

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Labor für Strahlenbiologie und experimentelle Radioonkologie

Klinik für Strahlentherapie und Radioonkologie

Leitung: Prof. Dr. med. Cordula Petersen

Klinische Bedeutung von PALB2 und ABRAXAS1 für das Überleben nach
Strahlentherapie von Brustkrebspatientinnen und zelluläre Auswirkungen auf
die DNA-Replikation

DISSERTATION

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

vorgelegt von:

Jonas Willmann
aus Osnabrück

Hamburg 2020

Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 10.02.2021

Veröffentlicht mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. Volkmar Müller

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

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	VI
Summary.....	VIII
1 Einleitung.....	1
1.1 Brustkrebs	1
1.1.1 Epidemiologie.....	1
1.1.2 Anatomische Stadieneinteilung	2
1.1.3 Prädiktive und prognostische Biomarker.....	4
1.1.4 Therapie	6
1.2 Funktionen der Homologen Rekombination zum Erhalt der genomische Integrität .	9
1.2.1 Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen	9
1.2.2 Replikationsgabelschutz	12
1.2.3 DNA-Schadensantwort und Zellzyklus-Kontrollpunkte.....	13
1.3 Erbllicher Brustkrebs durch Mutationen in Gene der Homologen Rekombination..	15
1.3.1 BRCA1 und BRCA2.....	15
1.3.2 PALB2	16
1.3.3 ABRAXAS1	19
1.4 Ziel der Arbeit.....	20
2 Material und Methoden.....	22
2.1 Material.....	22
2.1.1 Zelllinien	22
2.1.2 Antikörper	22
2.1.3 Zellmedien und Reagenzien.....	23
2.1.4 Puffer und Lösungen.....	23
2.1.5 Verbrauchsmaterialien	23
2.1.6 Geräte.....	24

2.1.7	Software und Datenbanken	24
2.2	Methoden	25
2.2.1	Metaanalyse zum Einfluss der Genexpression auf das Überleben nach Strahlentherapie	25
2.2.2	Zellkultur.....	27
2.2.3	DNA Fiber Assay.....	27
3	Ergebnisse.....	31
3.1	Bedeutung der mRNA-Expression von PALB2 und ABRAXAS1 für das Gesamtüberleben und den Überlebensvorteil durch Strahlentherapie von Brustkrebspatientinnen	31
3.1.1	Kein Einfluss der mRNA-Expression von PALB2 und ABRAXAS1 auf das Gesamtüberleben.....	32
3.1.2	Kein Überlebensvorteil durch Strahlentherapie bei geringer mRNA-Expression von PALB2	34
3.1.3	Kein Überlebensvorteil durch Strahlentherapie bei Brustkrebspatientinnen im klinischen Stadium II mit geringer PALB2 mRNA-Expression.....	36
3.1.4	Kein Überlebensvorteil durch Strahlentherapie bei geringer mRNA-Expression von PALB2 und Tumoren des molekularem Subtyps Luminal-A.....	41
3.2	Auswirkung der heterozygoten Mutationen c.1592delT in PALB2 und c.1082G>A in ABRAXAS1 auf die Replikationsprogression und -initiation.....	49
3.2.1	Kein Einfluss der heterozygoten Mutationen in PALB2 und ABRAXAS1 auf die Elongationsrate.....	51
3.2.2	Erhöhte Feuerrate von Replikationsursprüngen in Trägern der heterozygoten Mutationen in PALB2 und ABRAXAS1	52
3.3	Einfluss der heterozygoten Mutationen in c.1592delT, c.2323C>T, Y1108Sfs und c.3113G>A in PALB2 auf die Replikationsprogression und -initiation.....	54
3.3.1	Verringerte Elongationsrate in Trägern der heterozygoten Mutation c.3113G>A in PALB2	55
3.3.2	Deutlichste Erhöhung der Feuerrate von Replikationsursprüngen in Trägern der heterozygoten Mutation c.3113G>A in PALB2	56

3.4	Einfluss der heterozygoten Mutationen c.1592delT in PALB2 und c.1082G> in ABRAXAS1 auf den Replikationsgabelschutz	58
3.4.1	Kein Einfluss der heterozygoten Mutationen in PALB2 und ABRAXAS1 auf das Anhalten von Replikationsgabeln in unbehandelten Zelllinien.....	59
3.4.2	Moderate, nicht signifikante Vermehrung angehaltener Replikationsgabeln nach Hydroxyurea-Behandlung bei der heterozygoten Mutation in PALB2.....	61
3.4.3	Moderate, nicht signifikante Reduktion der Elongationsrate nach Hydroxyurea-Behandlung bei der heterozygoten Mutation in PALB2.....	62
3.4.4	Kein Einfluss der heterozygoten Mutationen in PALB2 und ABRAXAS1 auf den Abbau entstehender DNA-Stränge nach Hydroxyurea-Behandlung	64
3.4.5	Vermehrt angehaltene Replikationsgabeln nach Bestrahlung bei der heterozygoten Mutation in PALB2.....	65
4	Diskussion	68
4.1	Prädiktive Rolle der Expression von Genen der DNA-Schadenantwort für das Ansprechen auf Strahlentherapie von Brustkrebspatientinnen	69
4.2	Replikationsdefekte bei Mutationen in Genen der DNA-Schadensantwort	72
4.2.1	Replikationsgabelschutz	73
4.2.2	Replikationsinitiation und -progression.....	76
4.3	Ausblick	77
5	Abkürzungsverzeichnis	79
6	Literaturverzeichnis.....	82
7	Danksagung	94
8	Lebenslauf.....	95
9	Eidesstattliche Versicherung.....	96

Zusammenfassung

Brustkrebs ist weltweit die häufigste Krebserkrankung der Frau. Treten in Familien gehäuft und bereits in frühem Alter Brust- oder Eierstockkrebserkrankungen auf, so kann dies auf eine genetische Veranlagung für erblichen Brustkrebs hinweisen. Die Mehrzahl der Frauen mit erblichem Brustkrebs trägt eine heterozygote Keimbahnmutation in BRCA1 oder BRCA2. Genomische Untersuchungen konnten verschiedene Keimbahnmutationen in Interaktionspartnern von BRCA1/2 identifizieren, die ebenfalls mit einem erhöhten Brustkrebsrisiko assoziiert sind. Zu diesen Brustkrebsrisikogenen gehören auch PALB2 und ABRAXAS1.

BRCA1/2, PALB2 und ABRAXAS1 sind Proteine der Homologen Rekombination (HR), einem DNA-Reparaturmechanismus, der darüber hinaus an der DNA-Schadensantwort und dem Schutz von Replikationsgabeln beteiligt ist. Damit ist die HR von entscheidender Bedeutung für den Erhalt der genomischen Integrität. Die Mechanismen, über die heterozygote Mutationen in HR-Gene zur Tumorentstehung beitragen, sind komplex und insbesondere die Auswirkungen von Mutationen auf den Replikationsgabelschutz noch wenig erforscht. Entsprechend ihrer Rolle als wichtige Interaktionspartner von BRCA1/2 wäre denkbar, dass Mutationen in PALB2 und ABRAXAS1 zu Replikationsdefekten führen. Durch ihre Funktion bei der DNA-Reparatur wäre weiterhin denkbar, dass sich genomische Veränderungen von PALB2 oder ABRAXAS1 auf die Strahlensensitivität von Krebspatienten auswirken.

Um die Auswirkungen von PALB2 und ABRAXAS1 auf die klinische Strahlensensitivität zu bestimmen, wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit in einer Metaanalyse zweier Brustkrebsdatenbanken der Zusammenhang zwischen der mRNA-Expression und der Überlebenszeit generell sowie den Überlebensvorteil nach Strahlentherapie untersucht. Um die Auswirkungen von verschiedenen heterozygoten Mutationen in PALB2 und ABRAXAS1 auf die DNA-Replikation zu untersuchen, wurden in primären, humanen Zelllinien die Replikationsstrukturen auf Nukleotidebene mit der DNA Fiber Assay Technik nachgewiesen. Die Replikation wurde dabei im unbehandelten Zustand, nach Hydroxyurea-induzierter Unterbrechung der Replikation sowie nach DNA-Schädigung durch Bestrahlung untersucht, um die Auswirkung verschiedener Formen von Replikationsstress zu vergleichen.

Brustkrebspatientinnen mit dem molekularen Subtyp Luminal-A oder dem klinischen Stadium II hatten keinen Überlebensvorteil durch Strahlentherapie, wenn ihre Tumoren wenig PALB2 exprimieren. Bei einer hohen PALB2-Expression bestand hingegen ein Überlebensvorteil nach

Strahlentherapie. Zwischen hoher und niedriger Expression von ABRAXAS1 bestanden keine Unterschiede hinsichtlich des Überlebens nach Strahlentherapie. Möglicherweise haben die PALB2-überexprimierenden Tumoren ein höheres Rezidivrisiko und profitieren daher mehr von einer Strahlentherapie. Die zellulären Mechanismen, über die PALB2 an der Brustkrebsprogression beteiligt sein könnte waren nicht Gegenstand dieser Arbeit und sind noch unklar. Der Zusammenhang zwischen der Expression von HR-Genen wie PALB2, der Tumorprogression und der klinischen Strahlensensitivität sollte weiter untersucht werden.

Die PALB2- und ABRAXAS1-Trägerzelllinien zeigten eine vermehrte Initiation von Replikationsursprüngen ohne verringerte Elongationsrate im unbehandelten Zustand. Insbesondere zwischen vier verschiedenen untersuchten Mutationen in PALB2 bestanden deutliche Unterschiede in der Ausprägung dieses Replikationsdefekts. Die klinische Bedeutung dieser Haploinsuffizienz der Replikation für die frühe Tumorentstehung in erblichen Brustkrebspatientinnen sollte in zukünftigen Arbeiten näher untersucht werden. Weiterhin sollten die Mechanismen untersucht werden, über die PALB2 und ABRAXAS1 die Initiation von Replikationsursprüngen und die Elongationsrate beeinflussen.

Nach Bestrahlung konnten vermehrt angehaltene Replikationsgabeln in PALB2-Trägern, nicht aber in ABRAXAS1-Trägern beobachtet werden. Nach Behandlung der Zellen mit Hydroxyurea zeigte sich in PALB2-Trägern eine nicht signifikante Verringerung der Elongationsrate sowie eine nicht signifikante Zunahme angehaltener Replikationsgabeln. Dies könnte auf eine Störung des Neustarts angehaltener Replikationsgabeln durch defekten Replikationsgabelschutz hindeuten. ABRAXAS1-Träger zeigten keine Veränderungen, die auf einen beeinträchtigten Replikationsgabelschutz hinweisen. Die Rolle von PALB2 beim Replikationsgabelschutz könnte von Interesse für Tumorentstehung und Therapieansprechen sein und sollte näher untersucht werden.

Summary

Breast cancer is the most common cancer in women worldwide. A high frequency of breast or ovarian cancer cases in a family and cases at an early age may indicate a genetic predisposition to hereditary breast cancer. The majority of women with hereditary breast cancer carry a heterozygous germline mutation in BRCA1 or BRCA2. Genomic studies have identified germline mutations in binding partners of BRCA1/2 which are associated with breast cancer susceptibility as well. Among these breast cancer genes are PALB2 and ABRAXAS1.

BRCA1/2, PALB2 and ABRAXAS1 are proteins that are known to function in homologous recombination (HR), a DNA repair mechanism that is also involved in DNA damage response and protecting replication fork. Thus, HR is of crucial importance for the maintenance of genomic integrity. The mechanisms by which heterozygous mutations in HR genes contribute to tumorigenesis are complex. Particularly, the effects of mutations on the protection of replication fork are still poorly understood. Given their roles as important interaction partners of BRCA1/2, mutations in PALB2 and ABRAXAS1 could lead to defects of the DNA replication. Due to their function in DNA repair, it is also conceivable that genomic alterations in PALB2 or ABRAXAS1 could affect the radiosensitivity of cancer patients.

In order to determine the effects of PALB2 and ABRAXAS1 on clinical radiosensitivity, a meta-analysis of two breast cancer databases was used in this study to investigate the relationship between mRNA expression and survival time in general and the survival benefit after radiotherapy. To study the effects of different heterozygous mutations in PALB2 and ABRAXAS1 on DNA replication, the replication structures at nucleotide level were detected in primary human cell lines using the DNA fiber assay technique. The DNA replication was assessed in the untreated state, after hydroxyurea-induced arrest of the replication and after DNA damage by irradiation in order to compare the effect of different forms of replication stress.

Breast cancer patients with the molecular subtype Luminal-A or clinical stage II did not have a survival benefit from radiotherapy if their tumors had a low expression of PALB2. However, there was a survival advantage after radiotherapy if PALB2 expression was high. There was no difference between high and low expression of ABRAXAS1 with regard to survival after radiotherapy. Possibly, patients with PALB2-overexpressing tumors have a higher risk of recurrence and therefore benefit more from radiotherapy. The cellular mechanisms by which PALB2 might be involved in breast cancer progression were not the subject of this work and

are still unclear. The interaction between the expression of HR genes such as PALB2, tumor progression and clinical radiation sensitivity should be further investigated.

The PALB2 and ABRAXAS1 mutation carrier cell lines showed an increased firing of origins of replication without an effect on the elongation rate in the untreated state. Especially between carriers of the four different mutations in PALB2 that were studied, the replication defects differed strongly. The clinical significance of this haploinsufficiency of replication for the early development of tumors in hereditary breast cancer patients should be investigated in future studies. Furthermore, the mechanisms by which PALB2 and ABRAXAS1 influence the firing of origins of replication and the elongation rate should be investigated.

After irradiation, an increase in stalled replication forks could be observed in PALB2 carrier cell lines but not in ABRAXAS1 carriers. After treatment with hydroxyurea, a non-significant reduction of the elongation rate and a non-significant increase of stalled replication forks was observed in PALB2 carriers. This could indicate a disturbance of the restart of stalled replication forks due to defective protection of replication forks. ABRAXAS1 showed no change that would indicate an impaired protection of replication forks. The role of PALB2 in the protection of replication forks could be of interest for tumorigenesis and prediction of therapy response and should thus be further investigated.

1 Einleitung

1.1 Brustkrebs

1.1.1 Epidemiologie

Brustkrebs ist weltweit der häufigste maligne Tumor der Frau, nach dem kolorektalen Karzinom und Lungenkrebs (*WHO Cancer Facts Sheet*, 2018). Jährlich werden mehr als 2 Millionen Fälle neudiagnostiziert. Brustkrebs macht weltweit knapp ein Viertel aller Krebserkrankungen der Frau aus. In Deutschland ist Brustkrebs mit 69.000 jährlichen Neuerkrankungen die mit Abstand häufigste Krebserkrankung der Frau (*Zentrum Für Krebsregisterdaten - Brustkrebs*, 2019). Damit erkrankt etwa eine von acht Frauen in Deutschland im Laufe ihres Lebens an Brustkrebs. Bezüglich der Sterberate steht Brustkrebs global an vierter Stelle unter den Tumorerkrankungen (*WHO Cancer Facts Sheet*, 2018). Seit den 1970er Jahren ist die Sterberate bei Brustkrebs rückläufig (Kohler *et al.*, 2015). Abbildung 1 zeigt die Verbesserung der relativen 1- bis 10-Jahresüberlebensrate von Brustkrebspatientinnen in Deutschland seit den 1970er Jahren (Abb. 1). Die besseren Überlebenschancen sind auf Verbesserungen von Screeninguntersuchungen und der adjuvanten Therapie zurückzuführen (Munoz *et al.*, 2014; De Gelder *et al.*, 2015). Die anatomische Ausbreitung der Erkrankung und ihr molekularer Subtyp sind entscheidende Faktoren für die Prognose und das Ansprechen auf die Therapie.

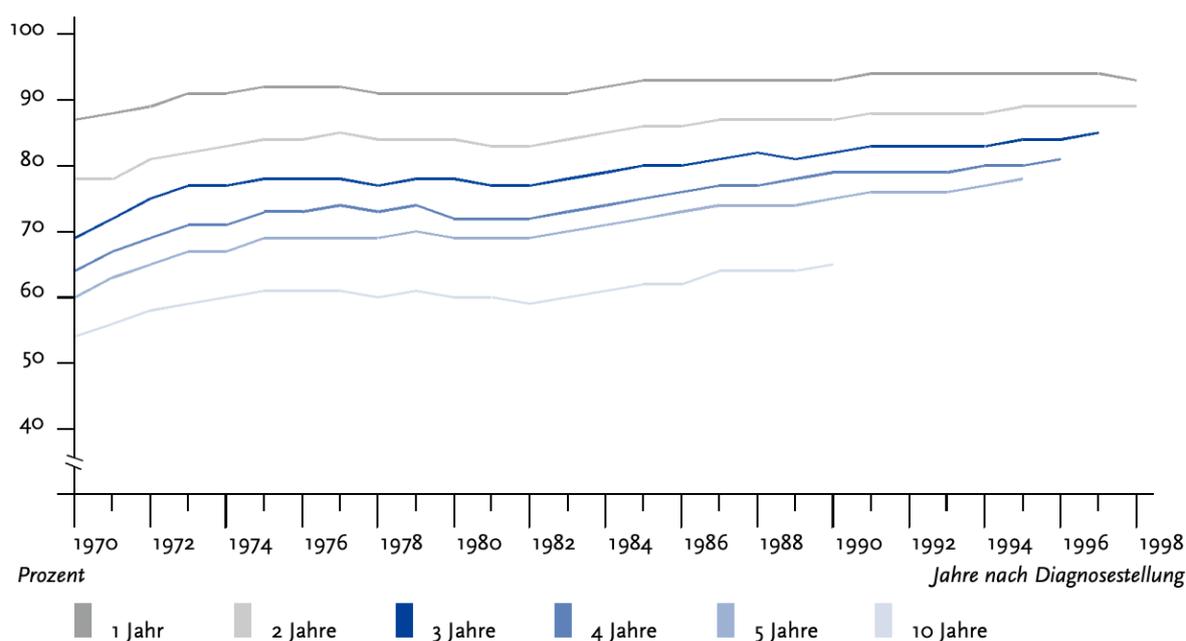


Abbildung 1: Verbesserung der relativen Überlebensrate von Brustkrebspatientinnen seit den 1970er Jahren.

