 study. *Annals of Oncology*, **30** (3): 405-411, doi:10.1093/annonc/mdy518
173. **Nanda R**, Liu MC, Yau C et al. (2020) Effect of Pembrolizumab Plus Neoadjuvant Chemotherapy on Pathologic Complete Response in Women With Early-Stage Breast Cancer: An Analysis of the Ongoing Phase 2 Adaptively Randomized I-SPY2 Trial. *JAMA Oncology*, **6** (5): 676-684, doi: 10.1001/jamaoncol.2019.6650
174. **Schmid P**, Salgado R, Park YH, E Muñoz-Couselo, Kim SB, Sohn J, Im S-A, Foukakis T, Kuemmel S, Dent R, Yin L, Wang A, Tryfonidis K, Karantza V, Cortés, Loi S (2020) Pembrolizumab plus chemotherapy as neoadjuvant treatment of high-risk, early-stage triple-negative breast cancer: results from the phase 1b open-label, multicohort KEYNOTE-173 study. *Annals of Oncology*, **31** (5): 569-581, doi: 10.1016/j.annonc.2020.01.072
175. **Pellegrino B**, Musolino A, Llop-Guevara A, Serra V, De Silva P, Hlavata Z, Sangiolo D, Willard-Gallo K, Solinas C (2020) Homologous Recombination Repair Deficiency and the Immune Response in Breast Cancer: A Literature Review. *Translational Oncology*, **13** (2): 410-422, doi: 10.1016/j.tranon.2019.10.010
176. **Ding L**, Kim H-J, Wang Q, Kearns M, Jiang T, Ohlson CE, Li BB, Xie S, Liu JF, Stover EH, Howitt BE, Bronson RT, Lazo S, Roberts TM, Freeman GJ, Konstantinopoulos PA, Matulonis UA, Zhao JJ (2018) PARP inhibition elicits STING-dependent antitumor immunity in Brca1-deficient ovarian cancer. *Cell Reports*, **25** (11): 2972-2980, doi: 10.1016/j.celrep.2018.11.054
177. **Shen J**, Zhao W, Ju Z, Wang L, Peng Y, Labrie M, Yap TA, Mills GB, Peng G (2019) PARPi triggers the STING-dependent immune response and enhances the therapeutic efficacy of immune

- checkpoint blockade independent of BRCAness. *Cancer Research*, **79** (2): 311-319, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-18-1003
178. **Ishikawa H, Barber GN** (2008) STING is an endoplasmic reticulum adaptor that facilitates innate immune signalling. *Nature*, **455** (7213): 674-678, doi: 10.1038/nature07317
179. **Härtlova A, Erttmann SF, Raffi FA, Schmalz AM, Resch U, Anugula S, Lienenklaus S, Nilsson LM, Kröger A, Nilsson JA, Ek T, Weiss S, Gekara NO** (2015) DNA damage primes the type I interferon system via the cytosolic DNA sensor STING to promote anti-microbial innate immunity. *Immunity*, **42** (2): 332-343, doi: 10.1016/j.immuni.2015.01.012
180. **Gao D, Wu J, Wu Y-T, Du F, Aroh C, Yan N, Sun L, Chen ZJ** (2013) Cyclic GMP-AMP synthase is an innate immune sensor of HIV and other retroviruses. *Science*, **341** (6148): 903-906, doi: 10.1126/science.1240933
181. **Ablasser A, Goldeck M, Cavlar T, Deimling T, Witte G, Röhl I, Hopfner K-P, Ludwig J, Hornung V** (2013) cGAS produces a 2'-5'-linked cyclic dinucleotide second messenger that activates STING. *Nature*, **498** (7454): 380-384, doi: 10.1038/nature12306
182. **Ergun SL, Fernandez D, Weiss TM, Li L** (2019) STING polymer structure reveals mechanisms for activation, hyperactivation, and inhibition. *Cell*, **178** (2): 290-301, doi: 10.1016/j.cell.2019.05.036
183. **Shang G, Zhang C, Chen ZJ, Bai XC, Zhang X** (2019) Cryo-EM structures of STING reveal its mechanism of activation by cyclic GMP-AMP. *Nature*, **567** (7748): 389-393, doi: 10.1038/s41586-019-0998-5
184. **Tanaka Y, Chen ZJ** (2013) STING Specifies IRF3 phosphorylation by TBK1 in the Cytosolic DNA Signaling Pathway. *Science Signaling*, **5** (214): ra20, doi:10.1126/scisignal.2002521
185. **Kolumam GA, Thomas S, Thompson LJ, Sprent J, Murali-Krishna K** (2005) Type I interferons act directly on CD8 T cells to allow clonal expansion and memory formation in response to viral infection. *Journal of Experimental Medicine*, **202** (5): 637-650, doi: 10.1084/jem.20050821
186. **Keppeler SJ, Rosenits K, Koegl T, Vucikujia S, Aichele P** (2012) Signal 3 cytokines as modulators of primary immune responses during infections: the interplay of type I IFN and IL-12 in CD8 T cell responses. *PLoS One*, **7** (7): e40865, doi: 10.1371/journal.pone.0040865
187. **Fu J, Kanne DB, Leong M, Glickman LH, McWhirter SM, Lemmens E, et al.** (2015) STING agonist formulated cancer vaccines can cure established tumors resistant to PD-1 blockade. *Science Translational Medicine*, **7** (283): 283ra52, doi: 10.1126/scitranslmed.aaa4306
188. **Moore E, Clavijo PE, Davis R, Cash H, Van Waes C, Kim Y, Allen C** (2016) Established T cell-inflamed tumors rejected after adaptive resistance was reversed by combination STING activation and PD-1 pathway blockade. *Cancer Immunology Research*, **4** (12): 1061-1071, doi: 10.1158/2326-6066.CIR-16-0104
189. **Schlacher K, Christ N, Siaud N, Egashira A, Wu H, Jasin M** (2011) Double-strand break repair-independent role for BRCA2 in blocking stalled replication fork degradation by MRE11. *Cell*, **145** (4): 529-542, doi: 10.1016/j.cell.2011.03.041
190. **Bhattacharya S, Srinivasan K, Abdisalaam S, Su F, Raj P, Dozmorov I, Mishra R, Wakeland EK, Ghose S, Mukherjee S, Asaithamby A** (2017) RAD51 interconnects between DNA replication, DNA repair and immunity. *Nucleic Acids Research*, **45** (8): 4590-4605, doi: 10.1093/nar/gkx126
191. **Wolf C, Rapp A, Berndt N, Staroske W, Schuster M, Dobrick-Mattheuer M, Kretschmer S, König N, Kurth T, Wiczorek D, Kast K, Cardoso MC, Günther C, Lee-Kirsch MA** (2016) RPA and Rad51 constitute a cell intrinsic mechanism to protect the cytosol from self DNA. *Nature Communications*, **7** (11752): 1-11, doi: 10.1038/ncomms11752
192. **Mukherjee S, Abdisalaam S, Bhattacharya S, Srinivasan K, Sinha D, Asaithamby A** (2019) Mechanistic link between DNA damage sensing, repairing and signaling factors and immune signaling. *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology*, **115**: 297-324, doi: 10.1016/bs.apcsb.2018.11.004
193. **Kondo T, Kobayashi J, Saitoh T, Maruyama K, Ishii KJ, Barber GN, Komatsu K, Akira S, Kawai T** (2013) DNA damage sensor MRE11 recognizes cytosolic double-stranded DNA and induces type