Entwicklung der relativen 1-, 2-, 3-, 4-, 5- und 10-Jahresüberlebensraten von Brustkrebspatientinnen im zeitlichen Verlauf von 1970 bis 1998 in Deutschland anhand des saarländischen Krebsregisters. Quelle: Giersiepen *et al.*, 2005.

1.1.2 Anatomische Stadieneinteilung

Die anatomische Stadieneinteilung von Brustkrebs erfolgt anhand der Ausdehnung des Primärtumors, dem Lymphknotenbefall sowie dem Vorhandensein von Fernmetastasen nach der TNM-Klassifikation. Anhand des TNM-Stadiums lässt sich die Erkrankung vier Stadien nach der UICC (*union internationale contre le cancer*) einteilen (Tab. 1).

Primärtumor (T-Stadium)

Die Ausbreitung des Primärtumors (T-Stadium) wird durch klinische und histologische Untersuchung in Zusammenschau mit der Bildgebung beurteilt. Die Diagnostik kann dabei Röntgen-Mammographie, sonographische Untersuchung der Brüste und Axillae sowie Stanz- oder Vakuumbiopsie, bei auffälligem Befund in der Bildgebung, umfassen (Wörmann *et al.*, 2018).

Lymphknotenbefall (L-Stadium)

Der Befall der regionären Lymphknoten stellt einen wichtigen prognostischen Faktor von Brustkrebs im Frühstadium dar (Carter, Allen and Henson, 1989). Ein wichtiges Verfahren zur Bestimmung des Lymphknotenbefalls ist die Sentinel-Lymphknotenbiopsie (Krag *et al.*, 1993). Dabei wird der axilläre Lymphknoten mit der höchsten Wahrscheinlichkeit eines Befalls identifiziert, reseziert und histologisch auf Tumorbefall untersucht. Die Sentinel-Lymphknotenbiopsie ermöglicht eine Beurteilung des Lymphknotenbefalls ohne Axilladisektion, die mit zum Teil erheblicher Morbidität verbunden ist (Giuliano *et al.*, 1995).

Fernmetastasen (M-Stadium)

Die häufigsten von Fernmetastasen betroffenen Organe bei Brustkrebs sind das Skelett, die Leber, die Lungen sowie das zentrale Nervensystem (Patanaphan, Salazar and Risco, 1988). Zur Ausbreitungsdiagnostik eingesetzt werden Skelettszintigraphie (Skelettmetastasen), Computertomographie (CT) und Ultraschall des Abdomen (Lebermetastasen), CT des Thorax

(Lungenmetastasen) sowie zerebrale Magnetresonanztomographie (MRT) (zentrales Nervensystem) (Wörmann *et al.*, 2018).

Tabelle 1: Anatomische Stadieneinteilung für Brustkrebs nach UICC.

Primärtumor	Lymphknotenbefall	Fernmetastasierung	Stadium
Tis	N0 (keine)	M0	0
T1mic	N0	M0	I
T1a (1 – 5 mm)	N0	M0	
T1b (6 – 10 mm)	N0	M0	
T1c (11 – 20 mm)	N0	M0	
T0, T1mic, T1	N1 (1-3 LK in der Axilla und/oder der ipsilateralen Mammaria-Interna-Region)	M0	IIA
T2 (21- 50 mm)	N0	M0	
T2	N1	M0	IIB
T3 (≥51 mm)	N0	M0	
T0, T1mic, T1, T2	N2 (4-9 LK in der Axilla)	M0	IIIA
T3	N1	M0	
T4 (Infiltration von Brustwand und/oder Haut, und/oder ipsilaterale Satellitenmetastasen und/oder inflammatorischer Brustkrebs)	N0 – 2	M0	IIIB
jedes T	N3 (≥10 befallene LK in der Axilla und/oder Befall infra- oder supraklavikulärer LK)	M0	IIIC
jedes T	jedes N	M1 (außerhalb von Brust und benachbarten LK-Regionen)	IV

UICC: *Union internationale contre le cancer*; Tis: Tumor in situ, noch nicht ins umliegende Gewebe eingedrungen; T1mic: Tumor mit Mikroinvasion von 0,1cm oder weniger. LK: Lymphknoten, Quelle: Wörmann *et al.*, 2018.

1.1.3 Prädiktive und prognostische Biomarker

Histologischer Grad

Der histologische Grad des Tumors wird anhand von morphologischen Eigenschaften nach dem modifizierten Scarff-Bloom-Richardson (SBR) Grading System bestimmt (Galea *et al.*, 1992). Anhand des SBR-Systems werden die Brusttumoren unterteilt in G1 (niedriger histologischer Grad, gute Prognose), G2 (intermediärer histologischer Grad), G3 (hoher histologischer Grad, schlechte Prognose) sowie GX (histologischer Grad nicht beurteilbar). Höhergradige Tumoren sprechen besser auf Chemotherapie an (Amat *et al.*, 2002).

Hormonrezeptoren

Die Expression der Hormonrezeptoren Östrogenrezeptor (*estrogene receptor*, ER) und Progesteronrezeptor (PR) hat eine prädiktive Rolle für das Ansprechen auf Hormontherapien. Durch medikamentöse Hormontherapien, wie den selektiven ER-Rezeptormodulator Tamoxifen, lässt sich das Wachstum von ER- und PR-positiven Tumoren verlangsamen (Giuliano and Hortobagyi, 2017). Je höher die Expression der Rezeptoren, umso größer ist der Überlebensvorteil durch eine Hormontherapie (EBCTCG, 2011b).

Her2-Rezeptor

Die Amplifikation oder Überexpression des Onkogens Her2 (*human epidermal growth factor receptor-2*) ist in unbehandelten Patientinnen mit einer schlechteren Prognose assoziiert. Her2-positive Tumoren sind häufig histologisch höhergradig und weisen eine hohe Zellproliferation auf (Rosenthal *et al.*, 2002). Allerdings führten gezielte systemische anti-Her2 Therapien, beispielsweise mit dem monoklonalen Antikörper Trastuzumab, zu einer deutlichen Verbesserung der Prognose von Patientinnen mit Her2-positiven Tumoren (Slamon *et al.*, 2011).

Ki-67

Ki-67 ist ein mit zellulärer Proliferation assoziiertes nukleäres Protein (Gilchrist *et al.*, 1985). Der Nachweis erfolgt immunhistochemisch und die dient als Proliferationsmarker. Eine hohe Expression von Ki-67 ist prädiktiv für eine Ansprechen auf Chemotherapie (Coates *et al.*, 2015).

Molekulare Subtypen

Die Einteilung von Brustkrebs in molekulare Subtypen hat prognostische und prädiktive Relevanz. Die Unterteilung erfolgt anhand der Genexpression oder über immunhistochemische Surrogatmarker (Wörmann *et al.*, 2018) (Tab. 2).

Luminaler Brustkrebs umfasst ein Spektrum von Tumoren mit positiven Hormonrezeptoren. Luminal-A Brustkrebs ist positiv für ER und PR, jedoch negativ für Her2 sowie Ki67 oder vergleichbare Proliferationsmarker. Die Prognose von Luminal-A Brustkrebs ist sehr gut. Die Tumore sind in der Regel gut differenziert, sprechen insbesondere auf Hormontherapie an. Luminal-B Tumoren sind schlechter differenziert als Luminal-A Tumoren und sprechen besser auf Chemotherapie an. Tumoren vom *Her2-enriched* Subtyp weisen eine Überexpression oder Amplifikation von Her2 auf, sind negativ für ER und PR. Diese Tumoren sind in der Regel sehr aggressiv, jedoch hat sich die Prognose der Patientinnen durch anti-Her2 Therapien deutlich verbessert (Llombart-Cussac *et al.*, 2017). *Basal-like* Brusttumoren sind negativ für ER, PR und Her2. Diese Tumoren sind wenig differenziert, aggressiv und sprechen schlecht auf Therapien an (Fulford *et al.*, 2007). Die Mortalität der Patientinnen ist dementsprechend hoch. Es besteht eine Überlappung mit triple negativem Brustkrebs.

Tabelle 2: Molekulare Subtypen von Brustkrebs.

Molekularer Subtyp	Subgruppe	Definition/Surrogatmarker	Anmerkung
Luminal-A		ER und PR positiv Her2 negativ Ki67 negativ	
Luminal-B	Her2 negativ	ER positiv und PR negativ oder Ki-67 positiv	
	Her2 positiv	ER positiv Her2 überexprimiert/amplifiziert Ki-67 niedrig oder hoch	
Her2-enriched		Her2 überexprimiert/amplifiziert ER und PR negativ	
Basal-like		ER und PR negativ Her2 negativ	Entspricht weitgehend dem triple negativen Brustkrebs

Die Unterteilung von Brustkrebs in molekulare Subtypen erfolgt meist über immunhistochemische Surratmarker. Die Subtypen sind prädiktiv für das Therapieansprechen. ER: Östrogenrezeptor, PR: Progesteronrezeptor, Her2: *human epidermal growth factor receptor-2*. Quelle: Wörmann *et al.*, 2018.

1.1.4 Therapie

Die Therapie von Brustkrebs richtet sich nach dem anatomischen Stadium der Erkrankung sowie molekularen Markern, die prädiktiv für ein Therapieansprechen sind. Dabei können chirurgische Resektion, Strahlentherapie und verschiedene systemische Therapien eingesetzt und kombiniert werden. Abbildung 2 zeigt einen möglichen Entscheidungsalgorithmus für die Primärtherapie von Brustkrebs.

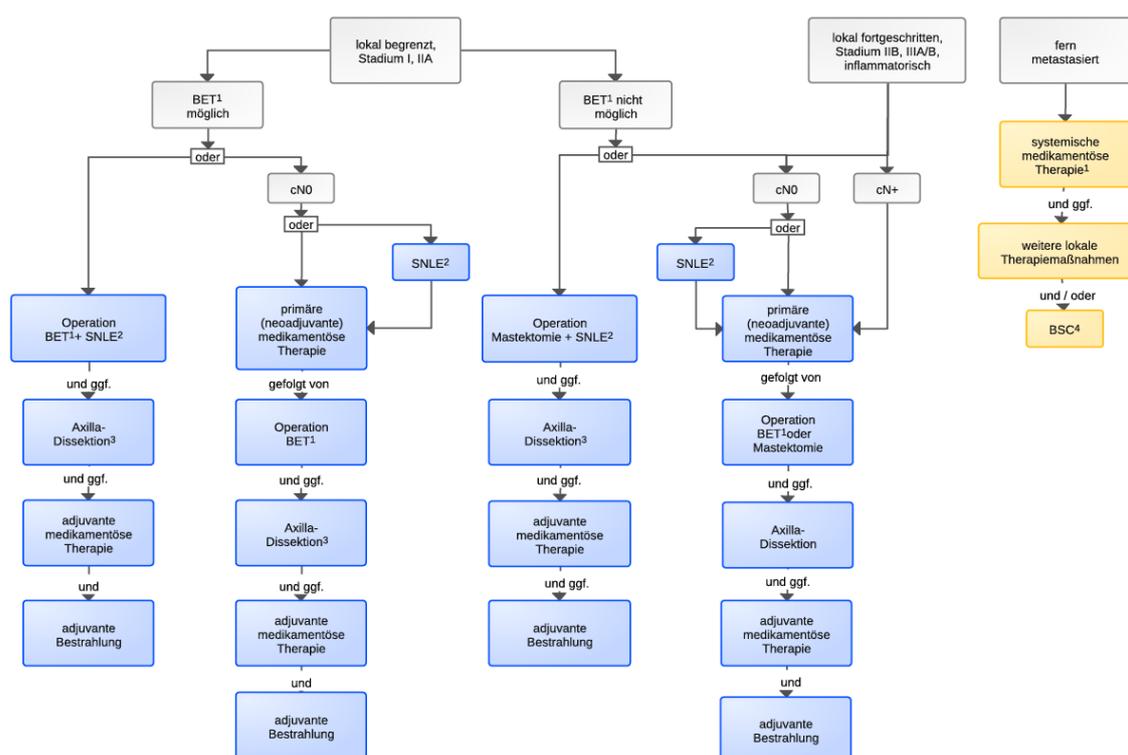


Abbildung 2: Entscheidungsalgorithmus der Primärtherapie von Brustkrebs.

BET¹: brusterhaltende Therapie, SNLE²: Sentinel-Lymphknotenbiopsie, Axilla-Dissektion³: in dieser Indikation nur selten empfohlen; BSC⁴: *best supportive care*; blaue Felder: kurative Therapieoptionen; orange Felder: palliative Therapieoptionen; Quelle: Wörmann *et al.*, 2018.

Chirurgische Therapie

Die chirurgische Entfernung des malignen Tumors gehört zu den etablierten Therapieoptionen bei Brustkrebs. Dabei können entweder eine brusterhaltende Therapie (BET) oder eine

Mastektomie angewendet werden. Aufgrund der geringeren behandlungsassoziierten Morbidität bei vergleichbarem Überleben ist die BET bei Patientinnen mit Brustkrebs im Frühstadium die chirurgische Therapie der Wahl (Veronesi *et al.*, 2002).

Bei der radikalen Mastektomie nach Halsted werden die Brust, der große und kleine Brustmuskel sowie mehrere axilläre Lymphknotenstationen entfernt (Veronesi and Zurrida, 1996). Modifizierte Varianten der Mastektomie erhalten den großen Brustmuskel sowie verschiedene axilläre Lymphknotenstationen. Nach einer Mastektomie können rekonstruktive Operationen mit autologem Gewebe oder einem Implantat das kosmetische Ergebnis verbessern (Rowland *et al.*, 2000).

Strahlentherapie

Bei der Strahlentherapie werden ionisierende Strahlen eingesetzt, um durch die Erzeugung von DNA-Schäden, insbesondere Doppelstrangbrüchen (DSBs), die Zellteilung von Tumorzellen zu verhindern oder ihren kontrollierten Zelltod (Apoptose) herbeizuführen. Die Strahlentherapie bei Brustkrebspatientinnen ist insbesondere als adjuvante Behandlung nach BET von Bedeutung. Nach BET halbiert die adjuvante Strahlentherapie der erhaltenen Brust die Rezidivrate und reduziert die brustkrebspezifische Mortalität um etwa ein Sechstel (EBCTCG, 2011a). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Strahlentherapie durch Abtötung mikroskopischer Tumorherde das Risiko sowohl für ein Lokalrezidiv als auch für Fernmetastasen reduziert. Die hypofraktionierte Bestrahlung der ganzen Brust, bei der durch höhere Einzeldosen die Gesamtbehandlungszeit reduziert werden kann, bietet die gleiche Wirksamkeit und weniger akute Nebenwirkungen im Vergleich zur konventionell fraktionierten Strahlentherapie (Smith *et al.*, 2018).

(Haviland *et al.*, 2013; Shaitelman *et al.*, 2015). Bei Brustkrebs im Frühstadium liefert die Teilbrustbestrahlung mit reduzierter Dosis im Vergleich zur Standard-Ganzbrustbestrahlung vergleichbare Lokalrezidivrate und vergleichbare späte Nebenwirkungen (Coles *et al.*, 2017). Aufgrund fehlender Langzeitergebnisse hinsichtlich der Überlebensrate ist die Teilbrustbestrahlung jedoch keine Standardtherapie. Neben der verbreiteten Teletherapie, bei der die Bestrahlung von außen erfolgt, werden Brachytherapie (Keisch *et al.*, 2003), intraoperative Strahlentherapie (Vaidya *et al.*, 2010) und Hyperthermie (Group, 1996) zur adjuvanten Behandlung von Brustkrebs eingesetzt.

Bei Patientinnen mit fortgeschrittener Erkrankung kann eine palliativen Strahlentherapie zur Linderung von Schmerzen durch Knochenmetastasen eingesetzt werden (Souchon *et al.*, 2009). Der Einsatz hochdosierter Bestrahlung der Metastasen bei Patientinnen mit begrenzter

Fernmetastasierung (Oligometastasierung) ist aktuell Gegenstand klinischer Studien (Palma *et al.*, 2019).

Systemische Therapie

Zur systemischen Therapie von Brustkrebs können Chemotherapie, Hormontherapie und *targeted therapies*, wie der monoklonale anti-Her2-Antikörper Trastuzumab, eingesetzt werden. Bei der adjuvanten Behandlung nach chirurgischer Resektion kann eine systemische Therapie das Risiko für lokale Rezidive und Fernmetastasen reduzieren. Im lokal fortgeschrittenen Stadium kann durch eine neoadjuvante Systemtherapie die Tumormasse reduziert werden, um die Operabilität zu erreichen, oder eine weniger radikale Operation zu ermöglichen. Im späten Stadium der Erkrankung mit Fernmetastasen, in dem eine Resektion nicht mehr indiziert ist, kann die systemische Therapie als Teil eines palliativen Behandlungskonzept eingesetzt werden. Die Auswahl der Systemtherapie richtet sich vor allem nach dem Rezeptorstatus des Tumors. Patientinnen mit ER- und/oder PR-positiven Tumoren sind sensitiv für Hormontherapien. Prämenopausale Patientinnen können mit Östrogenrezeptormodulatoren wie Tamoxifen oder Aromatasehemmern wie Letrozol, ggf. in Kombination mit der Ausschaltung der Ovarialfunktion, behandelt werden. Die zusätzliche Ausschaltung der Ovarialfunktion ist nur bei Patientinnen mit hohem Risikoprofil empfohlen, bei denen eine Verlängerung des krankheitsfreien Überlebens und eine Reduktion von Fernmetastasen gezeigt werden konnte (Burstein *et al.*, 2016). Die Ausschaltung der Ovarialfunktion ist mit einer erheblichen Zunahme von Wechseljahrsbeschwerden, sexuellen Funktionsstörungen und verminderter Lebensqualität verbunden. Bei postmenopausalen Patientin können Östrogenrezeptormodulatoren und Aromatasehemmer eingesetzt werden, um die Rezidivrate zu reduzieren (Group, 2009; Ruhstaller *et al.*, 2019). Bei Patientinnen mit Her2-positiven Tumoren kann durch Kombination einer adjuvanten Chemotherapie mit Trastuzumab eine Verbesserung der Überlebenszeit erreicht werden (Slamon *et al.*, 2011). Patientinnen mit einem triple negativen Brusttumor, bzw. mit dem *basal-like* Subtyp, können von einer adjuvanten oder primären Chemotherapie mit Anthrazyklinen, Taxanen oder einem plantinhaltigen Zytostatikum profitieren (Isakoff, 2010).