- I interferon by regulating STING trafficking. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, **110** (8): 2969-2974, doi: 10.1073/pnas.1222694110
194. **Liu Y**, Burness ML, Martin-Trevino R, Guy J, Bai S, Harouaka R, Brooks MD, Shang L, Fox A, Luther TK, Davis A, Baker TL, Colacino J, Clouthier SG, Shao Z, Wicha MS, Liu S (2017) RAD51 Mediates Resistance of Cancer Stem Cells to PARP Inhibition in Triple-Negative Breast Cancer. *Clinical Cancer Research*, **23** (2): 514-522, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-15-1348
195. **Saleh R**, Toor SM, Khalaf S, Elkord E (2019) Breast Cancer Cells and PD-1/PD-L1 Blockade Upregulate the Expression of PD-1, CTLA-4, TIM-3 and LAG-3 Immune Checkpoints in CD4⁺ T Cells. *Vaccines*, **7** (4): 149, doi: 10.3390/vaccines7040149
196. **Soteriou D**, Fuchs Y (2018) A matter of life and death: stem cell survival in tissue regeneration and tumour formation. *Nature Reviews Cancer*, **18** (13): 187-201, doi: 10.1038/nrc.2017.122
197. **Noordermeer SM**, van Attikum H (2019) PARP Inhibitor Resistance: A Tug-of-War in BRCA-Mutated Cells. *Trends in Cell Biology*, **29** (10): 820-834, doi: 10.1016/j.tcb.2019.07.008
198. **Bao S**, Wu Q, McLendon RE, Hao Y, Shi Q, Hjelmeland AB, Dewhirst MW, Bigner DD, Rich JN (2006) Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature*, **444** (7120): 756-760, doi: 10.1038/nature05236
199. **Desai A**, Webb B, Gerson SL (2014) CD133+ cells contribute to radioresistance via altered regulation of DNA repair genes in human lung cancer cells. *Radiotherapy and Oncology*, **110** (3): 538-545, doi: 10.1016/j.radonc.2013.10.040
200. **Ma F**, Li H, Wang H, Shi Y, Fan Y, Ding X, Lin C, Zhan Q, Qian H, Xu B (2014) Enriched CD44(+)/CD24(-) population drives the aggressive phenotypes presented in triple-negative breast cancer (TNBC). *Cancer Letters*, **353** (2): 153-159, doi: 10.1016/j.canlet.2014.06.022
201. **Morata-Tarifa C**, Jiménez G, García MA, Entrena JM, Grinán-Lisón C, Aguilera M, Picon-Ruiz M, Marchal JA (2016) Low adherent cancer cell subpopulations are enriched in tumorigenic and metastatic epithelial-to-mesenchymal transition-induced cancer stem-like cells. *Scientific Reports*, **6** (18772): 1-13, doi: 10.1038/srep18772
202. **Abad E**, Graifer D, Lyakhovich A (2020) DNA damage response and resistance of cancer stem cells. *Cancer Letters*, **474**: 106-117, doi: 10.1016/j.canlet.2020.01.008
203. **Schulz A**, **Meyer F**, Dubrovskaya A, Borgmann K (2019) Cancer Stem Cells and Radioresistance: DNA Repair and Beyond. *Cancers (Basel)*, **11** (6): 862, doi: 10.3390/cancers11060862
204. **Meacham CE**, **Morrison SJ** (2013) Tumour heterogeneity and cancer cell plasticity. *Nature*, **501** (7467): 328-337, doi: 10.1038/nature12624
205. **Bonnet D**, **Dick JE** (1997) Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nature Medicine*, **3** (7): 730-737, doi: 10.1038/nm0797-730
206. **Rahman A**, Saha SK, Rahman S, Uddin J, Uddin S, Pang M-G, Rhim H, Cho S-G (2020) Molecular Insights Into Therapeutic Potential of Autophagy Modulation by Natural Products for Cancer Stem Cells. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, **8** (283): 1-17, doi: 10.3389/fcell.2020.00283
207. **Al-Hajj M**, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF (2003) Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, **100** (7): 3983-3988, doi: 10.1073/pnas.0530291100
208. **Liu G**, Yuan X, Zeng Z, Tunici P, Ng H, Abdulkadir IR, Lu L, Irvin D, Black KL, Yu JS (2006) Analysis of gene expression and chemoresistance of CD133+ cancer stem cells in glioblastoma. *Molecular Cancer*, **5** (67): 1-12, doi: 10.1186/1476-4598-5-67
209. **Monzani E**, Facchetti F, Galmozzi E, Corsini E, Benetti A, Cavazzini C, Gritti A, Piccinini A, Porro D, Santinami M, Invernici G, Parati E, Alessandri G, La Porta CAM (2007) Melanoma contains CD133 and ABCG2 positive cells with enhanced tumorigenic potential. *European Journal of Cancer*, **43** (5): 935-946, doi: 10.1016/j.ejca.2007.01.017
210. **Wang J**, Guo LP, Chen LZ, Zeng YX, Lu SH (2007) Identification of cancer stem cell-like side population cells in human nasopharyngeal carcinoma cell line. *Cancer Research*, **67** (8): 3716-3724, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-4343

211. **Wright** MH, Calcagno AM, Salcido CD, Carlson MD, Ambudkar SV, Varticovski L (2008) Brca1 breast tumors contain distinct CD44+/CD24- and CD133+ cells with cancer stem cell characteristics. *Breast Cancer Research*, **10** (1): R10, doi: 10.1186/bcr1855
212. **Laranjo** M, Carvalho MJ, Serambeque B, Alves A, Marto CM, Silva I, Paiva A, Botelho MF (2020) Obtaining Cancer Stem Cell Spheres from Gynecological and Breast Cancer Tumors. *Journal of Visualized Experiments*, **157**, doi: 10.3791/60022
213. **Ginestier** C, Hur MH, Charafe-Jauffret E, Monville F, Dutcher J, Brown M, Jacquemier J, Viens P, Kleer CG, Liu S, Schott A, Hayes D, Birnbaum D, Wicha MS, Dontu G (2007) ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome. *Cell Stem Cell*, **1** (5): 555-567, doi: 10.1016/j.stem.2007.08.014
214. **Jiang** F, Qiu Q, Khanna A, Todd NW, Deepak J, Xing L, Wang H, Liu Z, Su Y, Stass SA, Katz RL (2009) Aldehyde dehydrogenase 1 is a tumor stem cell-associated marker in lung cancer. *Molecular Cancer Research*, **7** (3): 330-338, doi: 10.1158/1541-7786.MCR-08-0393
215. **Li** T, Su Y, Mei Y, Leng Q, Leng B, Liu Z, Stass SA, Jiang F (2010) ALDH1A1 is a marker for malignant prostate stem cells and predictor of prostate cancer patients' outcome. *Laboratory Investigation*, **90** (2): 234-244, doi: 10.1038/labinvest.2009.127
216. **Thiery** JP, Acloque H, Huang RYJ, Nieto MA (2009) Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell*, **139** (5): 871-890, doi: 10.1016/j.cell.2009.11.007
217. **Hay** ED (1968) Organization and fine structure of epithelium and mesenchyme in the developing chick embryo. In: Fleischmajer R, Billingham RE, editors. Epithelial-mesenchymal interactions. Baltimore: Williams and Wilkins, 31-55
218. **Hay** ED (1989) Theory for epithelial-mesenchymal transformation based on the "fixed cortex" cell motility model. *Cell Motility and the Cytoskeleton*, **14** (4): 455-457, doi: 10.1002/cm.970140403
219. **Yan** C, Grimm WA, Garner WL, Qin L, Travis T, Tan N, H Y-P (2010) Epithelial to Mesenchymal Transition in Human Skin Wound Healing Is Induced by Tumor Necrosis Factor-alpha through Bone Morphogenic Protein-2. *The American Journal of Pathology*, **176** (5): 2247-2258, doi:102353/qjpath.2010.090048
220. **Grande** MT, Sánchez-Laorden B, López-Blau C, De Frutos CA, Boutet A, Arévalo M, Rowe RG, Weiss SJ, López-Novoa JM, Nieto MA (2015) Snail1-induced partial epithelial-to-mesenchymal transition drives renal fibrosis in mice and can be targeted to reverse established disease. *Nature Medicine*, **21** (9): 989-997, doi: 10.1038/nm.3901
221. **Kalluri** R, **Weinberg** RA (2009) The basics of epithelial-mesenchymal transition. *Journal of Clinical Investigation*, **119** (6): 1420-1428, doi: 10.1172/jci39104
222. **Nieto** MA, Huang RY-J, Jackson RA, Thiery JP (2016) Emt: 2016. *Cell*, **166** (1): 21-45, doi: 10.1016/j.cell.2016.06.028
223. **Abell** AN, **Johnson** GL (2014) Implications of Mesenchymal Cells in Cancer Stem Cell Populations: Relevance to EMT. *Current Pathobiology Reports*, **2** (1): 21-26, doi: 10.1007/s40139-013-0034-7
224. **Kröger** C, Afeyan A, Mraz J, Eaton EN, Reinhardt F, Khodor YL, Thiru P, Bierie B, Ye X, Burge CB, Weinberg RA (2019) Acquisition of a hybrid E/M state is essential for tumorigenicity of basal breast cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, **116** (15): 7353-7362, doi: 10.1073/pnas.1812876116
225. **Tam** WL, **Weinberg** RA (2013) The epigenetics of epithelial-mesenchymal plasticity in cancer. *Nature Medicine*, **19** (11): 1438-1449, doi: 10.1038/nm.3336
226. **Witta** SE, Gemmill RM, Hirsch FR, Coldren CD, Hedman K, Ravdel L, et al. (2006) Restoring E-cadherin expression increases sensitivity to epidermal growth factor receptor inhibitors in lung cancer cell lines. *Cancer Research*, **66** (2): 944-950, doi: 10.1158/0008-5472.can-05-1988
227. **Li** X, Lewis MT, Huang J, Gutierrez C, Osborne CK, Wu MF, et al. (2008) Intrinsic resistance of tumorigenic breast cancer cells to chemotherapy. *Journal of the National Cancer Institute*, **100** (9): 672-679, doi: 10.1093/jnci/djn123

228. **Mathews** LA, Cabarcas SM, Hurt EM, Zhang X, Jaffee EM, Farrar WL (2011) Increased expression of DNA repair genes in invasive human pancreatic cancer cells. *Pancreas*, **40** (5): 730-739, doi: 10.1097/MPA.0b013e31821ae25b
229. **Zhang** M, Behbod F, Atkinson RL, Landis MD, Kittrell F, Edwards D, Medina D, Tsimelzon A, Hilsenbeck S, Green JE, Michalowska AM, Rosen JM (2008) Identification of tumor-initiating cells in a p53-null mouse model of breast cancer. *Cancer Research*, **68** (12): 4674-4682, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-6353
230. **Liu** S, Ginestier C, Charafe-Jauffret E, Foco H, Kleer CG, Merajver SD, Dontu G, Wicha MS (2008) BRCA1 regulates human mammary stem/progenitor cell fate. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, **105** (5): 1680-1685, doi: 10.1073/pnas.0711613105
231. **Kim** H, Qun Lin Q, Yun Z (2019) BRCA1 regulates the cancer stem cell fate of breast cancer cells in the context of hypoxia and histone deacetylase inhibitors. *Scientific Reports*, **9** (9702), doi: 10.1038/s41598-019-46210-y
232. **Bai** F, Chan HL, Scott A, Smith MD, Fan C, Herschkowitz JI, Perou CM, Livingstone AS, Robbins DJ, Capobianco AJ, Pei X-H (2014) BRCA1 Suppresses Epithelial-to-Mesenchymal Transition and Stem Cell Dedifferentiation during Mammary and Tumor Development. *Cancer Research*, **74** (21): 6161-6172, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-14-1119
233. **Gupta** PB, Fillmore CM, Jiang G, Shapira SD, Tao K, Kuperwasser C, Lander ES (2011) Stochastic state transitions give rise to phenotypic equilibrium in populations of cancer cells. *Cell*, **146** (4): 633-644, doi: 10.1016/j.cell.2011.07.026
234. **Buckley** NE, Nic An tSaoir CB, Blayney JK, Oram LC, Crawford NT, D'Costa ZC, Quinn JE, Kennedy RD, Harkin DP, Mullan PB (2013) BRCA1 is a key regulator of breast differentiation through activation of Notch signalling with implications for anti-endocrine treatment of breast cancers. *Nucleic Acids Research*, **41** (18): 8601-8614, doi: 10.1093/nar/gkt626
235. **De Luca** P, Moiola CP, Zalazar F, Gardner K, Vazquez ES, De Siervi A (2013) BRCA1 and p53 regulate critical prostate cancer pathways. *Prostate Cancer and Prostatic Diseases*, **16** (3): 233-238, doi: 10.1038/pcan.2013.12
236. **Yi** YW, Kang HJ, Kim HJ, Hwang JS, Wang A, Bae I (2013) Inhibition of constitutively activated phosphoinositide 3-kinase/AKT pathway enhances antitumor activity of chemotherapeutic agents in breast cancer susceptibility gene 1-defective breast cancer cells. *Molecular Carcinogenesis*, **52** (9): 667-675, doi: 10.1002/mc.21905
237. **Heerma van Voss** MR, van der Groep P, Bart J, van der Wall E, van Diest PJ (2011) Expression of the stem cell marker ALDH1 in BRCA1 related breast cancer. *Cell Oncology (Dordrecht)*, **34** (1): 3-10, doi: 10.1007/s13402-010-0007-3
238. **Pathania** S, Bade S, Guillou ML, Burke K, Reed R, Bowman-Colin C, Su Y, Ting DT, Polyak K, Richardson AL, Feunteun J, Garber JE, Livingston DM (2014) BRCA1 haploinsufficiency for replication stress suppression in primary cells. *Nature Communications*, **5** (5496): 1-15, doi: 10.1038/ncomms6496
239. **Soule** HD, Vazquez J, Long A, Albert S, Brennan M (1973) A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *Journal of the National Cancer Institute*, **51** (5): 1409-1416, doi: 10.1093/jnci/51.5.1409
240. **Gazdar** AF, Kurvari V, Virmani A, Gollahon L, Sakaguchi M, Westerfield M, Kodagoda D, Stasny V, Cunningham HT, Wistuba II, Tomlinson G, Tonk V, Ashfaq R, Leitch AM, Minna JD, Shay JW (1998) Characterization of paired tumor and non-tumor cell lines established from patients with breast cancer. *International Journal of Cancer*, **78** (6): 766-774, doi: 10.1002/(sici)1097-0215(19981209)78:6<766::aid-ijc15>3.0.co;2-l
241. **Sanger** F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, **74** (12): 5463-5467, doi: 10.1073/pnas.74.12.5463
242. Masterarbeit **Isabell Vetterlein** (2016) Hypermutatoren und Fehlerkatastrophe in humanen Zelllinien.

243. **Warren AJ**, Maccubbin AE, Hamilton JW (1998) Detection of mitomycin C-DNA adducts in vivo by 32P-postlabeling: time course for formation and removal of adducts and biochemical modulation. *Cancer Research*, **58** (3): 453-461
244. **Palom Y**, Belcourt MF, Musser SM, Sartorelli AC, Rockwell S, Tomasz M (2000) Structure of adduct X, the last unknown of the six major DNA adducts of mitomycin C formed in EMT6 mouse mammary tumor cells. *Chemical Research in Toxicology*, **13** (6): 479-488, doi: 10.1021/tx000024j
245. **Borrego-Soto G**, Ortiz-López R, Rojas-Martínez A (2015) Ionizing radiation-induced DNA injury and damage detection in patients with breast cancer. *Genetics and Molecular Biology*, **38** (4): 420-432, doi: 10.1590/S1415-475738420150019
246. **Pfaffl MW** (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, **29** (9): 2002-2007, doi: 10.1093/nar/29.9.e45
247. **Morrison T**, Weis JJ, Wittwer CT (1998) Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification. *BioTechniques*, **24** (6): 954-962
248. **Karnan S**, Mohseni M, Konishi Y, Tamaki A, Hosokawa Y, Park BH, Konishi H (2010) Controversial *BRCA1* allelotypes in commonly used breast cancer cell lines. *Breast Cancer Research and Treatment*, **119** (1): 249-251, doi: 10.1007/s10549-009-0465-3
249. **Ran FA**, Hsu PD, Wright J, Agarwala V, Scott DA, Feng Zhang (2013) Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nature Protocols*, **8** (11): 2281-2308, doi: 10.1038/nprot.2013.143
250. **Chen J**, Silver DP, Walpita D, Cantor SB, Gazdar AF, Tomlinson G, Couch FJ, Weber BL, Ashley T, Livingston DM, Scully R (1998) Stable interaction between the products of the *BRCA1* and *BRCA2* tumor suppressor genes in mitotic and meiotic cells. *Molecular Cell*, **2** (3): 317-328, doi: 10.1016/s1097-2765(00)80276-2
251. **Lundin C**, Schultz N, Arnaudeau C, Mohindra A, Hansen LT, Helleday T (2003) RAD51 is Involved in Repair of Damage Associated with DNA Replication in Mammalian Cells. *Journal of Molecular Biology*, **328** (3): 521-535; doi: 10.1016/s0022-2836(03)00313-9
252. **Rogakou EP**, Pilch DR, Orr A H, Ivanova VS, Bonner WM (1998) DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *Journal of Biological Chemistry*, **273** (10): 5858-5868, doi: 10.1074/jbc.273.10.5858
253. **Chan KL**, North PS, Hickson ID (2007) BLM is required for faithful chromosome segregation and its localization defines a class of ultrafine anaphase bridges. *The EMBO Journal*, **26** (14): 3397-3409, doi: 10.1038/sj.emboj.7601777
254. **von Ledebur M**, **Schmid W** (1973) The micronucleus test. Methodological aspects. *Mutation Research*, **19** (1): 109-117, doi: 10.1016/0027-5107(73)90118-8
255. **Barr AR**, Cooper S, Heldt FS, Butera F, Stoy H, Mansfeld J, Novák B, Bakal C (2009) DNA damage during S-phase mediates the proliferation-quiescence decision in the subsequent G1 via p21 expression. *Nature Communications*, **8** (14728): 1-17, doi: 10.1038/ncomms14728
256. **Chao HX**, Poovey CE, Privette AA, Grant GD, Chao HY, Cook JG, Purvis JE (2017) Orchestration of DNA Damage Checkpoint Dynamics across the Human Cell Cycle. *Cell Systems*, **5** (5): 445-459, doi: 10.1016/j.cels.2017.09.015
257. Masterarbeit **Sandra Classen** (2019) Einfluss der *BRCA1* Reduktion auf die Funktionalität der Homologen Rekombination und das zelluläre Überleben nach induzierter DNA-Schädigung in einem isogenen Zellsystem.
258. **Moynahan ME**, Cui TY, Jasin M (2001) Homology-directed DNA repair, mitomycin-c resistance, and chromosome stability is restored with correction of a *BRCA1* mutation. *Cancer Research*, **61** (12): 4842-4850
259. **Pierce AJ**, Johnson RD, Thompson LH, Jasin M (1999) XRCC3 promotes homology-directed repair of DNA damage in mammalian cells. *Genes & Development*, **13** (20): 2633-2638, doi: 10.1101/gad.13.20.2633
260. **Mansour WY**, Schumacher S, Roskopf R, Rhein T, Schmidt-Petersen F, Gatzemeier F, Haag F, Borgmann K, Willers H, Dahm-Daphi J (2008) Hierarchy of nonhomologous end-joining, single-strand annealing and gene conversion at site-directed DNA double-strand breaks. *Nucleic Acids Research*, **36** (12): 4088-4098, doi: 10.1093/nar/gkn347