1.2 Funktionen der Homologen Rekombination zum Erhalt der genomischen Integrität

Die Homologe Rekombination (HR) ist ein wichtiger DNA-Reparaturmechanismus, insbesondere für DSBs. Darüber hinaus sind HR-Proteine an der DNA-Schadensantwort (*DNA damage response*, DDR) und dem Replikationsgabelschutz beteiligt. Damit ist die HR von entscheidender Bedeutung für den Erhalt der genomischen Integrität. Auf zellulärer Ebene führen Defekte der HR zu Chromosomenaberrationen, heterozygote Keimbahnmutationen in HR-Genen sind mit einer Krebsveranlagung assoziiert, während homozygote Defekte bereits in der embryonalen Entwicklung tödlich sind (Prakash *et al.*, 2015). Keimbahnmutationen in BRCA1 (*breast cancer susceptibility gene 1*) und BRCA2 (*breast cancer susceptibility gene 2*) sind insbesondere mit einem hohen Risiko für Brust- und Eierstockkrebs assoziiert. BRCA1 und BRCA2 sind entscheidende Mediatoren der HR. Weitere HR-Gene und Interaktionspartner von BRCA1/2, wie PALB2 (*partner and localizer of BRCA2*) und ABRAXAS1 (*BRCA1 A complex subunit abraxas 1*) wurden ebenfalls als Brustkrebs-Risikogene identifiziert (Erkko *et al.*, 2007; Solyom *et al.*, 2012). Da bereits heterozygote Keimbahnmutationen in HR-Genen zu einer Krebsveranlagung führen, muss eine Haploinsuffizienz für den Erhalt der genomischen Integrität bestehen. Die Mechanismen, über die Mutationen in HR-Genen zur Tumorentstehung beitragen, sind komplex und die Rollen der verschiedenen Interaktionspartner zum Teil unklar.

1.2.1 Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen

DSBs sind biologisch bedeutsame DNA-Schäden, da sie die Integrität beider DNA-Stränge beeinträchtigen. Dadurch kann es zu chromosomalen Translokationen kommen, wodurch die genomische Integrität gefährdet wird. DSBs können durch ionisierende Strahlung und anderen genotoxischen Agenzien erzeugt werden oder als Nebenprodukte der DNA-Replikation auftreten (Roy, Chun and Powell, 2012). Die wichtigsten DSB-Reparaturwege sind die fehlerfreie HR und das fehlerhafte und damit potentiell mutagene *non-homologous end joining* (NHEJ) (Rothkamm *et al.*, 2003). Während die HR nur in der S-/G2-Phase des Zellzyklus aktiv ist, wenn die Schwesterchromatide verfügbar sind, kann das NHEJ während des gesamten Zellzyklus eingesetzt werden (Saleh-Gohari and Helleday, 2004; Prakash *et al.*, 2015). Weitere inakkurate Reparaturwege sind das *single strand annealing* (SSA) und das *alternative non-homologous end joining* (altNHEJ).

Abbildung 3 zeigt ein vereinfachtes Schema der Reparatur von DSBs durch HR und NHEJ. Das NHEJ ermöglicht eine effiziente, aber fehleranfällige DSB-Reparatur ohne die Sequenz des Schwesterchromatids als Vorlage (Mao *et al.*, 2008). Die Stabilisierung der DSB-Enden leitet das NHEJ ein (Prakash *et al.*, 2015). Dabei bindet zunächst der Ku70/80 Heterodimer an die Schadensstelle und rekrutiert die DNA-PKcs (*DNA-dependent protein kinase catalytic subunit*), eine PIKK (*PI3-kinase-related protein kinase*), die durch Autophosphorylierung den aktiven DNA-PK-Komplex bilden (Reddy *et al.*, 2004). Im Folgenden kommt es zur Prozessierung und Ligation der DSB-Enden. Der DNA-PKcs Komplex stimuliert die Nuklease Artemis zur Verarbeitung der DSB-Enden, wobei es zum Verlust von Nukleotiden kommt (Gu *et al.*, 2010). An der Ligation der DSBs sind XRCC4, DNA-Ligase IV und XLF beteiligt (Ahnesorg, Smith and Jackson, 2006). Die Folge dieser Reparatur sind Deletionen oder Insertionen an der Stelle des DSBs.

Die HR ermöglicht während der S-Phase, wenn das homologe Schwesterchromatid zur Verfügung steht, die fehlerfreie DSB-Reparatur. Die HR-vermittelte DSB-Reparatur ist komplex und dauert deutlich länger als das NHEJ (Mao *et al.*, 2008). Die HR wird durch Rekrutierung des von MRE11, RAD50 und NBS1 gebildeten MRN-Komplexes eingeleitet. Der MRN-Komplex reseziert die 5'-Bruchenden zu überhängender 3'-Einzelstrang-DNA (*single strand DNA*, ssDNA) (Daley *et al.*, 2015). Die entstehende ssDNA wird durch den DNA-bindenden Heterotrimer RPA (Replikationsprotein A) gebunden und stabilisiert (Inagaki, Schoenmakers and Baarends, 2010). Anschließend vermittelt BRCA2 die Ablösung von RPA und die Anlagerung von Rad51 (Liu *et al.*, 2010). Rad51 ist der zentrale Effektor der HR-vermittelten DSB-Reparatur. Es bildet Nukleoproteinfilamente, die für die Suche der homologen Sequenzen auf dem Schwesterchromatid und die Stranginvasion verantwortlich sind (Sigurdsson *et al.*, 2001). Nach der Stranginvasion synthetisieren Polymerasen vom 3'-Ende des homologen Strangs über die Sequenz des DSBs hinweg. Dabei bilden die DNA-Stränge mit ihren Matrizen eine doppelte *Holliday junction* aus (Bzymek *et al.*, 2010). Im letzten Schritt wird die *Holliday junction* aufgelöst. Die neu synthetisierten Stränge trennen sich von ihrer Matrize und binden wieder ihren ursprünglichen Partnerstrang. Dabei ist ein *Crossover* von Genmaterial möglich.

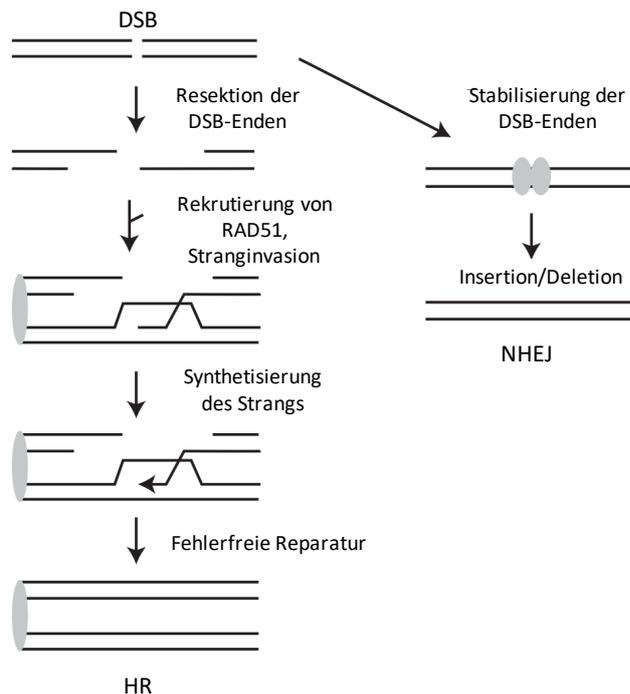


Abbildung 3: Vereinfachte schematische Darstellung der Reparatur von DSBs durch HR und NHEJ.

Modifiziert nach Prakash *et al.*, 2015.

Nach der Bestrahlung einer Zelle sind DSBs die biologisch bedeutsamsten Schäden. Obwohl die Mehrheit der bestrahlungsinduzierten DSBs durch NHEJ repariert werden (Dikomey *et al.*, 2016), zeigen Zellen mit HR-Defekten eine erhöhte Strahlensensitivität (Baeyens *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2004). Es ist unklar, inwiefern sich Defekte der HR klinisch auf die Strahlensensitivität von Krebspatienten auswirken (Kan and Zhang, 2015).

Eine kritische Bedeutung scheint die HR zudem bei der Reparatur von replikationsassoziierten DNA-Schäden zu haben. Darauf deutet hin, dass ein *knockout* des zentralen HR-Proteins Rad51 schon früh in der Embryogenese tödlich ist (Tsuzuki *et al.*, 1996). Die Letalität wird auf die gestörte Reparatur von Läsionen zurückgeführt, die während der DNA-Replikation in den schnell teilenden Zellen des Embryos entstehen (Prakash *et al.*, 2015). Neben der Reparatur von replikationsassoziierten Schäden spielt die HR auch eine Rolle beim Schutz von Replikationsgabeln. Die Bedeutung der verschiedenen HR-Proteine in diesem Zusammenhang ist deutlich weniger erforscht als bei der Reparatur von DSBs.

1.2.2 Replikationsgabelschutz

Die Replikation des Genoms lässt sich in drei Hauptschritte unterteilen: die Replikationsinitiation durch Aktivierung von Replikationsursprüngen, die Replikationsprogression durch bidirektionale Elongation an Replikationsgabeln sowie die Termination, beim Aufeinandertreffen von konvergierenden Replikationsgabeln (Ait Saada, Lambert and Carr, 2018). Für die Replikation des menschlichen Genoms steht eine Vielzahl von Replikationsursprüngen zur Verfügung, deren Aktivierung räumlich und zeitlich reguliert ist (Técher *et al.*, 2017). Nur ein Teil der potentiellen Replikationsursprünge wird für die Verdopplung des Genoms während einer normalen S-Phase benötigt. Eine exzessive Aktivierung von Replikationsursprüngen kann zur Erschöpfung der Replikationsfaktoren führen und ist daher nachteilig für den Erhalt der genomischen Integrität (Poli *et al.*, 2012). Bei einer verlangsamten Elongation kann durch eine erhöhte Aktivierung von Replikationsursprüngen der zeitgerechte Abschluss der Genomverdopplung vor dem Eintritt der Zellen in die Mitose ermöglicht werden.

Beeinträchtigungen der DNA-Replikation werden kollektiv als Replikationsstress bezeichnet. Replikationsstress gefährdet potentiell die genomische Integrität und ist daher für die Tumorgenese und Krebstherapie von Bedeutung (Gaillard, García-Muse and Aguilera, 2015). Replikationsgabeln, die unter Replikationsstress für längere Zeit angehalten werden, können funktionsunfähig werden. In diesem Fall kann entweder ein Neustart der angehaltenen Replikationsgabel oder die Fusion mit einer konvergierenden Replikationsgabel die Duplikation des Genoms sicherstellen. DNA-Stränge an unter Replikationsstress angehaltenen Replikationsgabeln sind anfällig für den Abbau durch Nukleasen wie MRE11 (Schlacher *et al.*, 2011). Da der exzessive Abbau der DNA-Stränge die genomische Integrität gefährdet, ist der Replikationsgabelschutz von großer Bedeutung. Verschiedene HR-Proteine besitzen eine Funktion beim Replikationsgabelschutz, die unabhängig von der DNA-Reparatur ist (Feng and Jasin, 2017). BRCA2 verhindert den Abbau der entstehenden DNA-Stränge und schützt so die Replikationsgabeln (Abb. 4). Während BRCA2-defiziente Zellen einen ausgeprägten Abbau der DNA-Stränge an angehaltenen Replikationsgabeln zeigen, ist der Neustart der Replikationsgabeln nicht beeinträchtigt (Schlacher *et al.*, 2011). Neben BRCA2 sind auch andere HR-Proteine, wie RAD51 und BRCA1, am Replikationsgabelschutz beteiligt (Schlacher *et al.*, 2011; Schlacher, Wu and Jasin, 2012). RAD51-Paraloge schützen angehaltene Replikationsgabeln vor dem Abbau durch Nukleasen und fördern Neustart der Replikation, wodurch der Zusammenbruch der Replikationsgabel verhindert wird (Somyajit *et al.*, 2015).

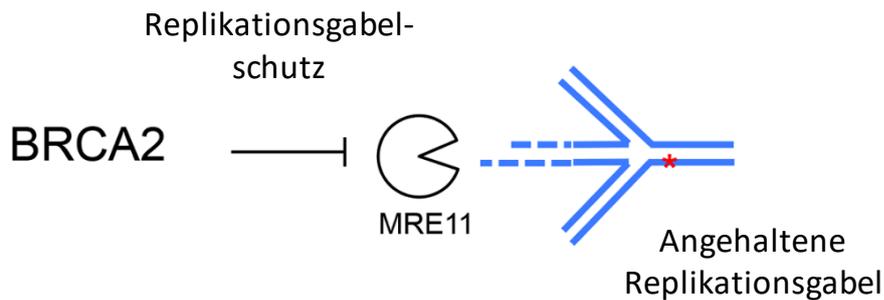


Abbildung 4: BRCA2 vermittelt den Replikationsgabelschutz durch Inhibition der Nuklease MRE11.
Modifiziert nach Feng and Jasin, 2017.

Der Replikationsgabelschutz könnte auch für die Krebstherapie von Bedeutung sein. So ist die Entwicklung von Resistenzen gegenüber PARP-Inhibitoren oder Chemotherapeutika in BRCA2-defizienten Tumorzellen eng mit dem Replikationsgabelschutz verbunden (Chaudhuri *et al.*, 2016; Ding *et al.*, 2016). Die Mechanismen, über die der Replikationsgabelschutz für die Tumorsuppression, das Therapieansprechen und der Resistenzentwicklung von Krebszellen verantwortlich ist, sind weitgehend unerforscht. Ein verbessertes Verständnis der Funktionen der HR-Proteine in diesem Zusammenhang könnte helfen, die Krebstherapie zu verbessern und die biologischen Prozesse der Entstehung von erblichem Brustkrebs zu erklären.

1.2.3 DNA-Schadensantwort und Zellzyklus-Kontrollpunkte

Neben der DSB-Reparatur und dem Replikationsgabelschutz ist die HR auch an weiteren Prozessen der DDR beteiligt. Dazu gehören die Erkennung von DNA-Schäden, die Signalvermittlung sowie die Aktivierung von Zellzyklus-Kontrollpunkten (Roy, Chun and Powell, 2012). Abbildung 5 zeigt eine Übersicht der Interaktionen der wichtigsten HR-Proteine, die sich entsprechend ihrer Funktion bei der DDR in Sensoren, Mediatoren und Effektoren unterteilen lassen. Das zentrale Effektorprotein ist RAD51. Die entscheidenden Mediatoren BRCA1 und BRCA2 werden von PALB2 (rot) verbunden. Über seine BRCT-Domäne bindet BRCA1 an das pSPxF-Motiv von ABRAXAS1 (rot), BRIP1 und CtIP, und bildet so drei BRCA1-Holoenzymkomplexe (BRCA1-A, BRCA1-B und BRCA1-C).

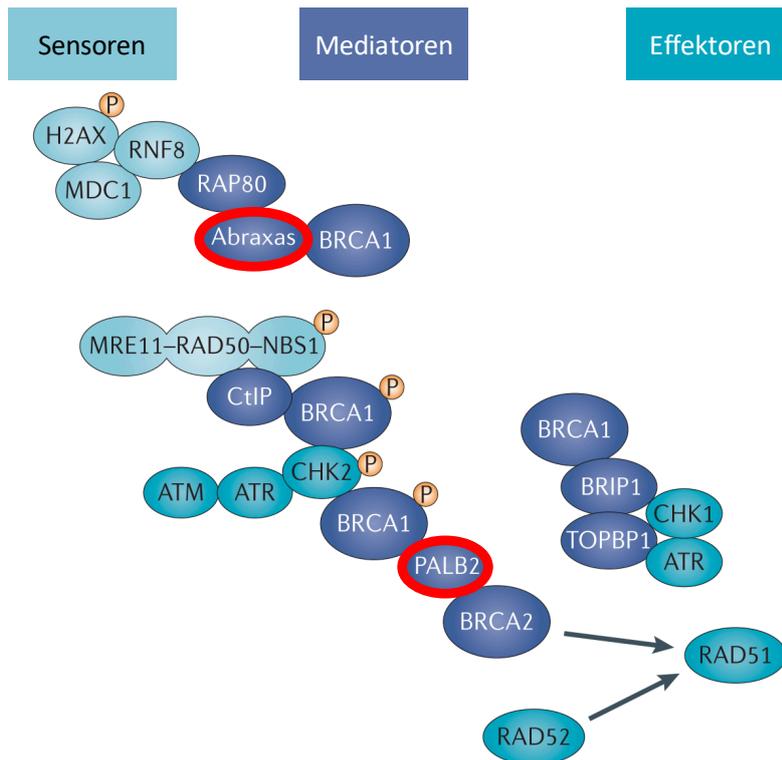


Abbildung 5: Interaktion der HR-Proteine bei der DDR.

Sensoren (hellblau) erkennen den DNA-Schaden, Mediatoren (dunkelblau) rekrutieren und aktivieren die Effektoren (türkis), die den DNA-Schaden reparieren und Zellzyklus-Kontrollpunkte aktivieren. Modifiziert nach Roy, Chun and Powell, 2012.