261. **Meyer F, Becker S, Classen S, Parpys AC, Mansour WY, Riepen R, Timm S, Ruebe C, Jasin M, Wikman H, Petersen C, Rothkamm K, Borgmann K** (2020) Prevention of DNA Replication Stress by CHK1 Leads to Chemoresistance Despite a DNA Repair Defect in Homologous Recombination in Breast Cancer. *Cells*, **9** (1): 238, doi: 10.3390/cells9010238
262. **Tomasz M, Palom Y** (1997) The mitomycin bio-reductive antitumor agents: cross-linking and alkylation of DNA as the molecular basis of their activity. *Pharmacology and Therapeutics*, **76** (1-3): 73-87, doi: 10.1016/s0163-7258(97)00088-0
263. **Cortés A, Cascante M, Cárdenas ML, Cornish-Bowden A** (2001) Relationships Between Inhibition Constants, Inhibitor Concentrations for 50% Inhibition and Types of Inhibition: New Ways of Analysing Data. *Biochemical Journal*, **357** (Pt 1): 263-268, doi: 10.1042/0264-6021:3570263
264. **Pfeiffer P, Goedecke W, Obe G** (2000) Mechanisms of DNA double-strand break repair and their potential to induce chromosomal aberrations. *Mutagenesis*, **15** (4): 289-302, doi: 10.1093/mutage/15.4.289
265. **Santisteban M, Reiman JM, Asiedu MK, Behrens MD, Nassar A, Kalli KR, Haluska P, Ingle JN, Hartmann LC, Manjili MH, Radisky DC, Ferrone S, Knutson KL** (2009) Immune-induced epithelial to mesenchymal transition *in vivo* generates breast cancer stem cells. *Cancer Research*, **69** (7): 2887-2895, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-3343
266. **Yang J, Mani SA, Donaher JL, Ramaswamy S, Itzykson RA, Come C, Savagner P, Gitelman I, Richardson A, Weinberg RA** (2004) Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis. *Cell*, **117** (7): 927-939, doi: 10.1016/j.cell.2004.06.006
267. **Liu S, Cong Y, Wang D, Sun Y, Deng L, Liu Y, Martin-Trevino R, Shang L, McDermott SP, Landis MD, Hong S, Adams A, D'Angelo R, Ginestier C, Charafe-Jauffret E, Clouthier SG, Birnbaum D, Wong ST, Zhan M, Chang JC, Wicha MS** (2014) Breast cancer stem cells transition between epithelial and mesenchymal states respective of their normal counterparts. *Stem Cell Reports*, **2** (1): 78-91, doi: 10.1016/J.STEMCR.2013.11.009
268. **Behrens J, Mareel MM, Van Roy FM, Birchmeier W** (1989) Dissecting Tumor Cell Invasion: Epithelial Cells Acquire Invasive Properties after the Loss of Uvomorulin-mediated Cell-Cell Adhesion. *The Journal of Cell Biology*, **108** (6): 2435-2447, doi: 10.1083/jcb.108.6.2435
269. **Zhang P, Wei Y, Wang L, Debeb BG, Yuan Y, Zhang J, Yuan J, Wang M, Chen D, Sun Y, Woodward WA, Liu Y, Dean DC, Liang H, Hu Y, Ang KK, Hung M-C, Chen J, Ma L** (2014) ATM-mediated stabilization of ZEB1 promotes DNA damage response and radioresistance through CHK1. *Nature Cell Biology*, **16** (9): 864-875, doi: 10.1038/ncb3013
270. **Kishimoto T** (1989) The biology of interleukin-6. *Blood*, **74** (1): 1-10, doi: 10.1182/blood.V74.1.1.1
271. **Kumar A, Humphreys TD, Kremer KN, Bramati PS, Bradfield L, Edgar CE, Hedin KE** (2006) CXCR4 physically associates with the T cell receptor to signal in T cells. *Immunity*, **25** (2): 213-224, doi: 10.1016/j.immuni.2006.06.015
272. **Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, Kaisho T, Sato S, Sanjo H, Matsumoto M, Hoshino K, Wagner H, Takeda K, Akira S** (2000) A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature*, **408** (6813): 740-745, doi: 10.1038/35047123
273. **Lafta IJ, Alkaabawi NAM** (2018) BRCA1 is Overexpressed in Breast Cancer Cell Lines and is Negatively Regulated by E2F6 in Normal but not Cancerous Breast Cells. *Journal of Pharmaceutical, Chemical and Biological Sciences*, **5** (4): 289-296
274. **Feng W, Jasin M** (2017) BRCA2 suppresses replication stress-induced mitotic and G1 abnormalities through homologous recombination. *Nature Communications*, **8** (525): 1-15, doi: 10.1038/s41467-017-00634-0
275. **Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E** (2012) A programmable dual RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, **337** (6096): 816-821, doi: 10.1126/science.1225829
276. **Hill SJ, Clark AP, Silver DP, Livingston DM** (2014) BRCA1 Pathway Function in Basal-Like Breast Cancer Cells. *Molecular and Cellular Biology*, **34** (20): 3828-3842, doi: 10.1128/MCB.01646-13

277. **Wiegman** AP, Miranda M, Wen SW, Al-Ejeh F, Möller A (2016) RAD51 inhibition in triple negative breast cancer cells is challenged by compensatory survival signaling and requires rational combination therapy. *Oncotarget*, **7** (37): 60087-60100, doi: 10.18632/oncotarget.11065
278. **Wiegman** AP, Al-Ejeh F, Chee N, Yap P-Y, Gorski JJ, Da Silva L, Bolderson E, Chenevix-Trench G, Anderson R, Simpson PT, Lakhani SR, Khanna KK (2014) Rad51 supports triple negative breast cancer metastasis. *Oncotarget*, **5** (10): 3261-3272, doi: 10.18632/oncotarget.1923
279. **Promkan** M, Liu G, Patmasiriwat P, Chakrabarty S (2009) BRCA1 modulates malignant cell behavior, the expression of survivin and chemosensitivity in human breast cancer cells. *International Journal of Cancer*, **125** (12): 2820-2828, doi: 10.1002/ijc.24684
280. **Karaayvaz-Yildirim** M, Silberman RE, Langenbucher A, Saladi SV, Ross KN, Zarcaro E, Desmond A, Yildirim M, Vivekanandan V, Ravichandran H, Mylavagnanam R, Specht MC, Ramaswamy S, Lawrence M, Amon A, Ellisen LW (2020) Aneuploidy and a deregulated DNA damage response suggest haploinsufficiency in breast tissues of *BRCA2* mutation carriers. *Science Advances*, **6** (eaay2611): 1-10, doi: 10.1126/sciadv.aay2611
281. **De Talhouet** S, Peron J, Vuilleumier A, Friedlaender A, Viassolo V, Ayme A, Bodmer A, Treilleux I, Lang N, Tille J-C, Chappuis PO, Buisson A, Giraud S, Lasset C, Bonadona V, Trédan O, Labidi-Galy SI (2020) Clinical outcome of breast cancer in carriers of *BRCA1* and *BRCA2* mutations according to molecular subtypes. *Scientific Reports*, **10** (1): 7073, doi: 10.1038/s41598-020-63759-1
282. **Dosil** V, Tosar A, Canadas C, Pérez-Segura P, Díaz-Rubio E, Caldés T, de la Hoya M (2010) Alternative Splicing and Molecular Characterization of Splice Site Variants: *BRCA1* c.591C>T as a Case Study. *Clinical Chemistry*, **56** (1): 53-61, doi: 10.1373/clinchem.2009.132274
283. **Ozcelik** H, Nedelcu R, Chan VW, Shi XH, Murphy J, Rosen B, Andrulis IL (1999) Mutation in the coding region of the *BRCA1* gene leads to aberrant splicing of the transcript. *Human Mutation*, **14** (6): 540-541, doi: 10.1002/(SICI)1098-1004(199912)14:6<540::AID-HUMU13>3.0.CO;2-C
284. **Xu** X, Wagner KU, Larson D, Weaver Z, Li C, Ried T, Hennighausen L, Wynshaw-Boris A, Deng CX (1999) Conditional mutation of *Brca1* in mammary epithelial cells results in blunted ductal morphogenesis and tumour formation. *Nature Genetics*, **22** (1): 37-43, doi: 10.1038/8743
285. **Xu** X, Qiao W, Linke SP, Cao L, Li WM, Furth PA, Harris CC, Deng CX (2001) Genetic interactions between tumor suppressors *Brca1* and *p53* in apoptosis, cell cycle and tumorigenesis. *Nature Genetics*, **28** (3): 266-271, doi: 10.1038/90108
286. **Scully** R, Chen J, Plug A, Xiao Y, Weaver D, Feunteun J, Ashley T, Livingston DM (1997) Association of *BRCA1* with *Rad51* in mitotic and meiotic cells. *Cell*, **88** (2): 265-275, doi: 10.1016/S0092-8674(00)81847-4
287. Datenbank ARUP (<https://arup.utah.edu/database/BRCA/Variants/BRCA1.php>) siehe Exon 9
288. Datenbank ARUP (<https://arup.utah.edu/database/BRCA/Variants/BRCA1.php>) siehe Exon 14
289. **Kais** Z, Rondinelli B, Holmes A, O'Leary C, Kozono D, D'Andrea AD, Ceccaldi R (2016) *FANCD2* Maintains Fork Stability in *BRCA1/2*-Deficient Tumors and Promotes Alternative End-Joining DNA Repair. *Cell Reports*, **15** (11): 2488-2499, doi: 10.1016/j.celrep.2016.05.031
290. **Min** D-J, He S, Green JE (2016) Birinapant (TL32711) Improves Responses to GEM/AZD7762 Combination Therapy in Triple-negative Breast Cancer Cell Lines. *Anticancer Research*, **36** (6): 2649-2657
291. **Martin** RW, Orelli BJ, Yamazoe M, Minn AJ, Takeda S, Bishop DK (2007) *RAD51* up-regulation bypasses *BRCA1* function and is a common feature of *BRCA1*-deficient breast tumors. *Cancer Research*, **67** (20): 9658-9665, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-0290
292. **Maacke** H, Opitz S, Jost K, Hamdorf W, Henning W, Krüger S, Feller AC, Lopens A, Diedrich K, Schwinger E, Stürzbecher H-W (2000) Over-expression of wild-type *Rad51* correlates with histological grading of invasive ductal breast cancer. *International Journal of Cancer*, **88** (6): 907-913, doi: 10.1002/1097-0215(20001215)88:6<907::aid-ijc11>3.0.co;2-4
293. **Parplys** AC, Seelbach JI, Becker S, Behr M, Wrona A, Jend C, Mansour WY, Joosse SA, Stürzbecher H-W, Pospiech H, Petersen C, Dikomey E, Borgmann K (2015) High levels of *RAD51* perturb DNA

- replication elongation and cause unscheduled origin firing due to impaired CHK1 activation. *Cell Cycle*, **14** (19): 3190-3202, doi: 10.1080/15384101.2015.1055996
294. **Nijman SM**, Huang TT, Dirac AM, Brummelkamp TR, Kerkhoven RM, D'Andrea AD, Bernards R (2005) The deubiquitinating enzyme USP1 regulates the Fanconi anemia pathway. *Molecular Cell*, **17** (3): 331-339, doi: 10.1016/j.molcel.2005.01.008
295. **Guervilly JH**, Macé-Aimé G, Rosselli F (2008) Loss of CHK1 function impedes DNA damage-induced FANCD2 monoubiquitination but normalizes the abnormal G2 arrest in Fanconi anemia. *Human Molecular Genetics*, **17** (5): 679-689, doi: 10.1093/hmg/ddm340
296. **Zhi G**, Wilson JB, Chen X, Krause DS, Xiao Y, Jones NJ, Kupfer GM (2009) Fanconi Anemia Complementation Group FANCD2 Protein Serine 331 Phosphorylation Is Important for Fanconi Anemia Pathway Function and BRCA2 Interaction. *Cancer Research*, **69** (22): 8775-8783, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-2312
297. **Chan KL**, Palmai-Pallag T, Ying S, Hickson ID (2009) Replication stress induces sister-chromatid bridging at fragile site loci in mitosis. *Nature Cell Biology*, **11** (6): 753-760, doi: 10.1038/ncb1882
298. **Vandenberg CJ**, Gergely F, Ong CY, Pace P, Mallery DL, Hiom K, Patel KJ (2003) BRCA1-Independent Ubiquitination of FANCD2. *Molecular Cell*, **12** (1): 247-254, doi: 10.1016/s1097-2765(03)00281-8
299. **Lukas J**, Lukas C, Bartek J (2011) More than just a focus: the chromatin response to DNA damage and its role in genome integrity maintenance. *Nature Cell Biology*, **13** (10): 1161-1169, doi: 10.1038/ncb2344
300. **Zámborszky J**, Szikriszt B, Gervai JZ, Pipek O, Póti Á, Krzystanek M, Ribli D, Szalai-Gindl JM, Csabai I, Szallasi Z, Swanton C, Richardson AL, Szüts D (2017) Loss of BRCA1 or BRCA2 markedly increases the rate of base substitution mutagenesis and has distinct effects on genomic deletions. *Oncogene*, **36** (6): 746-755, doi: 10.1038/onc.2016.243
301. **Drew Y**, Mulligan EA, Vong W-T, Thomas HD, Kahn S, Kyle S, Mukhopadhyay A, Los G, Hostomsky Z, Plummer ER, Edmondson RJ, Curtin NJ (2010) Therapeutic Potential of Poly(ADP-ribose) Polymerase Inhibitor AG014699 in Human Cancers With Mutated or Methylated *BRCA1* or *BRCA2*. *Journal of the National Cancer Institute*, **103** (4), doi: 10.1093/jnci/djq509
302. **Mijic S**, Zellweger R, Chappidi N, Berti M, Jacobs K, Mutreja K, Ursich S, Chaudhuri AR, Nussenzweig A, Janscak P, Lopes M (2017) Replication fork reversal triggers fork degradation in BRCA2- defective cells. *Nature Communications*, **8** (859): 1-11, doi: 10.1038/s41467-017-01164-5
303. **Krum SA**, de la Rosa Dalugdugan E, Miranda-Carboni GA, Lane TF (2010) BRCA1 Forms a Functional Complex with γ -H2AX as a Late Response to Genotoxic Stress. *Journal of Nucleic Acids*, **2010** (801594): 1-9, doi: 10.4061/2010/801594
304. **Sørensen CS**, Hansen LT, Dziegielewski J, Syljuasen RG, Lundin C, Bartek J, Helleday T (2005) The cell-cycle checkpoint kinase Chk1 is required for mammalian homologous recombination repair. *Nature Cell Biology*, **7** (2): 195-201, doi: 10.1038/ncb1212
305. **Saada AA**, Teixeira-Silva A, Iraqui I, Costes A, Hardy J, Paoletti G, Fréon K, Lambert SAE (2017) Unprotected Replication Forks Are Converted into Mitotic Sister Chromatid Bridges. *Molecular Cell*, **66** (3): 398-410, doi: 10.1016/j.molcel.2017.04.002
306. **Lukas C**, Savic V, Bekker-Jensen S, Doil C, Neumann B, Pedersen RS, Grøfte M, Chan KL, Hickson ID, Barekt J, Lukas J (2011) 53BP1 nuclear bodies form around DNA lesions generated by mitotic transmission of chromosome under replication stress. *Nature Cell Biology*, **13** (3): 243-253, doi: 10.1038/ncb2201
307. **Bennani-Belhaj KL**, Rouzeau S, Buhagiar-Labarchède G, Chabosseu P, Onclercq-Delic R, Bayart E, Cordelières F, Couturier J, Amor-Guélet M (2010) The Bloom syndrome protein limits the lethality associated with RAD51 deficiency. *Molecular Cancer Research*, **8** (3): 385-394, doi: 10.1158/1541-7786.MCR-09-0534
308. **Laulier C**, Cheng A, Stark JM (2011) The relative efficiency of homology-directed repair has distinct effects on proper anaphase chromosome separation. *Nucleic Acids Research*, **39** (14): 5935-5944, doi: 10.1093/nar/gkr187

309. **Müller** WU, Nüsse M, Miller BM, Slavotinek A, Viaggi S, Streffer C (1996) Micronuclei: a biological indicator of radiation damage. *Mutation Research*, **366** (2): 163-169, doi: 10.1016/S0165-1110(96)90037-8
310. **Crasta** K, Ganem NJ, Dagher R, Lantermann AB, Ivanova EV, Pan Y, Nezi L, Protopopov A, Chowdhury D, Pellman D (2012) DNA breaks and chromosome pulverization from errors in mitosis. *Nature*, **482** (7383): 53-58, doi: 10.1038/nature10802
311. **Jdey** W, Thierry S, Popova T, Stern M-H, Dutreix M (2017) Micronuclei Frequency in Tumors Is a Predictive Biomarker for Genetic Instability and Sensitivity to the DNA Repair Inhibitor AsiDNA. *Cancer Research*, **77** (16): 4207-4216, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-16-2693
312. **Feijoo** C, Hall-Jackson C, Wu R, Jenkins D, Leitch J, Gilbert DM, Smythe C (2001) Activation of mammalian Chk1 during DNA replication arrest: a role for Chk1 in the intra-S phase checkpoint monitoring replication origin firing. *Journal of Cell Biology*, **154** (5): 913-924, doi: 10.1083/jcb.200104099
313. **O'Connell** MJ, Raleigh JM, Verkade HM, Nurse P (1997) Chk1 is a wee1 kinase in the G2 DNA damage checkpoint inhibiting cdc2 by Y15 phosphorylation. *The EMBO Journal*, **16** (3): 545-554, doi: 10.1093/emboj/16.3.545
314. **Yarden** RI, Metsuyanin S, Pickholtz I, Shabbeer S, Tellio H, Papa MZ (2012) BRCA1-Dependent Chk1 Phosphorylation Triggers Partial Chromatin Disassociation of Phosphorylated Chk1 and Facilitates S-Phase Cell Cycle Arrest. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, **44** (11): 1761-1769, doi: 10.1016/j.biocel.2012.06.026
315. **Annab** AL, Hawkins R, Solomon G, Barrett JC, Afshari CA (2000) Increased cell survival by inhibition of BRCA1 using an antisense approach in an estrogen responsive ovarian carcinoma cell line. *Breast Cancer Research*, **2** (2): 139-148, doi: 10.1186/bcr45
316. **Orban** TI, **Olah** E (2001) Expression Profiles of BRCA1 Splice Variants in Asynchronous and in G1/S Synchronized Tumor Cell Lines. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **280** (1): 32-38, doi: 10.1006/bbrc.2000.4068
317. **Maniccia** AW, Lewis C, Begum N, Xu J, Cui J, Chipitsyna G, Aysola K, Reddy V, Bhat G, Fujimura Y, Henderson B, Reddy ES, Rao VN (2009) Mitochondrial localization, ELK-1 transcriptional regulation and growth inhibitory functions of BRCA1, BRCA1a, and BRCA1b proteins. *Journal of Cellular Physiology*, **219** (3): 634-641, doi: 10.1002/jcp.21708
318. **Beckta** JM, Dever SM, Gnawali N, Khalil A, Sule A, Golding SE, Rosenberg E, Narayanan A, Kehn-Hall K, Xu B, Povirk LF, Valerie K (2015) Mutation of the BRCA1 SQ-cluster results in aberrant mitosis, reduced homologous recombination, and a compensatory increase in non-homologous end joining. *Oncotarget*, **6** (29): 27674-27687, doi: 10.18632/oncotarget.4876
319. **Gudas** JM, Li T, Nguyen H, Jensen D, Rauscher III FJ, Cowan KH (1996) Cell cycle regulation of BRCA1 messenger RNA in human breast epithelial cells. *Cell Growth & Differentiation*, **7** (6): 717-723
320. **Kaneko** YS, Watanabe N, Morisaki H, Akita H, Fujimoto A, Tominaga K, Terasawa M, Tachibana A, Ikeda K, Nakanishi M (1999) Cell-cycle-dependent and ATM-independent expression of human Chk1 kinase. *Oncogene*, **18** (25): 3673-3681, doi: 10.1038/sj.onc.1202706
321. **Yamamoto** A, Taki T, Yagi H, Habu T, Yoshida K, Yoshimura Y, Yamamoto K, Matsushiro A, Nishimune Y, Morita T (1996) Cell cycle-dependent expression of the mouse RAD51 gene in proliferating cells. *Molecular Genetics and Genomics*, **251** (1): 1-12, doi: 10.1007/BF02174338
322. **Aprelikova** ON, Fang BS, Meissner EG, Cotter S, Campbell M, Kuthiala A, Bessho M, Jensen RA, Liu ET (1999) BRCA1-associated growth arrest is RB-dependent. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, **96** (21): 11866-11871, doi: 10.1073/pnas.96.21.11866
323. **Stecklein** SR, Kumaraswamy E, Behbod F, Wang W, Chaguturu V, Harlan-Williams LM, Jensen RA (2012) BRCA1 and HSP90 cooperate in homologous and non-homologous DNA double-strand-break repair and G2/M checkpoint activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, **109** (34): 13650-13655, doi: 10.1073/pnas.1203326109
324. **Yun** J, Zhong Q, Kwak J-Y, Lee W-H (2005) Hypersensitivity of Brca1-deficient MEF to the DNA interstrand crosslinking agent mitomycin C is associated with defect in homologous