Zellzyklus-Kontrollpunkte sind Signalpfade, die den Ablauf des Zellzyklus regulieren. Insbesondere bei der Reaktion auf DNA-Schäden oder Replikationsstress sind sie von herausragender Bedeutung (Houtgraaf, Versmissen and van der Giessen, 2006). Die Kinase ATR (*ataxia telangiectasia mutated and rad3-related*) ist ein Hauptregulator der Zellzyklus-Kontrollpunkte und der HR (Maréchal and Zou, 2013). Die Aktivierung von ATR und seiner Effektor kinase Chk1 unterdrückt die Aktivierung von Replikationsursprüngen und hemmt die DNA-Synthese (Schwab, Blackford and Niedzwiedz, 2010). Die ATR stimuliert zudem die effiziente BRCA1-PALB2-Interaktion nach DNA-Schädigung und fördert die Lokalisierung von PALB2 an DNA-Schädigungsorten (Buisson *et al.*, 2017). Es ist unklar, ob ATR neben der DNA-Reparatur auch andere Funktionen der HR reguliert.

1.3 Erbllicher Brustkrebs durch Mutationen in Gene der Homologen Rekombination

Sporadischer Brustkrebs, bei dem nur eine oder wenige Frauen in einer Familie erkranken, macht die überwiegende Mehrheit der Brustkrebserkrankungen aus. Treten in Familien gehäuft und bereits in frühem Alter Brust- oder Eierstockkrebserkrankungen auf, so kann dies auf eine genetische Veranlagung für erblichen Brustkrebs hinweisen. Die Mehrzahl der Frauen mit erblichem Brustkrebs trägt eine krankheitsauslösende, heterozygote Keimbahnmutation der Brustkrebs-Risikogene BRCA1 oder BRCA2. Allerdings machen Keimbahnmutationen in BRCA1 und BRCA2 nur etwa 20% der familiären Brustkrebsfälle weltweit aus (Group, 2000). Genomische Untersuchungen in Populationen mit familiärem Brustkrebs konnten verschiedene Keimbahnmutationen in Interaktionspartnern von BRCA1 und BRCA2 identifizieren, die ebenfalls mit einem erhöhten Brustkrebsrisiko assoziiert sind (Walsh and King, 2007; Shuen and Foulkes, 2011; Walsh, 2015).

1.3.1 BRCA1 und BRCA2

BRCA1 und BRCA2 schützen als Tumorsuppressorgene die genomische Integrität (Roy, Chun and Powell, 2012). Die BRCA1 und BRCA2 Proteine sind an verschiedenen Mechanismen der DDR, der DNA-Reparatur und dem Schutz der DNA-Replikation beteiligt. Dabei interagieren BRCA1 und BRCA2 mit verschiedenen Proteinen und bilden Enzymkomplexe. Das kumulative Brustkrebsrisiko von BRCA1- und BRCA2-Mutationsträgerinnen beträgt bis zu 70% (Kuchenbaecker *et al.*, 2017). Weiterhin besteht ein erhöhtes Risiko für Ovarialkarzinome und kontralateralen Brustkrebs. Die Inzidenzrate von Brustkrebs ist insbesondere im frühen Erwachsenenalter zwischen 30 bis 40 Jahren bei BRCA1-Mutationsträgerinnen und im Alter von 40 bis 50 Jahren bei BRCA2-Mutationsträgerinnen deutlich erhöht (Kuchenbaecker *et al.*, 2017).

Die Abbildungen 6 und 7 zeigen schematische Darstellungen der BRCA1 und BRCA2 Proteine mit den Domänen der Proteine für die Interaktion mit ihren Bindungspartnern. Im Folgenden soll näher auf PALB2 und ABRAXAS1 eingegangen werden, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersucht wurden.

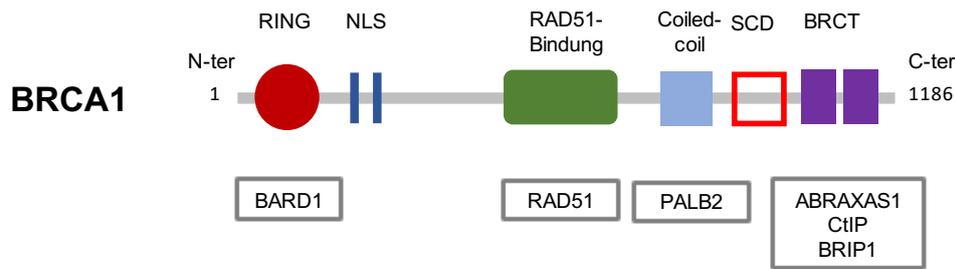


Abbildung 6: Das BRCA1 Protein mit seinen Domänen und ihren Bindungspartnern.

Schematische Darstellung des BRCA1-Proteins mit der RING-Domäne (dunkelrot), über die die Interaktion mit BARD1 (*BRCA1-associated RING domain protein 1*) erfolgt, der für die Kernlokalisierung erforderlichen NLS-Domäne (*nuclear localization signal*) (dunkelblau), der RAD51-Bindungsdomäne (grün), der *Coiled-coil*-Domäne (hellblau), die mit PALB2 interagiert, und den BRCT-Wiederholungsdomänen (violett), die ABRAXAS1, CtIP (*CtBP-interacting protein*) und BRIP1 (*BRCA1-interacting protein C-terminal helicase 1*) binden können. Das SCD (*SQ/TQ cluster domain*) (rot) Cluster enthält mehrere Domänen, an denen eine ATM-abhängige Phosphorylierung erfolgen kann. Modifiziert nach Roy, Chun und Powell, 2012; Gorodetska, Kozeretska und Dubrovskaja, 2019.

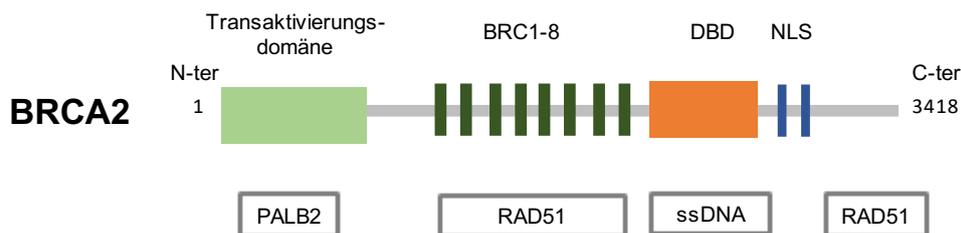


Abbildung 7: Das BRCA2 Protein mit seinen Domänen und ihren Bindungspartnern.

Schematische Darstellung des BRCA2-Proteins mit der Transaktivierungsdomäne (hellgrün), über die die Interaktion mit PALB2 erfolgt, den BRC-Wiederholungen 1-8 (dunkelgrün), über die RAD51 gebunden wird, der DNA-Bindungsdomäne (DBD) (orange), der NLS-Domäne (*nuclear localization signal*) (blau) sowie der C-terminalen (C-ter) Nicht-BRC RAD51-Bindungsstelle, welche am RAD51-vermittelten Replikationsgabelschutz beteiligt ist. Modifiziert nach Roy, Chun und Powell, 2012; Gorodetska, Kozeretska und Dubrovskaja, 2019.

1.3.2 PALB2

PALB2 interagiert sowohl mit BRCA1 als auch mit BRCA2 und ist durch seine Rolle bei dem DNA-Reparaturmechanismus HR und der Fanconi-Anämie (FA) an der Aufrechterhaltung der genomischen Integrität beteiligt (Nepomuceno *et al.*, 2017). Keimbahnmutationen in PALB2 wurden mit einem erhöhten Risiko für Brust- (Southey *et al.*, 2010) und Pankreaskrebs (Slater *et al.*, 2010) in Verbindung gebracht. In unselektierten Kohorten von Brustkrebspatientinnen

sind Prävalenzen zwischen 0,4% und 1% für PALB2-Mutationen beschrieben (Haanpää *et al.*, 2013; Teo *et al.*, 2013). Bei Patientinnen mit familiärem BRCA1/2-negativen Brustkrebs liegt die Prävalenz von Mutationen zum Teil deutlich höher.

Die c.1592delT Mutation in PALB2 liegt in 1% der finnischen Brustkrebspatientinnen vor (Haanpää *et al.*, 2013). Bei finnischen Patientinnen mit BRCA1/2-negativem familiären Brustkrebs liegt die Frequenz jedoch deutlich höher bei 4,8% (Haanpää *et al.*, 2013). Eine Mutation ist mit einem etwa 40%igen Risiko bis zum Alter von 70 Jahren an Brustkrebs zu erkranken assoziiert (Erkko *et al.*, 2008). Dies entspricht einem 6-fach erhöhten Brustkrebsrisiko (Erkko *et al.*, 2008). Das durchschnittliche Erkrankungsalter von PALB2 c.1592delT Trägerinnen (52,9 Jahre, Bereich: 39 – 73 Jahre) in der finnischen Population ist deutlich niedriger als von Patientinnen mit sporadischem Brustkrebs (57,8 Jahre, Bereich: 23 – 95 Jahre) (Erkko *et al.*, 2007), jedoch etwas höher als von finnischen Mutationsträgerinnen von BRCA1 (45,2 Jahre, Bereich: 32 – 57 Jahre) und BRCA2 (47,4 Jahre, Bereich: 45 – 67 Jahre) (Sarantaus *et al.*, 2000).

Die c.3113G>A Mutation in PALB2 wurde in 0,4% der Brustkrebsfällen in der australischen Bevölkerung identifiziert (Teo *et al.*, 2013). Das mediane Erkrankungsalter von c.3113G>A Mutationsträgerinnen (42 Jahre, Bereich: 32 – 79 Jahre) ist niedriger im Vergleich zu Patientinnen mit sporadischem Brustkrebs (45 Jahre) in der australischen Population (Teo *et al.*, 2013). In Familien mit der c.3113G>A Mutation wurde ein kumulatives Brustkrebsrisiko von 49% bis zum Alter von 50 Jahren und 91% bis zum Alter von 70 Jahren beschrieben (Southey *et al.*, 2010).

Die heterozygote c.2323C>T Mutation in PALB2 ist für etwa 0,5% der Brustkrebsdiagnosen bei französisch-kanadischen Frauen unter 50 Jahren verantwortlich (Foulkes *et al.*, 2007). Im Gegensatz dazu machen Mutationen in BRCA1/2 etwa 4,3% der Brustkrebserkrankungen in dieser Population aus (Oros *et al.*, 2004). Das mittlere Erkrankungsalter von Brustkrebspatientinnen mit der heterozygoten c.2323C>T Mutation in PALB2 in der französisch-kanadischen Population beträgt 43 Jahre (Bereich: 23 – 49 Jahre) (Foulkes *et al.*, 2007).

Abbildung 8 zeigt eine schematische Darstellung des PALB2 Proteins mit seinen funktionellen Domänen und ihren Interaktionspartnern. Zudem sind die Orte der pathogenen Mutationen c.1592delT, c.2323C>T, c.3113G>A und Y1108Sfs, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersucht wurden, markiert. Über seine N-terminale *Coiled-coil* Domäne interagiert PALB2 mit BRCA1 (Zhang *et al.*, 2009). BRCA2 interagiert mit PALB2 über die C-terminale WD40-Domäne (Oliver *et al.*, 2009). PALB2 verbindet somit BRCA1 und BRCA2 funktionell (Zhang

et al., 2009). Zudem verfügt PALB2 über zwei DNA-Bindungsdomänen (DBD und eine von den DBD unabhängige Domäne für die Bindung an Chromatin, das ChAM (*chromatine association motif*) (Bleuyard *et al.*, 2012). PALB2 interagiert mit RAD51 über zwei unabhängige Domänen. Einerseits über eine N-terminale Domäne, andererseits über die C-terminale WD40 Domäne (Dray *et al.*, 2010). Über eine weitere Domäne interagiert PALB2 mit dem von MORF4FL kodierten Protein MRG15, welches die HR stimuliert (Hayakawa *et al.*, 2010).

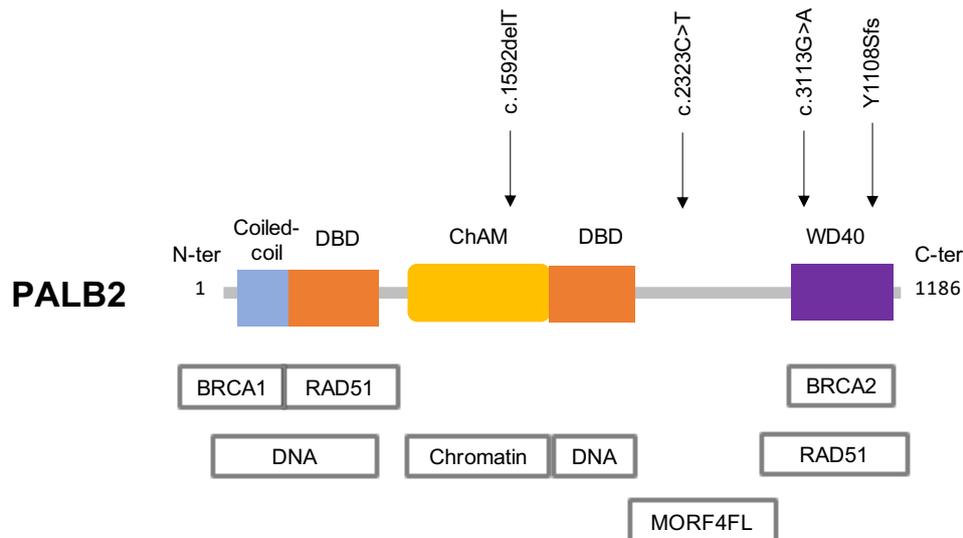


Abbildung 8: Das PALB2 Protein mit seinen Domänen, den jeweiligen Bindungspartnern und den untersuchten Mutationen.

Schematische Darstellung des PALB2-Proteins mit der *Coiled-coil* Domäne (hellblau), über die die Interaktion mit BRCA1 erfolgt, den DNA-Bindungsdomänen (DBD, orange), der ChAM-Domäne (*chromatin-association motif*, gelb), die unabhängig des DBD die Assoziation zu Chromatin vermittelt, sowie der c-terminalen (C-ter) WD40-Domäne (lila), über die direkt und unabhängig BRCA2 und RAD51 gebunden werden. Die Pfeile markieren die Orte der Veränderung des Transkripts durch die in dieser Arbeit untersuchten Mutationen. Modifiziert nach Erkko *et al.*, 2007; Foulkes *et al.*, 2007; Teo *et al.*, 2013.

Die meisten pathogenen Mutationen von PALB2 führen zu einem verkürzten, trunkierten Proteinprodukt. Dieses kann Bindungsstelle für Interaktionspartner verloren haben oder instabil sein, wodurch es zu einer Reduktion der Proteinmenge kommt. Die heterozygoten Mutationen können zudem einen dominant-negativen Effekt ausüben, wann das resultierende Proteinprodukt die Funktion des Wildtyp-Allels unterdrückt. Die Mutation c.1592delT in PALB2 führt zu einem hoch instabilen Proteinprodukt, das zudem einen dominant-negativ Effekt über die N-terminale BRCA1-Bindungsstelle ausüben könnte (Nikkilä *et al.*, 2013). Auf diesen dominant-negativen Effekt deutet hin, dass eine Überexpression des PALB2 c.1592delT-Genprodukts zu einer Zunahme fehleranfälliger DSB-Reparaturwege führt

(Obermeier *et al.*, 2015). Ob das PALB2 c.1592delT-Genprodukt auch einen vergleichbaren dominant-negativen Einfluss auf andere Prozesse hat, ist nicht klar. Die trunkierende Mutation c.3113G>A in PALB2 betrifft die C-terminale WD40-like-Domäne und beeinträchtigt die Bindung zu BRCA2 und RAD51, auch wenn ein stabiles Proteinprodukt entsteht (Teo *et al.*, 2013). Aus der c.2323C>T Mutation in PALB2 resultiert ein stabiles Protein, das jedoch die Bindungsstellen für einige der Bindungspartner verloren hat (Tischkowitz *et al.*, 2013). Die Y1108Sfs Mutation betrifft den C-Terminus von PALB2, ansonsten sind die Auswirkungen auf das Proteinprodukt unbekannt.

1.3.3 ABRAXAS1

ABRAXAS1 reguliert über seine Interaktion mit BRCA1 den DNA-Reparaturmechanismus HR und ist dadurch am Erhalt der genomischen Integrität beteiligt (Castillo *et al.*, 2014). Hereditärer Brustkrebs durch Mutationen in ABRAXAS1 ist insgesamt selten (Renault *et al.*, 2016). Die heterozygote c.1082G>A Mutation in ABRAXAS1 konnte jedoch bei 2,4% der Patientinnen mit familiärem Brustkrebs in Finnland nachgewiesen werden (Solyom *et al.*, 2012). Das durchschnittliche Erkrankungsalter der bestätigten ABRAXAS1-Mutation-positiven Brustkrebsfälle in der finnischen Population betrug 46 Jahre (Bereich: 35 bis 53 Jahre) (Solyom *et al.*, 2012), und ist damit vergleichbar mit finnischen BRCA1/2-Trägern (Sarantaus *et al.*, 2000) und niedriger als bei finnischen Trägern der heterozygote c.1592delT Mutation in PALB2 (Erkko *et al.*, 2007).

Abbildung 6 zeigt eine schematische Darstellung des ABRAXAS1 Proteins mit seinen funktionellen Domänen und ihren Interaktionspartnern. Zudem ist der Ort der pathogenen Mutation c.1082G>A, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersucht wurde, markiert. ABRAXAS1 ist das zentrale Gerüstprotein des BRCA1-A-Komplexes, der von BRCA1, ABRAXAS1, MERIT40, RAP80, BRCC45 und BRCC36 gebildet wird (Liu, Wu and Yu, 2007; Wang *et al.*, 2007; Jang *et al.*, 2015; Kyrieleis *et al.*, 2016; Bose *et al.*, 2019). Die NLS-Domäne ist für die Translokation des BRCA1-A-Komplexes in den Zellkern entscheidend, wo er an DNA-Schäden bindet (Solyom *et al.*, 2012). Über das C-terminale pSPxF-Motiv (phosphoryliertes Serin-Prolin-x-Phenylalanin) bindet ABRAXAS1 an die BRCT Domäne von BRCA1 (Wang *et al.*, 2007). Die BRCT Domäne von BRCA1 interagiert neben ABRAXAS1 auch mit BACH1 und CtIP (Wang, 2012). Da alle drei Komplexe um die Verfügbarkeit von BRCA1 konkurrieren, führt bspw. ein *knockdown* von ABRAXAS1 zu einer verstärkten Bildung der BRCA1-B- und BRCA1-C-Komplexe (Hu *et al.*, 2011). Die c.1082G>A Mutation

in ABRAXAS1 trunziert das Proteinprodukt in der NLS-Domäne, die an der Translokation des BRCA1-A-Komplexes in den Zellkern beteiligt ist (Bose *et al.*, 2019). Die NLS-Domäne von ABRAXAS1 ist bei verschiedenen Krebsarten von somatischen Mutationen betroffen (Castillo *et al.*, 2014).