- recombination repair and aberrant S-phase arrest. *Oncogene*, **24** (25): 4009-4016, doi: 10.1038/sj.onc.1208575
325. **Nakada S**, Yonamine RM, Matsuo K (2012) RNF8 Regulates Assembly of RAD51 at DNA Double-Strand Breaks in the Absence of BRCA1 and 53BP1. *Cancer Research*, **72** (19): 4974-4983, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-12-1057
326. Dissertation **Felix Meyer** (2019) Die Funktionen der Homologen Rekombination und die Bedeutung der S-Phase Schadensantwort in humanen Zelllinien des Triple-negativen Mammakarzinoms.
327. **Scully R**, Ganesan S, Vlasakova K, Chen J, Socolovsky M, Livingston DM (1999) Genetic Analysis of BRCA1 Function in a Defined Tumor Cell Line. *Molecular Cell*, **4** (6): 1093-1099, doi: 10.1016/s1097-2765(00)80238-5
328. **Schlegel BP**, Jodelka FM, Nunez R (2006) BRCA1 promotes induction of ssDNA by ionizing radiation. *Cancer Research*, **66** (10): 5181-5189, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-3209
329. **Bunting SF**, Callén E, Kozak ML, Kim JM, Wong N, López-Contreras AJ, Ludwig T, Baer R, Faryabi RB, Malhowski A, Chen H-T, Fernandez-Capetillo O, D'Andrea A, Nussenzweig A (2012) BRCA1 Functions Independently of Homologous Recombination in DNA Interstrand Crosslink Repair. *Molecular Cell*, **46** (2): 125-135, doi: 10.1016/j.molcel.2012.02.015
330. **Foo TK**, Tischkowitz M, Simhadri S, Boshari T, Zayed N, Burke KA, Berman SH, Bleucia P, Riaz N, Huo Y, Ding YC, Neuhausen SL, Weigelt B, Reis-Filho JS, Foulkes WD, Xia B (2017) Compromised BRCA1-PALB2 interaction is associated with breast cancer risk. *Oncogene*, **36** (29): 4161-4170, doi: 10.1038/onc.2017.46
331. **Benning V**, Depasse F, Melcion C, Cordier A (1992) Detection of micronuclei after exposure to mitomycin C, cyclophosphamide and diethylnitrosamine by the in vivo micronucleus test in mouse splenocytes. *Mutation Research/Genetic Toxicology*, **280** (2): 137-142, doi: 10.1016/0165-1218(92)90009-o
332. **Fischer WH**, Keiwan A, Schmitt E, Stopper H (2001) Increased formation of micronuclei after hormonal stimulation of cell proliferation in human breast cancer cells. *Mutagenesis*, **16** (3): 209-212, doi: 10.1093/mutage/16.3.209
333. **Bhattacharyya A**, Ear US, Koller BH, Weichselbaum RR, Bishop DK (2000) The breast cancer susceptibility gene BRCA1 is required for subnuclear assembly of RAD51 and survival following treatment with the DNA cross-linking agent cisplatin. *Journal of Biological Chemistry*, **275** (31): 23899-23903, doi: 10.1074/jbc.C000276200
334. **Sato K**, Shimomuki M, Katsuki Y, Takahashi D, Kobayashi W, Ishiai M, Miyoshi H, Takata M, Kurumizaka H (2016) FANCI-FANCD2 stabilizes the RAD51-DNA complex by binding RAD51 and protects the 5'-DNA end. *Nucleic Acids Research*, **44** (22): 10758-10771, doi: 10.1093/nar/gkw876
335. **Cousineau I**, **Belmaaza A** (2007) BRCA1 Haploinsufficiency, but not Heterozygosity for a BRCA1-truncating Mutation, Deregulates Homologous Recombination. *Cell Cycle*, **6** (8): 962-971, doi: 10.4161/cc.6.8.4105
336. **Pierce A**, McGowan PM, Cotter M, Mullooly M, O'Donovan N, Rani S, O'Driscoll L, Crown J, Duffy MJ (2013) Comparative antiproliferative effects of iniparib and olaparib on a panel of triple-negative and non-triple-negative breast cancer cell lines. *Cancer Biology & Therapy*, **14** (6): 537-545, doi: 10.4161/cbt.24349
337. **Nacson J**, Krais JJ, Bernhardt AJ, Clausen E, Feng W, Wang Y, Nicolas E, Cai KQ, Tricarico R, Hua X, DiMarcantonio D, Martinez E, Zong D, Handorf EA, Bellacosa A, Testa JR, Nussenzweig A, Gupta GP, Sykes SM, Johnson N (2018) BRCA1 Mutation-Specific Responses to 53BP1 Loss-Induced Homologous Recombination and PARP Inhibitor Resistance. *Cell Reports*, **24** (13): 3513-3527, doi: 10.1016/j.celrep.2018.08.086
338. **Bouwman P**, Aly A, Escandell JM, Pieterse M, Bartkova J, van der Gulden H, Hiddingh S, Thanasoula M, Kulkarni A, Yang Q, Haffty BG, Tommiska J, Blomqvist C, Drapkin R, Adams DJ, Nevanlinna H, Bartek J, Tarsounas M, Ganesan S, Jonkers J (2010) 53BP1 loss rescues BRCA1

- deficiency and is associated with triple-negative and BRCA-mutated breast cancers. *Nature Structural and Molecular Biology*, **17** (6): 688-695, doi: 10.1038/nsmb.1831
339. **Bunting** SF, Callén E, Wong N, Chen H-T, Polato F, Gunn A, Bothmer A, Feldhahn N, Fernandez-Capetillo O, Cao L, Xu X, Deng C-X, Finkel T, Nussenzweig M, Stark JM, Nussenzweig A (2010) 53BP1 inhibits homologous recombination in Brca1-deficient cells by blocking resection of DNA breaks. *Cell*, **141** (2): 243-254, doi: 10.1016/j.cell.2010.03.012
340. **Wang** Y, Bernhardt AJ, Nacson J, Kraiss JJ, Tan Y-F, Nicolas E, Radke MR, Handorf E, Llop-Guevara A, Balmaña J, Swisher EM, Serra V, Peri S, Johnson N (2019) BRCA1 intronic Alu elements drive gene rearrangements and PARP inhibitor resistance. *Nature Communications*, **10** (1): 5661, doi: 10.1038/s41467-019-13530-6
341. **Yazinski** SA, Comaills V, Buisson R, Genoie M-M, Nguyen HD, Ho CK, Kwan TT, Morris R, Lauffer S, Nussenzweig A, Ramaswamy S, Benes CH, Haber DA, Maheswaran S, Birrer MJ, Zou L (2017) ATR inhibition disrupts rewired homologous recombination and fork protection pathways in PARP inhibitor-resistant BRCA-deficient cancer cells. *Genes & Development*, **31** (3): 318-332, doi: 10.1101/gad.290957.116
342. **Terasima** T, Tolmach LJ (1961) Changes in x-ray sensitivity of HeLa cells during the division cycle. *Nature*, **190**: 1210-1211, doi: 10.1038/1901210a0
343. **Terasima** T, Tolmach LJ (1963) Variations in several responses of HeLa cells to x-irradiation during the division cycle. *Biophysical Journal*, **3** (1): 11-13, doi: 10.1016/s0006-3495(63)86801-0
344. **Beucher** A, Birraux J, Tchouandong L, Barton O, Shibata A, Conrad S, Goodarzi AA, Krempler A, Jeggo PA, Löbrich M (2009) ATM and Artemis promote homologous recombination of radiation-induced DNA double-strand breaks in G2. *The EMBO Journal*, **28** (21): 3413-3427, doi: 10.1038/emboj.2009.276
345. **Foray** N, Randrianarison V, Marot D, Perricaudet M, Lenoir G, Feunteun J (1999) Gamma-rays-induced death of human cells carrying mutations of BRCA1 or BRCA2. *Oncogene*, **18** (51): 7334-7342, doi: 10.1038/sj.onc.1203165
346. **Zhang** J, Willers H, Feng Z, Ghosh JC, Kim S, Weaver DT, Chung JH, Powell SN, Xia F (2004) Chk2 phosphorylation of BRCA1 regulates DNA double-strand break repair. *Molecular and Cellular Biology*, **24** (2): 708-718, doi: 10.1128/MCB.24.2.708-718.2004
347. **Bhola** NE, Balko JM, Dugger TC, Kuba MG, Sánchez V, Sanders M, Stanford J, Cook RS, Arteaga CL (2013) TGF- β inhibition enhances chemotherapy action against triple-negative breast cancer. *The Journal of Clinical Investigation*, **123** (3): 1338-1358, doi: 10.1172/JCI65416
348. **Prat** A, Parker JS, Karginova O, Fan C, Livasy C, Herschkowitz JI, He X, Perou CM (2010) Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. *Breast Cancer Research*, **12** (5): R68, doi: 10.1186/bcr2635
349. **Mironchik** Y, Winnard PT Jr, Vesuna F, Kato Y, Wildes F, Pathak AP, Kominsky S, Atremov D, Bhujwala Z, Van Diest P, Burger H, Glackin C, Raman V (2005) Twist overexpression induces *in vivo* angiogenesis and correlates with chromosomal instability in breast cancer. *Cancer Research*, **65** (23): 10801-10809, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-0712
350. **Mani** SA, Guo W, Liao M-J, Eaton EN, Ayyanan A, Zhou AY, Brooks M, Reinhard F, Zhang CC, Shipitsin M, Campbell LL, Polyak K, Brisken C, Yang J, Weinberg RA (2008) The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell*, **133** (4): 704-715, doi: 10.1016/j.cell.2008.03.027
351. **Sánchez-Tilló** E, Lázaro A, Torrent R, Cuatrecasas M, Vaquero EC, Castells A, Engel P, Postigo A (2010) ZEB1 represses E-cadherin and induces an EMT by recruiting the SWI/SNF chromatin-remodeling protein BRG1. *Oncogene*, **29** (24): 3490-3500, doi: 10.1038/onc.2010.102
352. **Aigner** K, Dampier B, Descovich L, Mikula M, Sultan A, Schreiber M, Mikulits W, Brabletz T, Strand D, Obrist P, Sommergruber W, Schweifer N, Wernitznig A, Beug H, Foisner R, Eger A (2007) The transcription factor ZEB1 (δ EF1) promotes tumour cell dedifferentiation by repressing master regulators of epithelial polarity. *Oncogene*, **26** (49): 6979-6988, doi: 10.1038/sj.onc.1210508