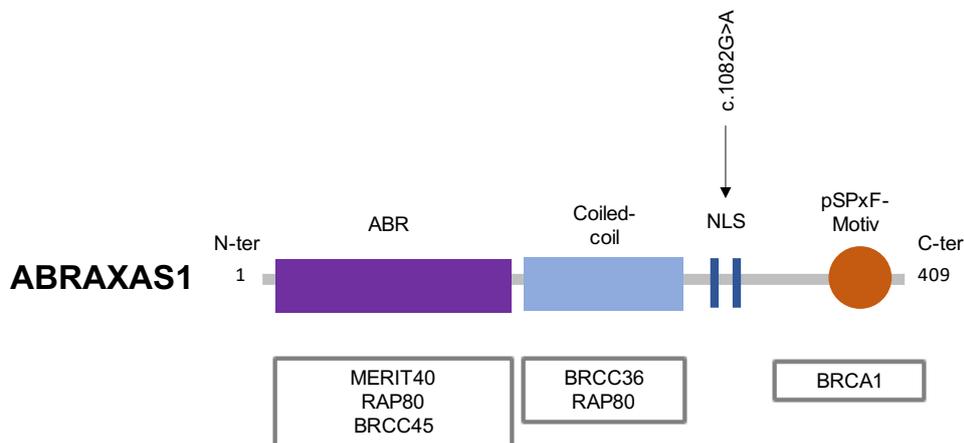


Abbildung 6: Das ABRAXAS1 Protein mit seinen Domänen, den jeweiligen Bindungspartnern und der untersuchten Mutation.

Schematische Darstellung des ABRAXAS1-Proteins mit der ABR-Domäne (lila), über die MERIT40, RAP80 und BRCC45 gebunden werden, der *Coiled-coil*-Domäne (hellblau), über die BRCC36 und RAP80 gebunden werden, der NLS-Domäne (blau) und das c-terminale, pSPxF-Motiv, über das ABRAXAS1 direkt an die BRCT-Motive von BRCA1 bindet, um so als zentraler Organisator des BRCA1-A-Komplexes zu agieren. Der Pfeil markiert den Ort der Veränderungen des Transkripts durch die in dieser Arbeit untersuchte Mutation. Modifiziert nach Solyom *et al.*, 2012; Wu *et al.*, 2016.

1.4 Ziel der Arbeit

Mutationen in HR-Genen sind mit einem hohen Risiko für Brust- und Eierstockkrebs assoziiert. Die Mechanismen, die hinter der Tumorgenese stehen, sind weitgehend unbekannt. Defekte in HR-Genen können zudem potentiell durch *targeted therapies* in der Krebstherapie ausgenutzt werden. Ein besseres Verständnis der zellulären Funktionen der verschiedenen HR-Proteine könnte helfen, Patientinnen für gezielte Therapien zu identifizieren, Resistenzen der Tumoren abzuwenden sowie erbliche Krebserkrankungen besser zu verstehen. Insbesondere die Funktion der HR für den Replikationsgabelschutz ist noch wenig erforscht und daher von besonderem Interesse.

Durch ihre Funktion bei der DNA-Reparatur wäre denkbar, dass sich genomische Veränderungen von PALB2 oder ABRAXAS1 auf die Strahlensensitivität von Krebspatienten

auswirken. Auch wenn pathogene Mutationen in PALB2 und ABRAXAS1 selten sind, könnten die Expression in Tumorpatientinnen eine prädiktive Rolle für das Therapieansprechen haben. Um dies zu untersuchen, wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit zunächst in einer Metaanalyse zweier Brustkrebsdatenbanken die Auswirkungen der mRNA-Expression von PALB2 und ABRAXAS1 auf die Überlebenszeit generell sowie den Überlebensvorteil nach Bestrahlung untersucht.

In Anbetracht der bedeutenden Rolle von PALB2 als Bindungspartner von BRCA1 und BRCA2 für die Regulierung der RAD51-Aktivität, wäre denkbar, dass der Replikationsgabelschutz in PALB2-Mutationsträgern beeinträchtigt ist (Petermann, Woodcock and Helleday, 2010). Mutationen in ABRAXAS1 stören die Kernlokalisierung von BRCA1 und beeinträchtigen dadurch die DDR (Bose *et al.*, 2019). Ob sich diese Fehlregulation auch auf die Replikation auswirkt, ist unklar. Um die Auswirkungen von verschiedenen heterozygoten Mutationen in PALB2 und ABRAXAS1 auf die DNA-Replikation zu untersuchen wurden in primären, humanen Zelllinien die Replikationsstrukturen auf Nukleotidebene mit der DNA Fiber Assay Technik nachgewiesen. Die Replikation wurde dabei im unbehandelten Zustand, nach Hydroxyurea-induzierter Unterbrechung der Replikation sowie nach DNA-Schädigung durch Bestrahlung untersucht, um die Auswirkung verschiedener Formen von Replikationsstress zu vergleichen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Zelllinien

Die verwendeten humanen lymphoblastoiden Zelllinien, wurde aus durch das Epstein-Barr-Virus immortalisierten B-Lymphozyten erzeugt. Die B-Lymphozyten wurden aus frischen peripheren Blutproben von gesunden und an Krebs erkrankten Mutationsträgerinnen sowie Kontrollpersonen gewonnen. Die Kontrollpersonen mit Wildtyp des Allels sind jeweils geographisch und ethnisch derselben Herkunft wie die Mutationsträger. Jede Zelllinie entspricht einer Person.

Tabelle 3: Lymphoblastoide Zelllinien von Mutationsträgerinnen und Kontrollpersonen.

Mutationsstatus (heterozygot)	Herkunft	Anzahl der Zelllinien
<i>ABRAXAS1</i> c.1082G>A	Nord-Finnland	7
<i>PALB2</i> c.1592delT	Nord-Finnland	11
Wildtyp	Nord-Finnland	9
<i>PALB2</i> c.2323C>T	Kanada I	9
Wildtyp	Kanada I	11
<i>PALB2</i> Y1108Sfs	Kanada II	3
Wildtyp	Kanada II	5
<i>PALB2</i> c.3113G>A	Australien	12
Wildtyp	Australien	18

2.1.2 Antikörper

Tabelle 4: Primäre Antikörper.

Antikörper	Hersteller	Konzentration
Anti BrdU rat monoclonal IgG2a	Abd Serotec, Oxford, UK	1:1000 in PBS + 1% BSA + 0.1% Tween20
Anti-BrdU (Clone B44) mouse monoclonal IgG	Becton Dickinson, New Jersey, USA	1:1500 in PBS + 1% BSA + 0.1% Tween20

Tabelle 6: Sekundäre Antikörper.

Antikörper	Hersteller	Konzentration
-------------------	-------------------	----------------------

Alexa Fluor® 555 Goat anti-rat IgG (H+L)	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland	1:500 in PBS + 1% BSA + 0.1% Tween20
Alexa Fluor® 488 Goat anti-mouse IgG (H+L)	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland	1:500 in PBS + 1% BSA + 0.1% Tween20

2.1.3 Zellmedien und Reagenzien

Tabelle 5: Zellmedien und Reagenzien.

Kennzeichnung	Hersteller
Fötale Kälberserum (FKS)	Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland
Roswell Park Memorial Institute Medium (RPMI)	Sigma-Aldrich®, Steinheim, Deutschland
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland

2.1.4 Puffer und Lösungen

Tabelle 6: Puffer und Lösungen

Kennzeichnung	Zusammensetzung
Blockierungslösung	1xPBS, 3 % BSA-Pulver
CldU-Medium	2,5 mM CldU in DMEM und 10% FKS
Einfriermedium	10 % DMSO und 90 % FKS
70% Ethanol	70% Ethanol
HCL-Lösung	2,5 mM HCL-Lösung
IdU-Medium	2,5 mM CldU in DMEM und 10% FKS
4 % Paraformaldehyd	4 % Paraformaldehyd in 1xPBS
0,5% SDS	0,5% SDS in destilliertem H ₂ O
Lysepuffer	200mM Tris-HCL (pH: 7,4), 50mM EDTA, 0,5% SDS
Waschlösung	1xPBS, 1 % BSA und 0,1 % Tween20

2.1.5 Verbrauchsmaterialien

Die Verbrauchsmaterialien wurden von Becton Dickinson (Heidelberg, Deutschland), B. Braun (Melsungen, Deutschland), Corning (Corning, New York, USA), Eppendorf (Hamburg, Deutschland) und Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland) bezogen. Cellstar Zellkulturflaschen

wurden von Greiner Bio-One (Frickenhausen, Deutschland) bezogen, 6-Well-Zellkulturplatten von Becton Dickinson (Heidelberg, Deutschland). Deckgläser und Objektträger wurden von Paul Marienfeld (Lauda-Königshofen, Deutschland) bezogen, Plastik Coverslips von Appligene-Oncor (Illkirch-Graffenstaden, Frankreich) und das Vectorshield Mounting Medium von Vector Laboratories (Burlingame, USA).

2.1.6 Geräte

Tabelle 7: Geräte.

Kennzeichnung	Hersteller
Autoklav (Evo® 45)	Mediatech, Norderstedt, Deutschland
Brutschrank (BB 16 CU)	Heraeus®, Hanau, Deutschland
Zellzahlzähler (Coulter Counter Z1™)	BeckmannCoulter™, Krefeld, Deutschland
Eismaschine (FM-120DE-50)	Hoshizaki, Amsterdam, Niederlande
Heizblock (Thermostat 5320)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Kolbenhubpipetten (0,5-10 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Magnetrührer (Ikamag™ Ret)	IKA™ Labortechnik, Staufen, Deutschland
Mikroskop (Axio Observer Z1)	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Göttingen, Deutschland
Schüttler (Polymax 1040)	Carl Roth®, Karlsruhe, Deutschland
Sterile Werkbank (HeraSafe®)	Heraeus®, Hanau, Deutschland
Vakuumpumpe (Oerlikon Leybold Vacuum)	Leybold GmbH, Pfäffikon, Schweiz
Vortexer (Vortex-Genie® 2)	Scientific Industries, Bohemia, USA
Waagen (P1200, AE160)	Mettler Toledo, Giesen, Deutschland
Wärmeschrank (Modell 400)	Memmert, Schwabach, Deutschland
Wasserbad (WD19/D3)	Thermo Haake GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Zentrifugen (Labofuge® 400R)	Heraeus®, Hanau, Deutschland
(Microfuge® R)	BeckmanCoulter™, Krefeld, Deutschland
(Megafuge® 1.0)	Heraeus®, Hanau, Deutschland

2.1.7 Software und Datenbanken

Tabelle 8: Software und Datenbanken

Software/Datenbank	Hersteller/Entwickler
AxioVision Rel 4.7	Carl Zeiss, Jena, Deutschland

cBioPortal for Cancer Genomics (www.cbioportal.com)	Center for Molecular Oncology, Memorial Sloan Kettering Cancer Center, New York, USA
GraphPad PRISM Version 5.0	Graphpad Software, Inc, USA
ImageJ	National Institutes of Health, Laboratory for Optical and Computational Instrumentation (University of Wisconsin)
R Version 3.5.3	R Core Team
Survminer	Alboukadel Kassambara: http://www.sthda.com/english/rpkgs/survminer/

2.2 Methoden

2.2.1 Metaanalyse zum Einfluss der Genexpression auf das Überleben nach Strahlentherapie

Die Metaanalyse ist ein quantitatives, epidemiologisches Studiendesign zur systematischen Bewertung früherer wissenschaftlicher Arbeit, um daraus Schlussfolgerungen über das Forschungsgebiet abzuleiten (Haidich, 2010). Sie ermöglicht die qualitative Auswertung von komplexen und manchmal scheinbar widersprüchlichen Datensätzen. Die gepoolte Analyse mehrerer Studien kann genauere Schätzungen bezüglich des Behandlungserfolgs von Therapien oder den Risikofaktoren von Erkrankungen ermöglichen, als einzelne Studien allein. Die Metaanalyse kann daher ein nützliches Instrument der evidenzbasierten Medizin darstellen. Die Strahlentherapie ist eine etablierte adjuvante Behandlungsmodalität für Brustkrebspatientinnen. Allerdings profitieren nicht alle Patientinnen von einer Strahlentherapie und hätten von der Behandlung mit den verbundenen Nebenwirkungen verschont bleiben können. Gegenwärtig fehlen jedoch zuverlässige Biomarker für das Ansprechen auf eine Strahlentherapie, so dass in der aktuellen klinischen Praxis alle Patientinnen, die sich einer Brustkrebsoperation unterziehen, für eine Strahlentherapie in Betracht gezogen werden. Die freie Verfügbarkeit umfangreicher genomischer und klinischer Krebsdatensätze könnte die Identifizierung von Biomarkern ermöglichen, um ein Ansprechen auf Strahlentherapie vorherzusagen. Daher wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit eine Metaanalyse von zwei großen Brustkrebs-Datenbanken durchgeführt, um den Einfluss der mRNA-Expression von PALB2 und ABRAXAS1 auf das Überleben von Brustkrebspatientinnen sowie den Überlebensvorteil durch eine Strahlentherapie in Abhängigkeit des klinischen Stadiums oder des molekularen Subtyps zu bestimmen.

2.2.1.1 Beschaffung der Datensätze

Das *cBioPortal for Cancer Genomics* (www.cbioportal.org) wurde zur Beschaffung der genomischen und klinischen Datensätze eingesetzt. Das cBioPortal ist ein frei zugängliches Web-Portal, das multidimensionale Krebsgenomdaten bereitstellt (Cerami *et al.*, 2012; Gao *et al.*, 2014). Das Center for Molecular Oncology am Memorial Sloan Kettering Cancer Center hostet das cBioPortal. Die Software wird von einem Team entwickelt und gewartet, das aus Memorial Sloan Kettering Cancer Center, dem Dana Farber Cancer Institute, dem Princess Margaret Cancer Centre in Toronto, dem Children's Hospital of Philadelphia, The Hyve in den Niederlanden sowie der Bilkent-Universität in Ankara, Türkei, besteht.

2.2.1.2 Klinische und genomische Datensätze

Die *Molecular Taxonomy of Breast Cancer International Consortium* (METABRIC) Studie (Curtis *et al.*, 2012; Pereira *et al.*, 2016) umfasst primäre Proben von frisch gefrorenem Brustkrebs von Patientinnen aus Großbritannien und Kanada. Insgesamt hatten 1903 Patientinnen sowohl genomische Daten als auch Überlebenszeiten verfügbar.

Die Datenbank des *The Cancer Genome Atlas* (TCGA) Pan-Cancer Atlas (The Cancer Genome Atlas Network, 2012) umfasst Patientinnen mit neu diagnostiziertem invasivem Brustkrebs aus den USA. Bei 980 Patientinnen waren sowohl genomische Daten als auch Überlebenszeiten verfügbar.

2.2.1.3 Zusammenführung und Bereinigung der Datensätze

Die Datensätze wurden in der R Version 3.5.3 Software-Umgebung für statistische Berechnungen und Grafiken zusammengeführt und bereinigt. Für die Metaanalyse wurden aus der METABRIC und der TCGA Datenbank jeweils die 25% der Patientinnen mit der niedrigsten mRNA-Expression und die 25% mit der höchsten Expression identifiziert. Für die Überlebenszeitanalyse wurde das Gesamtüberleben der Patientinnen betrachtet. Nach einem maximalen Beobachtungszeitraum von 300 Monaten wurden die Patientinnen zensiert.

Um den Einfluss der mRNA-Expression von PALB2 bzw. ABRAXAS1 auf die Überlebenswahrscheinlichkeit generell zu untersuchen, wurden die Patientinnen mit der niedrigsten Expression aus METABRIC und TCGA verglichen mit denen mit der höchsten Expression. Um den Einfluss der mRNA-Expression von PALB2, bzw. ABRAXAS1, auf den Überlebensvorteil durch Strahlentherapie zu untersuchen, erfolgte zunächst die Stratifizierung der Patientinnen nach dem klinischen Stadium, bzw. dem molekularen Subtyp, sowie der

mRNA-Expression von PALB2, bzw. ABRAXAS1 (niedrige oder hohe Expression). Innerhalb jeder dieser Gruppen wurde die Überlebenswahrscheinlichkeit von Patientinnen, die mit einer Strahlentherapie behandelt wurden, verglichen mit Patientinnen, die nicht mit einer Strahlentherapie behandelt wurden.

Hinsichtlich des molekularen Subtyps wurde die Patientinnen mit *normal-like* Tumoren ausgeschlossen, wegen der vermuteten geringeren klinischen Relevanz, sowie die Patientinnen mit *claudin-low* Tumoren, da dieser nur in den METABRIC Daten verfügbar war.

2.2.1.4 Statistik

Zur Überlebenszeitanalyse nach Kaplan-Meier wurde in R Version 3.5.3 mit der *survminer* Bibliothek (Kassambara *et al.*, 2019) durchgeführt. Der Log-rank Test mit einem Signifikanzniveau von $\alpha=0,05$ wurde zum Vergleich der Überlebenskurven angewendet.