353. **Ye X**, Tam WL, Shibue T, Kaygusuz Y, Reinhardt F, Eaton EN, Weinberg RA (2015) Distinct EMT programs control normal mammary stem cells and tumour-initiating cells. *Nature*, **525** (7568): 256-260, doi: 10.1038/nature14897
354. **Schneider G**, Krämer OH, Saur D (2012) A ZEB1-HDAC pathway enters the epithelial to mesenchymal transition world in pancreatic cancer. *Gut*, **61** (3): 329-330, doi: 10.1136/gutjnl-2011-301576
355. **Schliekelman MJ**, Taguchi A, Zhu J, Dai X, Rodriguez J, Celiktas M, Zhang Q, Chin A, Wong C-H, Wang H, McFerrin L, Selamat SA, Yang C, Kroh EM, Garg KS, Behrens C, Gazdar AF, Laird-Offringa IA, Tewari M, Wistuba II, Thiery JP, Hanash SM (2015) Molecular portraits of epithelial, mesenchymal and hybrid states in lung adenocarcinoma and their relevance to survival. *Cancer Research*, **75** (9): 1789-1800, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-14-2535
356. **Dybdal-Hargreaves NF**, Risinger AL, Mooberry SL (2018) Regulation of E-cadherin localization by microtubule targeting agents: rapid promotion of cortical E-cadherin through p130Cas/ Src inhibition by eribulin. *Oncotarget*, **9** (5): 5545-5561, doi: 10.18632/oncotarget.23798
357. **Yu C**, Yao Z, Dai J, Zhang H, Escara-Wilke J, Zhang Y, Keller ET (2011) ALDH activity indicates increased tumorigenic cells, but not cancer stem cells, in prostate cancer cell lines. *In Vivo*, **25** (1): 69-76
358. **Li W**, Ma H, Zhang J, Zhu L, Wang C, Yang Y (2017) Unraveling the roles of CD44/CD24 and ALDH1 as cancer stem cell markers in tumorigenesis and metastasis. *Scientific Reports*, **7** (1): 13856, doi: 10.1038/s41598-017-14364-2
359. **Zhou L**, Sheng D, Wang D, Ma W, Deng Q, Deng L, Liu S (2019) Identification of cancer-type specific expression patterns for active aldehyde dehydrogenase (ALDH) isoforms in ALDEFLUOR assay. *Cell Biology and Toxicology*, **35** (2): 161-177, doi: 10.1007/s10565-018-9444-y
360. **Marcato P**, Dean CA, Pan D, Araslanova R, Gillis M, Joshi M, Helyer L, Pan L, Leidal A, Gujar S, Giacomantonio CA, Lee PWK (2011) Aldehyde dehydrogenase activity of breast cancer stem cells is primarily due to isoform ALDH1A3 and its expression is predictive of metastasis. *Stem Cells*, **29** (1): 32-45, doi: 10.1002/stem.563
361. **Moore N**, Houghton JM, Lyle S (2012) Slow-cycling therapy-resistant cancer cells. *Stem Cells and Development*, **21** (10): 1822-1830, doi: 10.1089/scd.2011.0477
362. **Hatch EM**, Fischer AH, Deerinck TJ, Hetzer MW (2013) Catastrophic nuclear envelope collapse in cancer cell micronuclei. *Cell*, **154** (1): 47-60, doi: 10.1016/j.cell.2013.06.007
363. **Harding SM**, Benci JL, Irianto J, Discher DE, Minn AJ, Greenberg RA (2017) Mitotic progression following DNA damage enables pattern recognition within micronuclei. *Nature*, **548** (7668): 466-470, doi: 10.1038/nature23470
364. **Mackenzie KJ**, Carroll P, Martin CA, Murina O, Fluteau A, Simpson DJ, Olova N, Sutcliffe H, Rainger J, Leitch A, Osborn RT, Wheeler AP, Nowotny M, Gilbert N, Chandra T, Reijns MAM, Jackson AP (2017) cGAS surveillance of micronuclei links genome instability to innate immunity. *Nature*, **548** (7668): 461-465, doi: 10.1038/nature23449
365. **Vanpouille-Box C**, Alard A, Aryankalayil MJ, Sarfraz Y, Diamond JM, Schneider RJ, Inghirami G, Coleman CN, Formenti SC, Demaria S (2017) DNA exonuclease Trex1 regulates radiotherapy-induced tumour immunogenicity. *Nature Communications*, **8** (15618): 1-15, doi: 10.1038/ncomms15618
366. **Shen YJ**, Le Bert N, Chitre AA, Koo CX, Nga XH, Ho SSW, Khatoo M, Tan NY, Ishii KJ, Gasser S (2015) Genome-derived cytosolic DNA mediates type I interferon-dependent rejection of B cell lymphoma cells. *Cell Reports*, **11** (3): 460-473, doi: 10.1016/j.celrep.2015.03.041
367. **Erdal E**, Haider S, Rehwinkel J, Harris AL, McHugh PJ (2017) A prosurvival DNA damage-induced cytoplasmic interferon response is mediated by end resection factors and is limited by Trex1. *Genes & Development*, **31** (4): 353-369, doi: 10.1101/gad.289769.116
368. **Ishii KJ**, Coban C, Kato H, Takahashi K, Torii Y, Takeshita F, Ludwig H, Sutter G, Suzuki K, Hemmi H, Sato S, Yamamoto M, Uematsu S, Kawai T, Takeuchi O, Akira S (2006) A Toll-like receptor-independent antiviral response induced by double-stranded B-form DNA. *Nature Immunology*, **7** (1): 40-48, doi: 10.1038/ni1282

369. **Pourianazar NT, Gunduz U** (2016) Changes in apoptosis-related gene expression and cytokine release in breast cancer cells treated with CpG-loaded magnetic PAMAM nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, **515** (1-2): 11-19, doi: 10.1016/j.ijpharm.2016.10.007
370. **Sun Y, Mao X, Fan C, Liu C, Guo A, Guan S, Jin Q, Li B, Yao F, Jin F** (2014) CXCL12-CXCR4 axis promotes the natural selection of breast cancer cell metastasis. *Tumor Biology*, **35** (8): 7765-7773, doi: 10.1007/s13277-014-1816-1
371. **Bakhoun SF, Ngo B, Laughney AM, Cavallo J-A, Murphy CJ, Ly P, Shah P, Sriram RK, Watkins TBK, Taunk NK, Duran M, Pauli C, Shaw C, Chadalavada K, Rajasekhar VK, Genovese G, Venkatesan S, Birkbak NJ, McGranahan N, Lundquist M, LaPlant Q, Healey JH, Elemento O, Chung CH, Lee NY, Imielenski M, Nanjangud G, Pe'er D, Cleveland DW, Powell SN, Lammerding J, Swanton C, Cantley LC** (2018) Chromosomal instability drives metastasis through a cytosolic DNA response. *Nature*, **553** (7689): 467-472, doi: 10.1038/nature25432
372. **Jiang T, Shi W, Wali VB, Pongor LS, Li C, Lau R, Gyórfy B, Lifton RP, Symmans WF, Puztai L, Hatzis C** (2016) Predictors of Chemosensitivity in triple negative breast Cancer: an integrated genomic analysis. *PLOS Medicine*, **13** (12): e1002193, doi: 10.1371/journal.pmed.1002193
373. **Deng L, Liang H, Xu M, Yang X, Burnette B, Arina A, Li X-D, Mauceri H, Beckett M, Darga T, Huang X, Gajewski TF, Chen ZJ, Fu Y-X, Weichselbaum RR** (2014) STING-dependent cytosolic DNA sensing promotes radiation-induced type I interferon-dependent antitumor immunity in immunogenic tumors. *Immunity*, **41** (5): 843-852, doi: 10.1016/j.immuni.2014.10.019
374. **Dunphy G, Flannery SM, Almine JF, Connolly DJ, Paulus C, Jønsson KL, Jakobsen MR, Nevels MM, Bowie AG, Unterholzner L** (2018) Non-canonical Activation of the DNA Sensing Adaptor STING by ATM and IFI16 Mediates NF-κB Signaling after Nuclear DNA Damage. *Molecular Cell*, **71** (5): 745-760, doi: 10.1016/j.molcel.2018.07.034
375. **Gaston J, Cheradame L, Yvonnet V, Deas O, Poupon M-F, Judde J-G, Cairo S, Goffin V** (2016) Intracellular STING inactivation sensitizes breast cancer cells to genotoxic agents. *Oncotarget*, **7** (47): 77205-77224, doi: 10.18632/oncotarget.12858