2.2.2 Zellkultur

Alle verwendeten Zelllinien waren humane lymphoblastoide Zelllinien, die in Suspension wachsen. Um lymphoblastoide Zelllinien zu erzeugen, wurde B-Lymphozyten aus frischen, peripheren Blutproben von Mutationsträgerinnen oder Kontrollpersonen durch das Epstein-Barr-Virus immortalisiert. Die Zelllinien wurden bis zu ihrer Verwendung in Einfriermedium aufbewahrt und in flüssigem Stickstoff bei -196 °C gelagert. Das Auftauen, die Überführung in das Zellkulturmedium sowie das Passagieren wurde an einer Laborbank unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Die lymphoblastoiden Zelllinien wurden in RPMI 1640-Medium kultiviert, das mit 20% FKS, 1% L-Glutamin und 10 $\mu\text{g/ml}$ Gentamycin ergänzt wurde. Alle Zellen wurden bei 37 °C in einer 5%igen CO_2 -Atmosphäre kultiviert. Jährlich wurden alle Zelllinien auf Mykoplasmenkontamination getestet und waren negativ.

2.2.3 DNA Fiber Assay

Mit dem DNA Fiber Assay lassen sich Initiation, Elongation und Termination der DNA-Replikation auf Nukleotidebene analysieren. Dazu werden replizierende Zellen nacheinander für jeweils 25 min die halogenierten Thymidinanaloga Chlordesoxyuridin (CldU) und Iododesoxyuridin (IdU) über das Zellmedium zugeführt und anstelle der Nukleinbase Thymidin während der Synthese-Phase (S-Phase) des Zellzyklus in die DNA eingebaut. Die Darstellung

replizierter DNA in Chromatinfasern erfolgt anschließend durch Immunfärbung der Thymidinanaloga.

2.2.3.1 Markierung mit IdU und CldU

Exponentiell wachsende lymphoblastoide Zelllinien wurden für 25 min mit 0,025 mM CldU-haltigem Medium im 5% CO₂ Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die Proben in Mikroreaktionsgefäße überführt und für 5 min mit 1.200 U/min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Das CldU-haltige Medium wurde abgesaugt und die Zellen anschließend für 25 min mit 0,25 mM IdU-haltigem Medium im 5% CO₂ Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die Proben in Mikroreaktionsgefäße überführt und für 5 min mit 1.200 U/min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Ab diesem Zeitpunkt wurden die Zellen ständig auf Eis gehalten. Das IdU-haltige Medium wurde anschließend abgesaugt und die Zellen mit eiskaltem PBS zweimal gewaschen. Die Zellzahl in der Zellsuspension wurde mittels Coulter Counter bestimmt und auf 5×10^6 /ml eingestellt. Im nächsten Schritt wurde die DNA der Zellen auf Objektträgern gespreizt.

2.2.3.2 Spreizen der markierten DNA auf Objektträgern

Für die Präparation der DNA aus den Zellen wurden pro Versuch 2 µl der Zellsuspension auf einen Objektträger pipettiert und zur besseren Haftung für 5 min trocknen gelassen. Anschließend wurden 7 µl des Lysepuffers für 2 min auf die Zellen gegeben. Eine Zugabe von 7 µl des Lysepuffers auf die Zellsuspension erfolgte für 2 min. Hierdurch kommt es zum Platzen der Zellen und zur Denaturierung der zellulären Proteine. Zum Spreizen der DNA wurde der Objektträger gekippt und mit einem Winkel von etwa 15° leicht schräg aufgestellt, so dass der Tropfen aus Zellen und Lysepuffer bis zum Ende des Objektträgers herunterlief. Anschließend wurde der Objektträger luftgetrocknet und in Methanol/Essigsäure (3:1) für 10 min fixiert. Die so präparierten Objektträger wurden bei -20°C über Nacht gelagert.

2.2.3.3 Immunfärbung der Chromatinfasern

Zunächst wurden die Objektträger zur Rehydrierung der DNA einmal für 5 min mit H₂O gespült. Zur Denaturierung der DNA wurden die Objektträger einmal für 5 min mit 2,5 M HCL äquilibriert und danach für weitere 75 min mit 2,5 M HCL inkubiert. Die Objektträger wurden im Anschluss dreimal kurz in PBS gespült, bevor, zur Vermeidung unspezifischer Bindungen der Antikörper, die Blockierung mit Waschlösung für 1 h erfolgte. Für die Detektion der CldU-Nukleotide wurde ein primärer, monoklonaler anti-BrdU aus der Ratte eingesetzt (siehe

Abschnitt 2.1.2). Die Objektträger wurden mit 115 µl der primären Antikörper-Lösung versehen und mit einem Deckglas abgedeckt, um die Lösung gleichmäßig auf dem Objektträger zu verteilen. Anschließend erfolgte die Inkubation für 1 h bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer. Die Objektträger wurden im Anschluss erneut einmal kurz und dreimal für 10 min mit Waschlösung gewaschen. Im nächsten Schritt erfolgte die Fixation der DNA und der gebundenen Antikörper mit 4 % Paraformaldehyd für 10 min. Anschließend wurden die Objektträger einmal kurz und dreimal für 10 min mit Waschlösung gewaschen. Für die Detektion des anti-BrdU-Antikörpers wurde nun ein sekundärer anti-rat AlexaFluor 555 (siehe Abschnitt 2.1.2) eingesetzt. Die folgenden Schritte wurden ohne direkte Lichteinstrahlung durchgeführt. Die Objektträger wurden mit 115 µl der sekundären Antikörper-Lösung bedeckt, mit einem Deckglas versehen und für 1,5 h bei Raumtemperatur in einer feuchten, abgedunkelten Kammer inkubiert. Im Anschluss wurden die Objektträger einmal kurz und dreimal für 10 min mit Waschlösung gewaschen.

Die IdU-Nukleotide wurden nun mit dem primären monoklonalen anti-BrdU Antikörper aus der Maus (siehe Abschnitt 2.1.2), 1:1500 verdünnt in Waschlösung, detektiert. Jeder Objektträger wurde dazu mit 115 µl der primären Antikörper-Lösung bedeckt und über Nacht im Kühlraum in einer feuchten Kammer inkubiert. Die Objektträger wurden anschließend einmal kurz und dreimal für 10 min mit Waschlösung gewaschen. Zur Detektion des anti-BrdU-Antikörpers aus der Maus wurde ein sekundärer anti-mouse AlexaFluor 488 (siehe Abschnitt 2.1.2), 1:500 in Waschlösung verdünnt, eingesetzt. Dazu wurden die Objektträger mit jeweils 115 µl der sekundären Antikörper-Lösung versehen, mit einem Deckglas abgedeckt und für 1,5 h bei Raumtemperatur in einer feuchten, abgedunkelten Kammer inkubiert. Die Objektträger wurden im Anschluss erneut einmal kurz und dreimal für 10 min mit der Waschlösung gewaschen. Die Objektträger wurden nun mit dem Eindeckmittel Vectashield mounting medium bedeckt, mit Glas verschlossen und mit Nagellack versiegelt und bei -20°C gelagert.

2.2.3.4 Aufnahmen im Fluoreszenzmikroskop

Für die Analyse der Chromatin Fasern wurden mit einem 63er Öl-Objektiv Bildaufnahmen gemacht. Zur Detektion des sekundären Fluoreszenz-Antikörpers AlexaFluor 555 wurde der Filtersatz 43 verwendet. Der sekundären Fluoreszenz-Antikörper AlexaFluor 488 wurde mit dem Filtersatz 38 detektiert. Das Programm AxioVision wurde zum Erstellen der Aufnahmen eingesetzt.

2.2.3.5 Auswertung mit ImageJ

Für die Auswertung der Chromatinfasern wurden pro Objektträger mindestens 10 Fluoreszenzaufnahmen gemacht. Das *open source* Bildverarbeitungsprogramm ImageJ wurde zur Analyse der Aufnahmen verwendet. Die verschiedenen Replikationsstrukturen wurden mit dem ImageJ Plug-In *Analyze* ausgewertet. Die Messung der Länge der Chromatinfasern erfolgte mit dem ImageJ Plug-In *Segmented lines*. Die in ImageJ gemessene Länge der Chromatinfasern wurden mit einem für das Mikroskop spezifischen Umrechnungsfaktor von 9,8 in μm umgerechnet. Um die Elongationsrate in Kilobasen pro Minute (kb/min) zu bestimmen, wurde die Länge der Chromatinfasern zunächst von μm in kb umgerechnet. Dafür wurde der Umrechnungsfaktor $1 \mu\text{m} = 2,59 \text{ kb}$ verwendet (Jackson and Pombo, 1998).

2.2.3.6 Statistik

Die statistischen Auswertungen erfolgten mit dem Programm GraphPad PRISM Version 8.4.0 (Graphpad Software, Inc, USA). Bei den dargestellten Werten handelt es sich jeweils um Mittelwerte mit dem Standardfehler des Mittelwerts (*standard error of mean*, SEM) von drei unabhängigen Experimenten. Jeder Datenpunkt entspricht drei unabhängigen Experimenten. Unterschiede zwischen zwei Gruppen wurden durch einen zweiseitigen Students t-Test mit einem Signifikanzniveau von $\alpha=0,05$ bestimmt.

3 Ergebnisse

3.1 Bedeutung der mRNA-Expression von PALB2 und ABRAXAS1 für das Gesamtüberleben und den Überlebensvorteil durch Strahlentherapie von Brustkrebspatientinnen

Generell zeigte sich eine längere Überlebenszeit von Brustkrebspatientinnen, die mit einer Strahlentherapie behandelt werden (Mao *et al.*, 2017) in einer Metaanalyse von Daten der METABRIC Studie (Curtis *et al.*, 2012; Pereira *et al.*, 2016) und des TCGA Pan-Cancer Atlas (The Cancer Genome Atlas Network, 2012). Der Überlebensvorteil durch Strahlentherapie war jedoch abhängig vom klinischen Stadium und dem molekularen Subtyp des Brustkrebses. Brustkrebspatientinnen im klinischen Stadium II oder mit den molekularen Subtypen Luminal-A und *basal-like* profitierten von einer Strahlentherapie. Demgegenüber zeigte sich bei Patientinnen mit den molekularen Subtypen Luminal-B und *Her2-enriched* kein Überlebensvorteil durch Strahlentherapie. Prädiktive Biomarker könnten helfen das Ansprechen von Tumoren auf eine Strahlentherapie vorherzusagen. So könnten Patientinnen, die am ehesten von einer Strahlentherapie profitieren werden, identifiziert werden. Dies wäre ein Schritt hin zu einer stärker personalisierten Brustkrebsbehandlung mit dem Ziel, Überbehandlungen mit Strahlentherapie zu reduzieren und gleichzeitig die Mortalität niedrig zu halten.

Es konnte gezeigt werden, dass bereits eine Haploinsuffizienz der Gene PALB2 und ABRAXAS1 mehrere Funktionen des DNA-Reparaturkomplexes HR in primären Zellen von Brustkrebspatientinnen beeinträchtigt (Nikkilä *et al.*, 2013; Bose *et al.*, 2019). Diese Beeinträchtigung führte zu einer reduzierten mRNA-Expression der beiden Gene und resultierte in einer erhöhten genomischen Instabilität, welche als Auslöser der Brustkrebs-Tumorgenese angesehen wird. Der HR Komplex ist zudem an der Reparatur von durch ionisierende Bestrahlung induzierten DSBs beteiligt.

Unklar ist, ob sich die Expression von PALB2 und ABRAXAS1 klinisch auf das Überleben von Patientinnen oder das Ansprechen auf Strahlentherapie auswirkt, und so als prognostischer oder prädiktiver Marker infrage kommen könnte. Zur Klärung dieser Fragestellungen wurden in einer Metaanalyse die mRNA-Expressions- und Überlebensdaten von Brustkrebspatientinnen der METABRIC Studie (n=1903) und des TCGA Pan-Cancer Atlas (n=980) ausgewertet. Dabei wurde überprüft, ob sich die mRNA-Expression generell auf das Überleben auswirkt. Weiterhin wurde der Einfluss der mRNA-Expression auf den

Überlebensvorteil durch Strahlentherapie generell sowie abhängig vom klinischen Stadium und dem molekularen Subtyp des Tumors untersucht.

3.1.1 Kein Einfluss der mRNA-Expression von PALB2 und ABRAXAS1 auf das Gesamtüberleben

Für die Analysen wurden die mRNA-Expression von PALB2 und ABRAXAS1 und der Überlebenszeitraum von 1903 Brustkrebspatientinnen aus der METABRIC Studie und 980 Brustkrebspatientinnen aus dem TCGA Pan-Cancer Atlas ausgewertet. Dabei wurde das Gesamtüberleben der Patientinnen berücksichtigt. Es wurde ein Zeitraum von 300 Monaten nach Therapie betrachtet. Es wurden die 25% der Patientinnen mit der niedrigsten mRNA-Expression den 25% mit der höchsten Expression aus den beiden Kohorten gegenübergestellt (METABRIC: n=952, TCGA: n=490). Tabelle 1 zeigt die klinischen Eigenschaften der analysierten Patientinnen.

Tabelle 9: Klinische Eigenschaften der analysierten Patientinnen der METABRIC Studie und des TCGA Pan-Cancer Atlas.

	<i>PALB2</i>				<i>ABRAXAS1</i>			
	niedrig		hoch		niedrig		hoch	
Gesamt	721		721		721		721	
Stadium								
<i>I</i>	179	25%	146	20%	124	17%	185	26%
<i>II</i>	332	46%	355	49%	387	54%	317	44%
<i>III</i>	87	12%	66	9%	82	11%	73	10%
<i>IV</i>	11	2%	4	1%	12	2%	6	1%
<i>NA</i>	112	16%	150	21%	116	16%	140	19%
Subtyp								
<i>Basal</i>	99	14%	109	15%	129	18%	68	9%
<i>Claudin-low*</i>	75	10%	20	3%	63	9%	51	7%
<i>Her2</i>	84	12%	65	9%	92	13%	54	7%
<i>LumA</i>	286	40%	279	39%	231	32%	328	45%
<i>LumB</i>	96	13%	231	32%	157	22%	182	25%
<i>Normal</i>	74	10%	12	2%	43	6%	36	5%
<i>NC*</i>	3	0%	0	0%	3	0%	0	0%

NA	4	1%	5	1%	3	0%	2	0%
Strahlentherapie								
Nein	297	41%	283	39%	307	43%	286	40%
Ja	410	57%	409	57%	396	55%	406	56%
NA	14	2%	29	4%	18	2%	29	4%
Alter bei Diagnose								
Median (Jahre)	60,2		61,0		60,8		60,2	
>60 Jahre	363	50%	375	52%	375	52%	366	51%
≤60 Jahre	358	50%	346	48%	346	48%	355	49%

Abkürzungen: Basal: *basal-like*, LumA: Luminal-A, LumB: Luminal-B, Her2: *Her2-enriched*, Normal: *normal-like*, NC: nicht klassifizierbar, NA: nicht angegeben, *: nur in METABRIC.

Abbildung 7 zeigt das Gesamtüberleben des unteren Quartils (niedrig) im Vergleich zum oberen Quartil (hoch) für PALB2 (A) und ABRAXAS1 (B). Es konnte kein Einfluss der Expression von PALB2 und ABRAXAS1 auf das Überleben beobachtet werden. Das mediane Gesamtüberleben von 170,9 Monaten von Patientinnen mit einer niedrigen PALB2 mRNA-Expression (n=721) zeigte keinen signifikanten Unterschied zu Patientinnen mit hoher mRNA-Expression (n=721) mit einem Gesamtüberleben von 142,6 Monaten (p=0,061).

Auch die mRNA-Expression von ABRAXAS1 zeigte keinen signifikanten Effekt auf das Gesamtüberleben. Das mediane Gesamtüberleben von 162,9 Monaten von Patientinnen mit einer niedrigen mRNA-Expression von ABRAXAS1 (n=721) zeigte keinen signifikanten Unterschied zu Patientinnen mit hoher mRNA-Expression (n=721) mit einem Gesamtüberleben von 165,4 Monaten (p= 0,416).

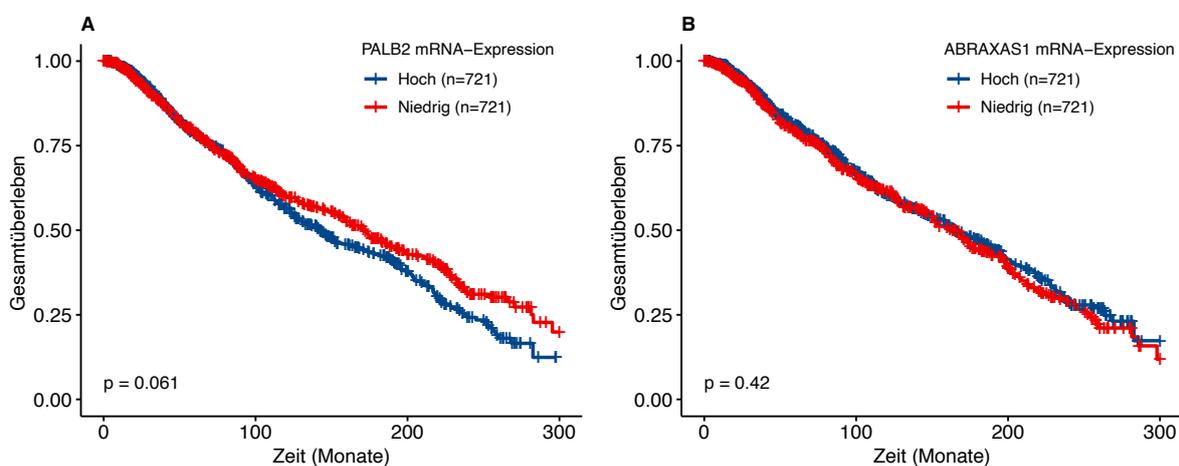


Abbildung 7: Kein Einfluss der mRNA-Expression von PALB2 und ABRAXAS1 auf das Gesamtüberleben.

Die Überlebenswahrscheinlichkeit von 1442 Patientinnen wurde anhand von Daten der METABRIC Studie (n=952) (Curtis et al. 2012; Pereira et al. 2016) und des TCGA Pan-Cancer Atlas (n=490) (The Cancer Genome Atlas Network, 2012) für Brustkrebstumoren untersucht. Die Kategorisierung basierte auf der mRNA-Expression (Z-Wert) von PALB2 (A) und ABRAXAS1 (B). Nach Kaplan-Meier wurde die Gesamtüberlebenswahrscheinlichkeit für das niedrigste Quartil (niedrig; n=721) gegenüber dem höchsten Quartil (hoch; n=721) berechnet. Der Log-rank Test mit einem Signifikanzniveau von $\alpha=0,05$ wurde zum Vergleich der Überlebenskurven angewendet.

3.1.2 Kein Überlebensvorteil durch Strahlentherapie bei geringer mRNA-Expression von PALB2

Um den Einfluss der mRNA-Expression von PALB2 und ABRAXAS1 auf den Überlebensvorteil durch Strahlentherapie zu untersuchen wurden mRNA-Expressions- und Überlebensdaten derselben 1442 Brustkrebspatientinnen aus der METABRIC Studie und des TCGA Pan-Cancer Atlas wie in Abschnitt 3.1.1 ausgewertet. Die Patientinnen entsprechen dem niedrigsten und dem höchsten Quartil der mRNA-Expression von PALB2 bzw. ABRAXAS1 in den beiden Kohorten (METABRIC: n=952, TCGA: n=490). Dabei wurde das Gesamtüberleben der Patientinnen berücksichtigt und ein Zeitraum von 300 Monaten nach Therapie betrachtet. Die Patientinnen, die keine Strahlentherapie erhielten, wurden denen die mit Strahlentherapie behandelt wurden gegenübergestellt.

Abbildung 8 zeigt das Gesamtüberleben der Patientinnen, die mit Strahlentherapie behandelt wurden im Vergleich zu denen, die keine Strahlentherapie erhielten, für die Patientinnen mit niedriger mRNA-Expression von PALB2 (A) und für die Patientinnen mit hoher mRNA-Expression von PALB2 (B). Bei Patientinnen mit geringer PALB2 mRNA-Expression konnte kein Überlebensvorteil durch Strahlentherapie beobachtet werden. Das median Gesamtüberleben von 170,9 Monaten von Patientinnen mit geringer mRNA-Expression von PALB2, die mit einer Strahlentherapie behandelt wurden (n=410), zeigte keinen signifikanten Unterschied zu Patientinnen, die keine Strahlentherapie erhielten (n=297) mit einem Gesamtüberleben von 174,6 Monaten ($p= 0,77$). Demgegenüber war das mediane Gesamtüberleben von 191,1 Monate von Patientinnen mit hoher Expression von PALB2, die mit Strahlentherapie behandelt wurden (n=409), signifikant höher als das Gesamtüberleben von 122,8 Monate von Patientinnen, die keine Strahlentherapie erhielten (n= 283) ($p= 0,012$).

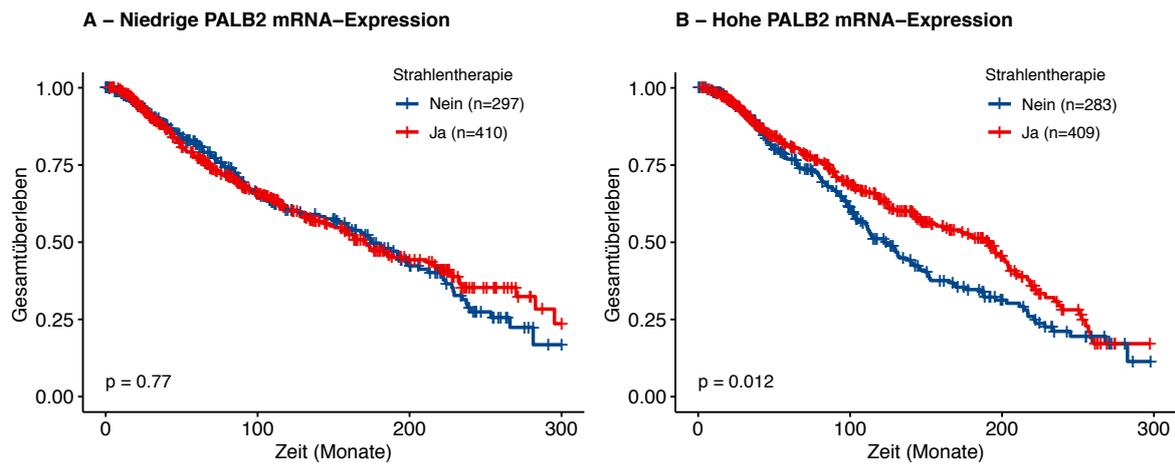


Abbildung 8: Kein Überlebensvorteil durch Strahlentherapie bei Brustkrebspatientinnen mit geringer PALB2 mRNA-Expression.

Die Überlebenswahrscheinlichkeit von 1442 Patientinnen wurde anhand von Daten der METABRIC Studie (n=952) (Curtis et al. 2012; Pereira et al. 2016) und des TCGA Pan-Cancer Atlas (n=490) (The Cancer Genome Atlas Network, 2012) für Brustkrebstumoren untersucht. Die Patientinnen entsprechen dem niedrigsten und dem höchsten Quartil der mRNA-Expression (Z-Wert) von PALB2 in den beiden Kohorten. Die Überlebenswahrscheinlichkeit wurde für die Patientinnen mit niedriger mRNA-Expression von PALB2 (A) sowie für Patientinnen mit hoher mRNA-Expression von PALB2 untersucht (B). Innerhalb jeder Gruppe wurden die Patientinnen nach der Behandlung mit einer Strahlentherapie stratifiziert (nein oder ja). Patientinnen ohne Informationen zur Behandlung mit einer Strahlentherapie sind nicht abgebildet. Die Überlebenswahrscheinlichkeit wurde nach Kaplan-Meier bestimmt. Der Log-rank Test mit einem Signifikanzniveau von $\alpha=0,05$ wurde zum Vergleich der Überlebenskurven angewendet.

Abbildung 9 zeigt das Gesamtüberleben der Patientinnen, die mit Strahlentherapie behandelt wurden im Vergleich zu denen, die keine Strahlentherapie erhielten, für die Patientinnen mit niedriger mRNA-Expression von ABRAXAS1 (A) und für die Patientinnen mit hoher mRNA-Expression von ABRAXAS1 (B). Die mRNA-Expression von ABRAXAS1 zeigte keinen Einfluss auf den Überlebensvorteil durch Strahlentherapie. Das mediane Gesamtüberleben von 167,1 Monaten von Patientinnen mit niedriger mRNA-Expression von ABRAXAS1, die mit einer Strahlentherapie behandelt wurden (n=396), zeigte keinen signifikanten Unterschied zu Patientinnen, die nicht mit einer Strahlentherapie behandelt wurden (n=297) mit einem Gesamtüberleben von 153,3 Monaten ($p=0,767$). Das mediane Gesamtüberleben von 186,6 Monate von Patientinnen mit hoher Expression von ABRAXAS1, die mit Strahlentherapie behandelt wurden (n=406), zeigte ebenfalls keinen signifikanten Unterschied zu dem Gesamtüberleben von 164,6 Monate von Patientinnen, die keine Strahlentherapie erhielten (n=286) ($p= 0.496$).

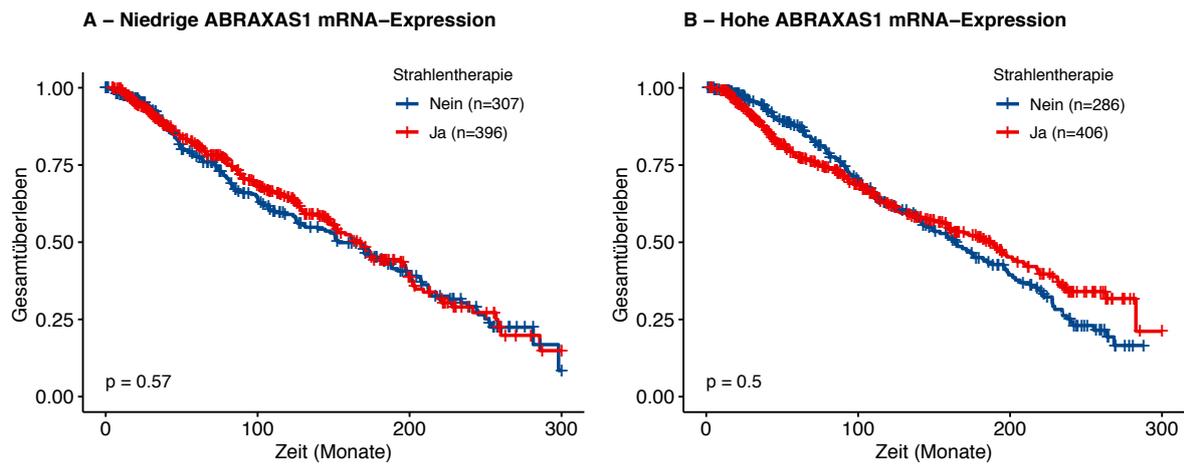


Abbildung 9: Kein Einfluss der ABRAXAS1 mRNA-Expression auf den Überlebensvorteil durch Strahlentherapie.

Die Überlebenswahrscheinlichkeit von 1442 Patientinnen wurde anhand von Daten der METABRIC Studie (n=952) (Curtis et al. 2012; Pereira et al. 2016) und des TCGA Pan-Cancer Atlas (n=490) (The Cancer Genome Atlas Network, 2012) für Brustkrebstumoren untersucht. Die Patientinnen entsprechen dem niedrigsten und dem höchsten Quartil der mRNA-Expression (Z-Wert) von ABRAXAS1 in den beiden Kohorten. Die Überlebenswahrscheinlichkeit wurde für die Patientinnen mit niedriger mRNA-Expression von ABRAXAS1 (A) sowie für Patientinnen mit hoher mRNA-Expression von ABRAXAS1 untersucht (B). Innerhalb jeder Gruppe wurden die Patientinnen nach der Behandlung mit einer Strahlentherapie stratifiziert (Nein oder Ja). Patientinnen ohne Informationen zur Behandlung mit einer Strahlentherapie sind nicht abgebildet. Die Überlebenswahrscheinlichkeit wurde nach Kaplan-Meier bestimmt. Der Log-rank Test mit einem Signifikanzniveau von $\alpha=0,05$ wurde zum Vergleich der Überlebenskurven angewendet.

3.1.3 Kein Überlebensvorteil durch Strahlentherapie bei Brustkrebspatientinnen im klinischen Stadium II mit geringer PALB2 mRNA-Expression

Um den Einfluss der mRNA-Expression von PALB2 und ABRAXAS1 auf den Überlebensvorteil durch Strahlentherapie in Abhängigkeit des klinischen Stadiums der Brustkrebserkrankung zu untersuchen wurden Expressions- und Überlebensdaten derselben 1442 Brustkrebspatientinnen aus der METABRIC Studie und des TCGA Pan-Cancer Atlas wie in Abschnitt 3.1.1 und 3.1.2 ausgewertet. Die Patientinnen, die nicht mit einer Strahlentherapie behandelt wurden, wurden denen, die mit Strahlentherapie behandelt wurden, gegenübergestellt.

Abbildung 10 zeigt das Gesamtüberleben der Brustkrebspatientinnen, die mit Strahlentherapie behandelt wurden im Vergleich zu denen, die nicht mit einer Strahlentherapie behandelt

wurden, im klinischen Stadium I (A, B), II (C, D) sowie III (E, F). Innerhalb der Stadien wurden Patientinnen mit niedriger und hoher mRNA-Expression von PALB2 getrennt betrachtet.

Es konnte kein Überlebensvorteil durch Strahlentherapie in Brustkrebspatientinnen im klinischen Stadium II und geringer PALB2 mRNA-Expression beobachtet werden, während bei hoher Expression von PALB2 ein Überlebensvorteil durch Strahlentherapie bestand. Das mediane Gesamtüberleben von 186,6 Monaten von Patientinnen in Stadium II mit einer niedrigen PALB2 mRNA-Expression, die mit einer Strahlentherapie behandelt wurden (n=197) zeigte keinen signifikanten Unterschied zu Patientinnen, die nicht mit einer Strahlentherapie behandelt wurden (n=127) mit einem Gesamtüberleben von 174,6 Monaten (p=0,290). Demgegenüber war das mediane Gesamtüberleben von 153,0 Monaten von Patientinnen in Stadium II mit einer hohen PALB2 mRNA-Expression, die mit einer Strahlentherapie behandelt wurden (n=201) signifikant länger als das von Patientinnen, die nicht mit einer Strahlentherapie behandelt wurden (n=136) mit einem Gesamtüberleben von 103,5 Monaten (p=0,023).

Das mediane Gesamtüberleben von 211,0 Monaten von Patientinnen in Stadium I mit einer niedrigen PALB2 mRNA-Expression, die mit einer Strahlentherapie behandelt wurden (n=102) zeigte keinen signifikanten Unterschied zu Patientinnen, die nicht mit einer Strahlentherapie behandelt wurden (n=74) mit einem Gesamtüberleben von 240,0 Monaten (p=0,161). Ebenso zeigte das mediane Gesamtüberleben von 237,3 Monaten von Patientinnen in Stadium I mit einer hohen PALB2 mRNA-Expression, die mit einer Strahlentherapie behandelt wurden (n=88) keinen signifikanten Unterschied zu Patientinnen, die nicht mit einer Strahlentherapie behandelt wurden (n= 54) mit einem Gesamtüberleben von 228,1 Monaten (p= 0,796).

Das mediane Gesamtüberleben von 96,9 Monaten von Patientinnen in Stadium III mit einer niedrigen PALB2 mRNA-Expression, die mit einer Strahlentherapie behandelt wurden (n=61) zeigte keinen signifikanten Unterschied zu Patientinnen, die nicht mit einer Strahlentherapie behandelt wurden (n=24) mit einem Gesamtüberleben von 87,0 Monaten (p=0.461). Ebenso zeigte das mediane Gesamtüberleben von 111,1 Monaten von Patientinnen in Stadium III mit einer hohen PALB2 mRNA-Expression, die mit einer Strahlentherapie behandelt wurden (n=45) keinen signifikanten Unterschied zu Patientinnen, die nicht mit einer Strahlentherapie behandelt wurden (n=15) mit einem Gesamtüberleben von 64,9 Monaten (p=0,260).

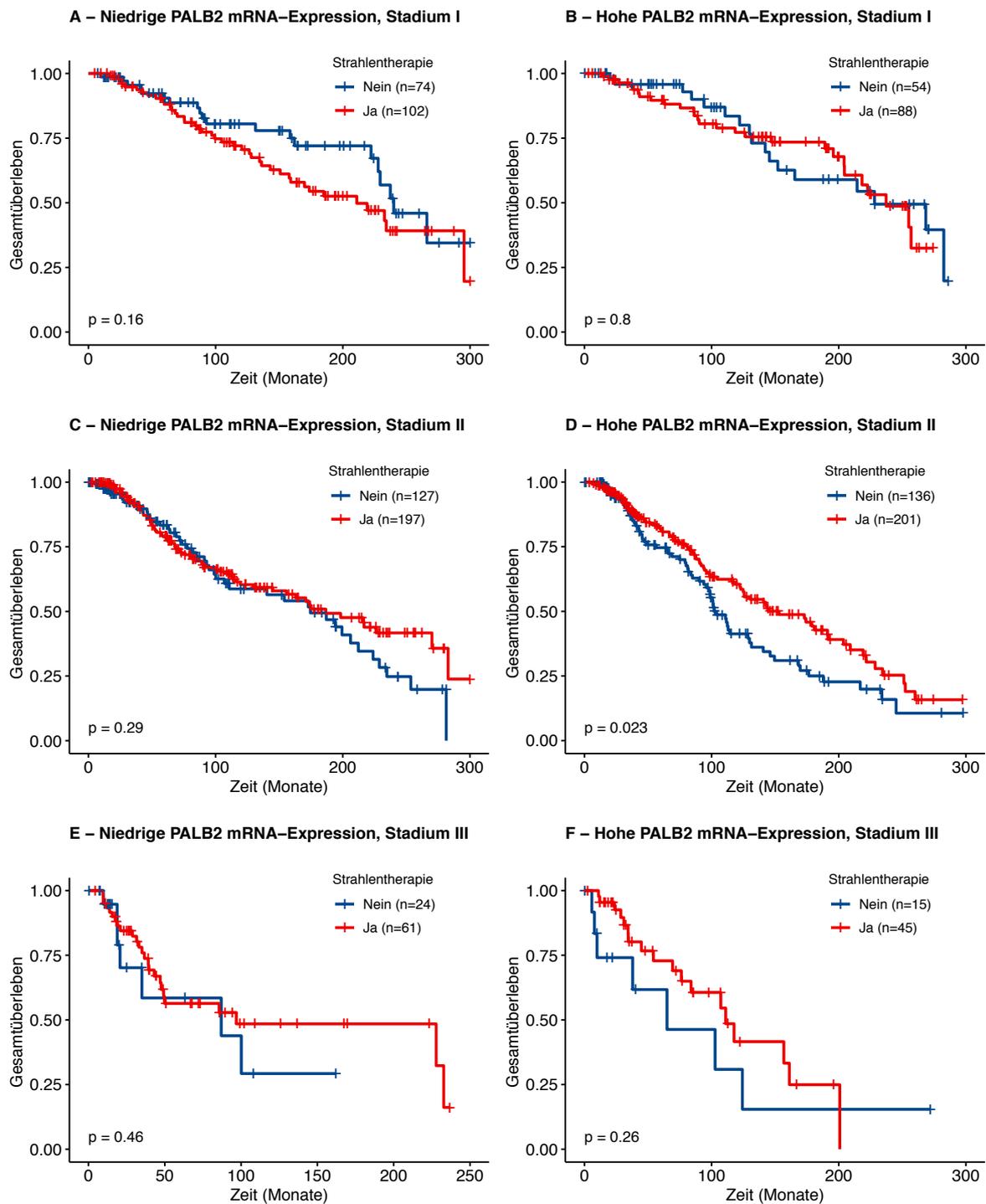


Abbildung 10: Kein Überlebensvorteil durch Strahlentherapie bei Brustkrebspatientinnen im klinischen Stadium II mit geringer PALB2 mRNA-Expression.