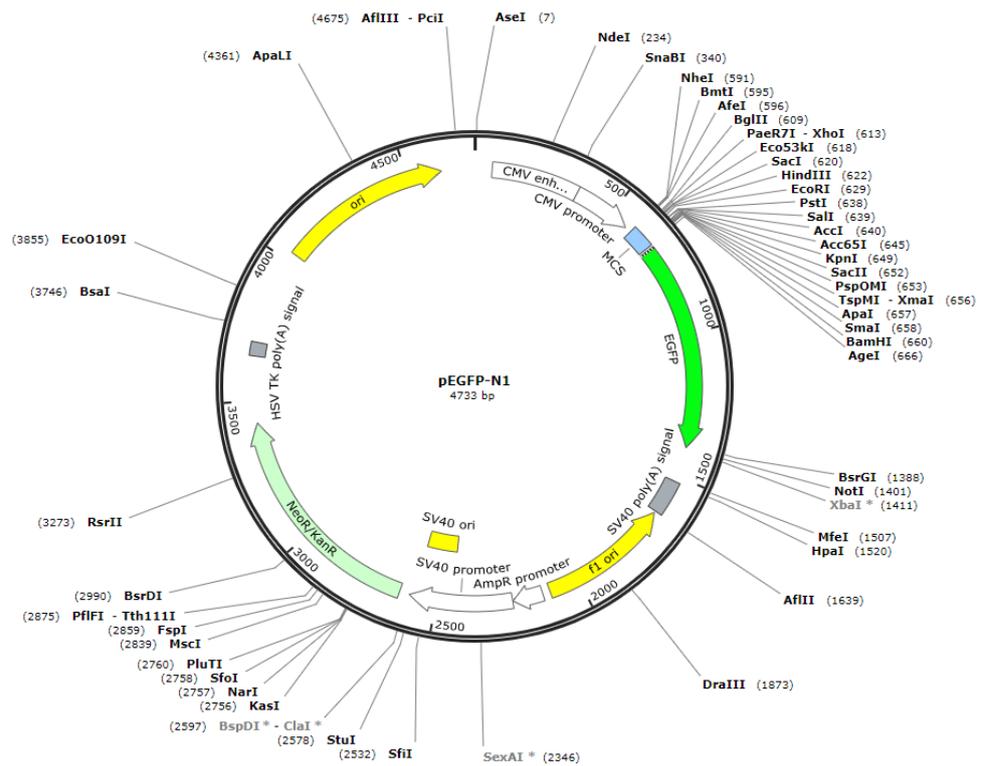


Abbildung A.3: Plasmidkarte von *pEGFP-N1* von Addgene.

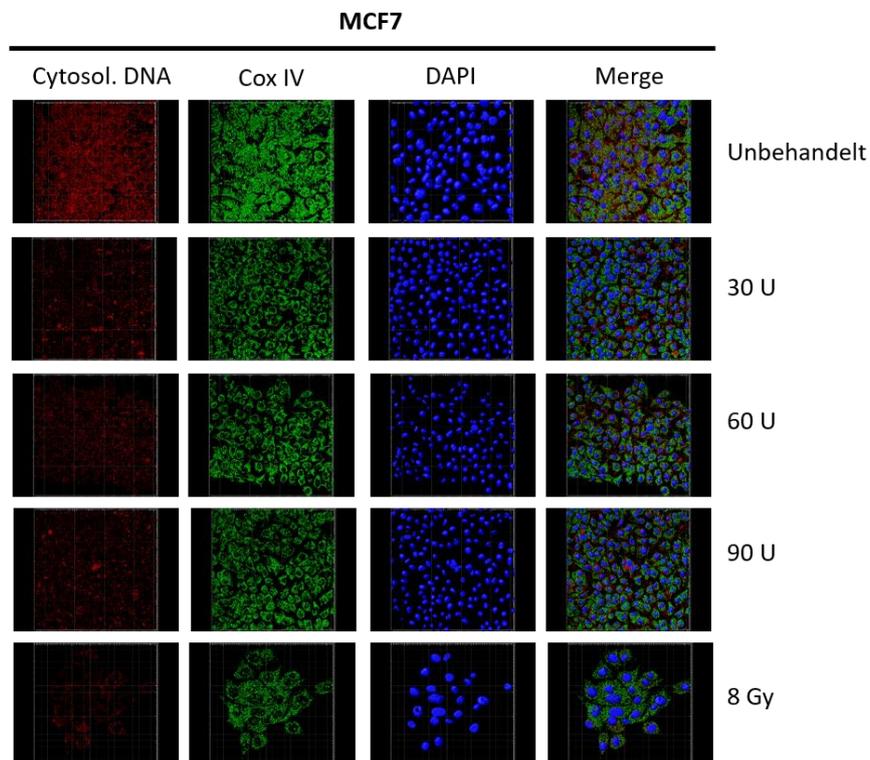


Abbildung A.4: Immuncytochemische Analyse der cytosolischen dsDNA und der COX IV in der MCF7, 16 h nach 8 Gy und mit verschiedenen DNase-Behandlungen (30 U, 60 U, 90 U) (Beispielaufnahmen). Die cytosolische dsDNA ist in rot, die COX IV in grün dargestellt. Abkürzungen: dsDNA: engl. *double-stranded DNA*, COX IV: engl. *cytochrome c oxidase 4*, U: Units.

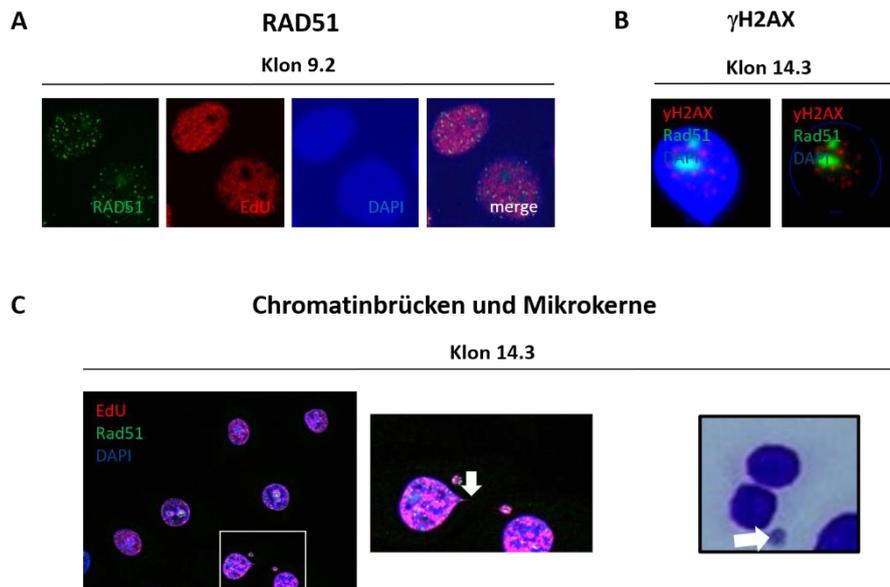


Abbildung A.5: Veränderter endogener Stress in BRCA1-Klonen (Beispielaufnahmen). Exponentielle MCF7 Zellen wurden fixiert, RAD51 (A) und γ H2AX (B) immunocytochemisch mit entsprechenden Erst- und fluoreszenzgekoppelten Zweitantikörpern und nukleäre DNA mit DAPI gefärbt. Dargestellt sind beispielhafte Aufnahmen von RAD51 (grün) und γ H2AX (rot) der Klone 9.2 und 14.3. (C) Chromatinbrücken wurden mit DAPI gefärbt, beispielhaft dargestellt in Klon 14.3 (links) (63x Objektiv). Mikrokerne wurden in exponentiellen Zellen durch 6 h Cytochalasin B Behandlung, Fixierung und Giemsa-Färbung untersucht, beispielhaft in Klon 14.3 (rechts) (20x Objektiv mit 2.16 Digitalen Zoom) dargestellt.

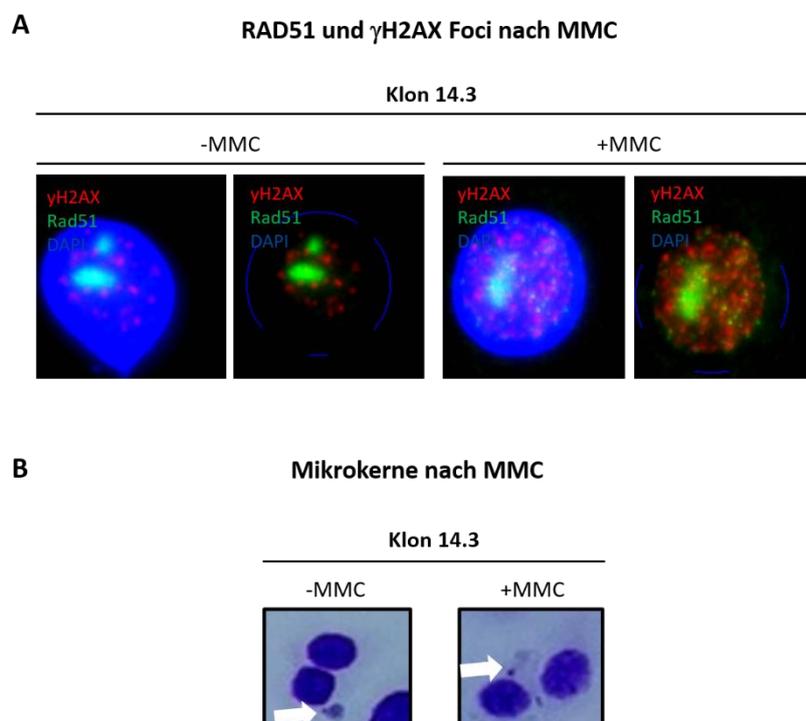


Abbildung A.6: Veränderter Stress nach Schädigung in BRCA1-Klonen (Beispielaufnahmen). Exponentielle MCF7 Zellen wurden mit MMC behandelt, fixiert, RAD51 und γ H2AX (A) immunocytochemisch mit entsprechenden Erst- und fluoreszenzgekoppelten Zweitantikörpern und nukleäre DNA mit DAPI gefärbt. Dargestellt sind beispielhafte Aufnahmen von RAD51 (grün) und γ H2AX (rot) in Klon 14.3. (B) Mikrokerne wurden in exponentiellen Zellen nach MMC-Behandlung durch 6 h Cytochalasin B Behandlung, Fixierung und Giemsa-Färbung untersucht, dargestellt in Klon 14.3 (mit Pfeilen markiert) (20x Objektiv mit 2.16 Digitalen Zoom).