Die Überlebenswahrscheinlichkeit von 1442 Patientinnen wurde anhand von Daten der METABRIC Studie (n=952) (Curtis et al. 2012; Pereira et al. 2016) und des TCGA Pan-Cancer Atlas (n=490) für Brustkrebstumoren untersucht. Die Patientinnen entsprechen dem niedrigsten und dem höchsten Quartil der mRNA-Expression (Z-Wert) von PALB2 in den beiden Kohorten. Die Überlebenswahrscheinlichkeit wurde für die Patientinnen mit Brusttumoren in Stadium I (A, B), II (C, D) sowie III (E, F) untersucht. Innerhalb der Stadien wurden Patientinnen mit niedriger mRNA-Expression von PALB2 sowie Patientinnen mit hoher

mRNA-Expression von PALB2 getrennt betrachtet. Innerhalb jeder Gruppe wurden die Patientinnen nach der Behandlung mit einer Strahlentherapie stratifiziert (Nein oder Ja). Patientinnen ohne Informationen zur Behandlung mit einer Strahlentherapie sind nicht abgebildet. Die Überlebenswahrscheinlichkeit wurde nach Kaplan-Meier bestimmt. Der Log-rank Test mit einem Signifikanzniveau von $\alpha=0,05$ wurde zum Vergleich der Überlebenskurven angewendet.

Abbildung 11 zeigt das Gesamtüberleben der Brustkrebspatientinnen, die mit einer Strahlentherapie behandelt wurden im Vergleich zu denen, die nicht mit einer Strahlentherapie behandelt wurden, im klinischen Stadium I (A, B), II (C, D) sowie III (E, F). Innerhalb der Stadien wurden Patientinnen mit niedriger und hoher mRNA-Expression von ABRAXAS1 getrennt betrachtet.

Das mediane Gesamtüberleben von 201,9 Monaten von Patientinnen in Stadium I mit einer niedrigen ABRAXAS1 mRNA-Expression, die mit einer Strahlentherapie behandelt wurden ($n=72$) war signifikant kürzer als bei Patientinnen, die nicht mit einer Strahlentherapie behandelt wurden ($n=51$) mit einem Gesamtüberleben von 298,0 Monaten ($p= 0,040$). Demgegenüber zeigte das mediane Gesamtüberleben von 218,3 Monaten von Patientinnen in Stadium I mit einer hohen ABRAXAS1 mRNA-Expression, die mit einer Strahlentherapie behandelt wurden ($n=99$) keinen signifikanten Unterschied zu Patientinnen, die nicht mit einer Strahlentherapie behandelt wurden ($n=80$) mit einem Gesamtüberleben von 222,2 Monaten ($p=0,815$).

Das mediane Gesamtüberleben von 172,0 Monaten von Patientinnen in Stadium II mit einer niedrigen ABRAXAS1 mRNA-Expression, die mit einer Strahlentherapie behandelt wurden ($n=216$) zeigte keinen signifikanten Unterschied zu Patientinnen, die nicht mit einer Strahlentherapie behandelt wurden ($n=157$) mit einem Gesamtüberleben von 151,2 Monaten ($p=0,171$). Ebenso zeigte das mediane Gesamtüberleben von 191,1 Monaten von Patientinnen in Stadium II mit einer hohen ABRAXAS1 mRNA-Expression, die mit einer Strahlentherapie behandelt wurden ($n=183$) keinen signifikanten Unterschied zu Patientinnen, die nicht mit einer Strahlentherapie behandelt wurden ($n=119$) mit einem Gesamtüberleben von 124,6 Monaten ($p= 0,155$).

Das mediane Gesamtüberleben von 129,2 Monaten von Patientinnen in Stadium III mit einer niedrigen ABRAXAS1 mRNA-Expression, die mit einer Strahlentherapie behandelt wurden ($n=56$) zeigte keinen signifikanten Unterschied zu Patientinnen, die nicht mit einer Strahlentherapie behandelt wurden ($n=24$) mit einem Gesamtüberleben von 100,2 Monaten ($p= 0,319$). Ebenso zeigte das mediane Gesamtüberleben von 107,2 Monaten von Patientinnen in Stadium III mit einer hohen ABRAXAS1 mRNA-Expression, die mit einer Strahlentherapie

behandelt wurden (n=53) keinen signifikanten Unterschied zu Patientinnen, die nicht mit einer Strahlentherapie behandelt wurden (n=14) mit einem Gesamtüberleben von 87,0 Monaten (p=0,664).

Aufgrund der geringen Anzahl an Patientinnen in Stadium IV wurde der Überlebensvorteil durch Strahlentherapie hier nicht untersucht.

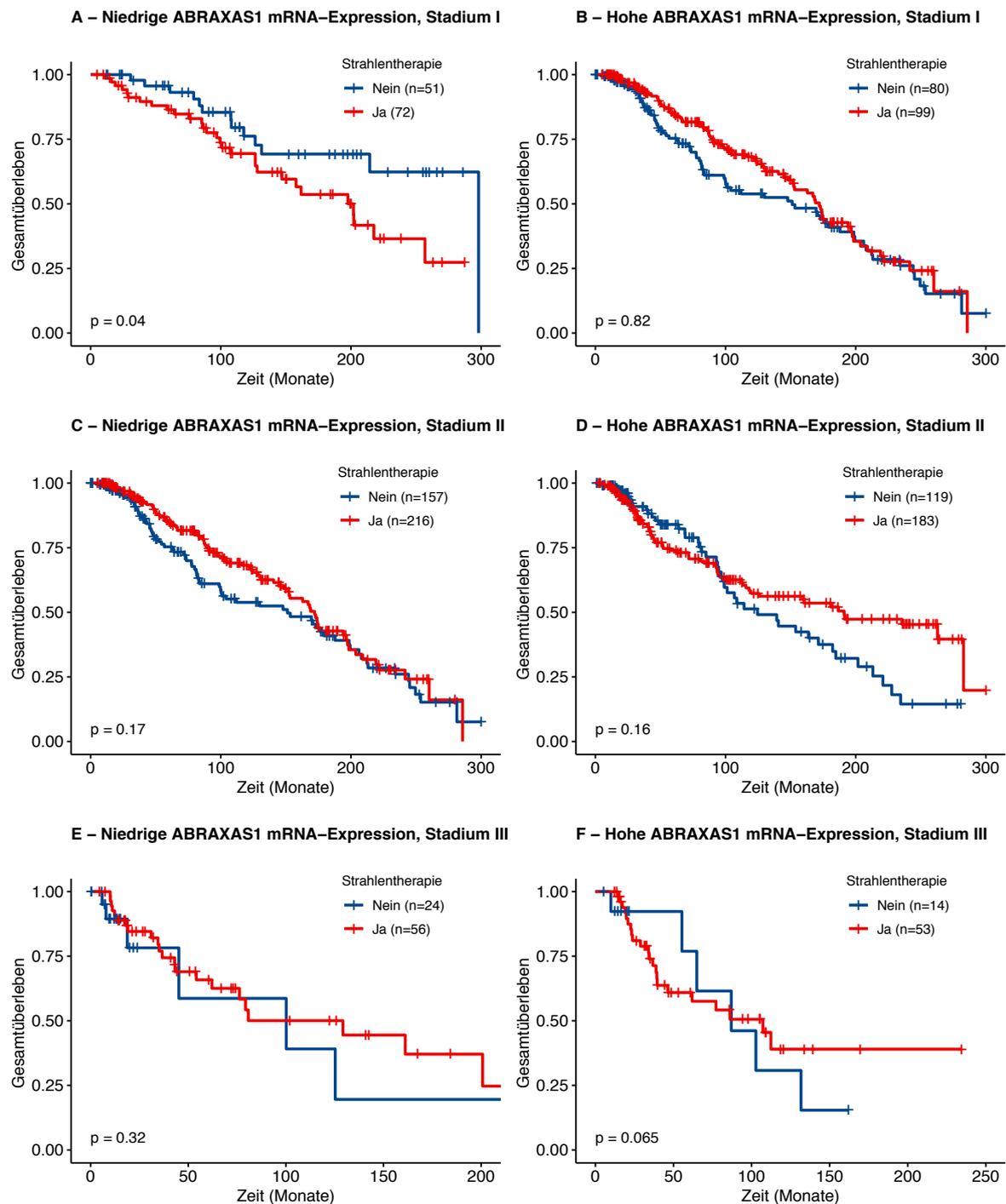


Abbildung 11: Kein Einfluss der ABRAXAS1 mRNA-Expression auf den Überlebensvorteil durch Strahlentherapie in Abhängigkeit vom Stadium des Brusttumors.

Die Überlebenswahrscheinlichkeit von 1442 Patientinnen wurde anhand von Daten der METABRIC Studie (n=952) (Curtis et al. 2012; Pereira et al. 2016) und des TCGA Pan-Cancer Atlas (n=490) für Brustkrebstumoren untersucht. Die Patientinnen entsprechen dem niedrigsten und dem höchsten Quartil der mRNA-Expression (Z-Wert) von ABRAXAS1 in den beiden Kohorten. Die Überlebenswahrscheinlichkeit wurde für die Patientinnen mit den Brusttumoren in Stadium I (A, B), II (C, D), III (E, F) sowie IV (G, H) untersucht. Innerhalb der Stadien wurden Patientinnen mit niedriger mRNA-Expression von ABRXAS1 sowie Patientinnen mit hoher mRNA-Expression von ABRAXAS1 getrennt betrachtet. Innerhalb jeder Gruppe wurden die Patientinnen nach der Behandlung mit einer Strahlentherapie stratifiziert (Nein oder Ja). Patientinnen ohne Informationen zur Behandlung mit einer Strahlentherapie sind nicht abgebildet. Die Überlebenswahrscheinlichkeit wurde nach Kaplan-Meier bestimmt. Der Log-rank Test mit einem Signifikanzniveau von $\alpha=0,05$ wurde zum Vergleich der Überlebenskurven angewendet.

3.1.4 Kein Überlebensvorteil durch Strahlentherapie bei geringer mRNA-Expression von PALB2 und Tumoren des molekularem Subtyps Luminal-A

Zur Analyse der Auswirkung der mRNA-Expression von PALB2 und ABRAXAS1 auf den Überlebensvorteil durch Strahlentherapie in Abhängigkeit des molekularen Subtyps des Brusttumors wurden Expressions- und Überlebensdaten derselben 1442 Brustkrebspatientinnen aus der METABRIC Studie und des TCGA Pan-Cancer Atlas wie in Abschnitt 3.1.1, 3.1.2 und 3.1.3 ausgewertet. Die Patientinnen, die nicht mit einer Strahlentherapie behandelt wurden, wurden denen, die mit Strahlentherapie behandelt wurden, gegenübergestellt.

Abbildung 12 zeigt das Gesamtüberleben der Patientinnen, die mit Strahlentherapie behandelt wurden im Vergleich zu denen, die nicht mit einer Strahlentherapie behandelt wurden, und Brusttumoren mit den molekularen Subtypen *basal-like* (A, B), Luminal-A (C, D), Luminal-B (E, F) sowie *Her2-enriched* (G, H). Innerhalb der molekularen Subtypen wurden Patientinnen mit niedriger und hoher mRNA-Expression von PALB2 getrennt betrachtet.

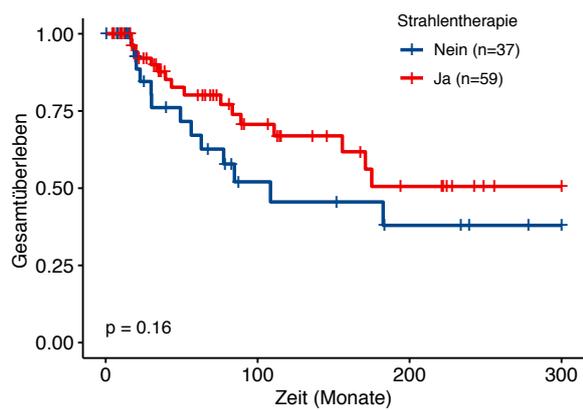
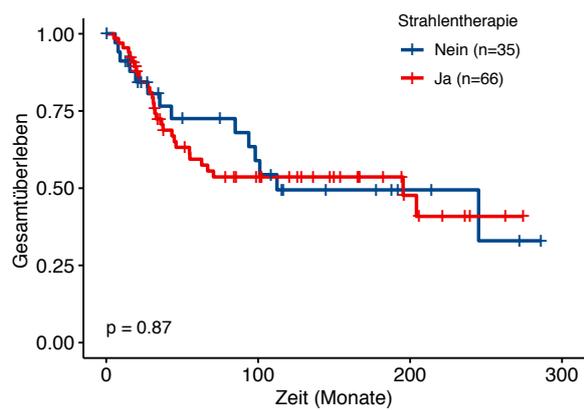
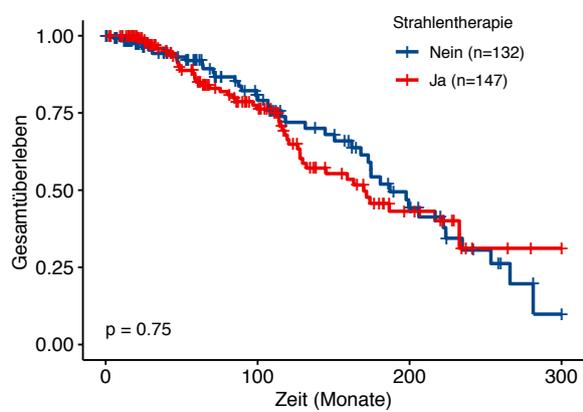
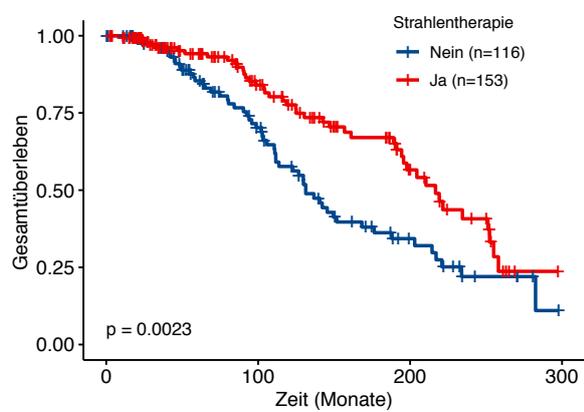
Bei Patientinnen mit Brustkrebs des molekularen Subtyps Luminal-A und geringer PALB2 mRNA-Expression konnte kein Überlebensvorteil durch Strahlentherapie beobachtet werden, während bei hoher Expression ein Überlebensvorteil durch Strahlentherapie bestand. Das mediane Gesamtüberleben von 169,8 Monaten von Patientinnen mit dem molekularen Subtyp Luminal-A und einer niedrigen PALB2 mRNA-Expression, die mit einer Strahlentherapie behandelt wurden (n=147) zeigte keinen signifikanten Unterschied zu Patientinnen, die nicht mit einer Strahlentherapie behandelt wurden (n=132) mit einem Gesamtüberleben von 187,0 Monaten ($p=0,290$). Demgegenüber war das mediane Gesamtüberleben von 216,7 Monaten von Patientinnen mit dem molekularen Subtyp Luminal-A und einer hohen PALB2 mRNA-

Expression, die mit einer Strahlentherapie behandelt wurden (n=153) signifikant länger als das von Patientinnen, die nicht mit einer Strahlentherapie behandelt wurden (n=116) mit einem Gesamtüberleben von 131,3 Monaten (p=0,002).

Das mediane Gesamtüberleben wurde nicht erreicht von Patientinnen mit dem molekularen Subtyp *basal-like* und einer niedrigen PALB2 mRNA-Expression, die mit einer Strahlentherapie behandelt wurden (n=59) und zeigte keinen signifikanten Unterschied im Vergleich zu Patientinnen, die nicht mit einer Strahlentherapie behandelt wurden (n=37) mit einem Gesamtüberleben von 108,5 Monaten (p=0,162). Ebenso zeigte das mediane Gesamtüberleben von 195,4 Monaten von Patientinnen mit dem molekularen Subtyp *basal-like* und einer hohen PALB2 mRNA-Expression, die mit einer Strahlentherapie behandelt wurden (n=66) keinen signifikanten Unterschied zu Patientinnen, die nicht mit einer Strahlentherapie behandelt wurden (n=35) mit einem Gesamtüberleben von 112,4 Monaten (p= 0,874).

Das mediane Gesamtüberleben von 150,7 Monaten von Patientinnen mit dem molekularen Subtyp Luminal-B und einer niedrigen PALB2 mRNA-Expression, die mit einer Strahlentherapie behandelt wurden (n=59) zeigte keinen signifikanten Unterschied zu Patientinnen, die nicht mit einer Strahlentherapie behandelt wurden (n=36) mit einem Gesamtüberleben von 90,8 Monaten (p=0,426). Ebenso zeigte das mediane Gesamtüberleben von 125,6 Monaten von Patientinnen mit dem molekularen Subtyp Luminal-B und einer hohen PALB2 mRNA-Expression, die mit einer Strahlentherapie behandelt wurden (n=135) keinen signifikanten Unterschied zu Patientinnen, die nicht mit einer Strahlentherapie behandelt wurden (n=88) mit einem Gesamtüberleben von 122,0 Monaten (p=0,668).

Das mediane Gesamtüberleben von 143,0 Monaten von Patientinnen mit dem molekularen Subtyp *Her2-enriched* und einer niedrigen PALB2 mRNA-Expression, die mit einer Strahlentherapie behandelt wurden (n=51) zeigte keinen signifikanten Unterschied zu Patientinnen, die nicht mit einer Strahlentherapie behandelt wurden (n=30) mit einem Gesamtüberleben von 110,8 Monaten (p=0,733). Ebenso zeigte das mediane Gesamtüberleben von 203,7 Monaten von Patientinnen mit dem molekularen Subtyp *Her2-enriched* und einer hohen PALB2 mRNA-Expression, die mit einer Strahlentherapie behandelt wurden (n=33) keinen signifikanten Unterschied zu Patientinnen, die nicht mit einer Strahlentherapie behandelt wurden (n=30) mit einem Gesamtüberleben von 100,7 Monaten (p= 0,234).

A – Niedrige PALB2 mRNA-Expression, basal**B – Hohe PALB2 mRNA-Expression, basal****C – Niedrige PALB2 mRNA-Expression, LumA****D – Hohe PALB2 mRNA-Expression, LumA**

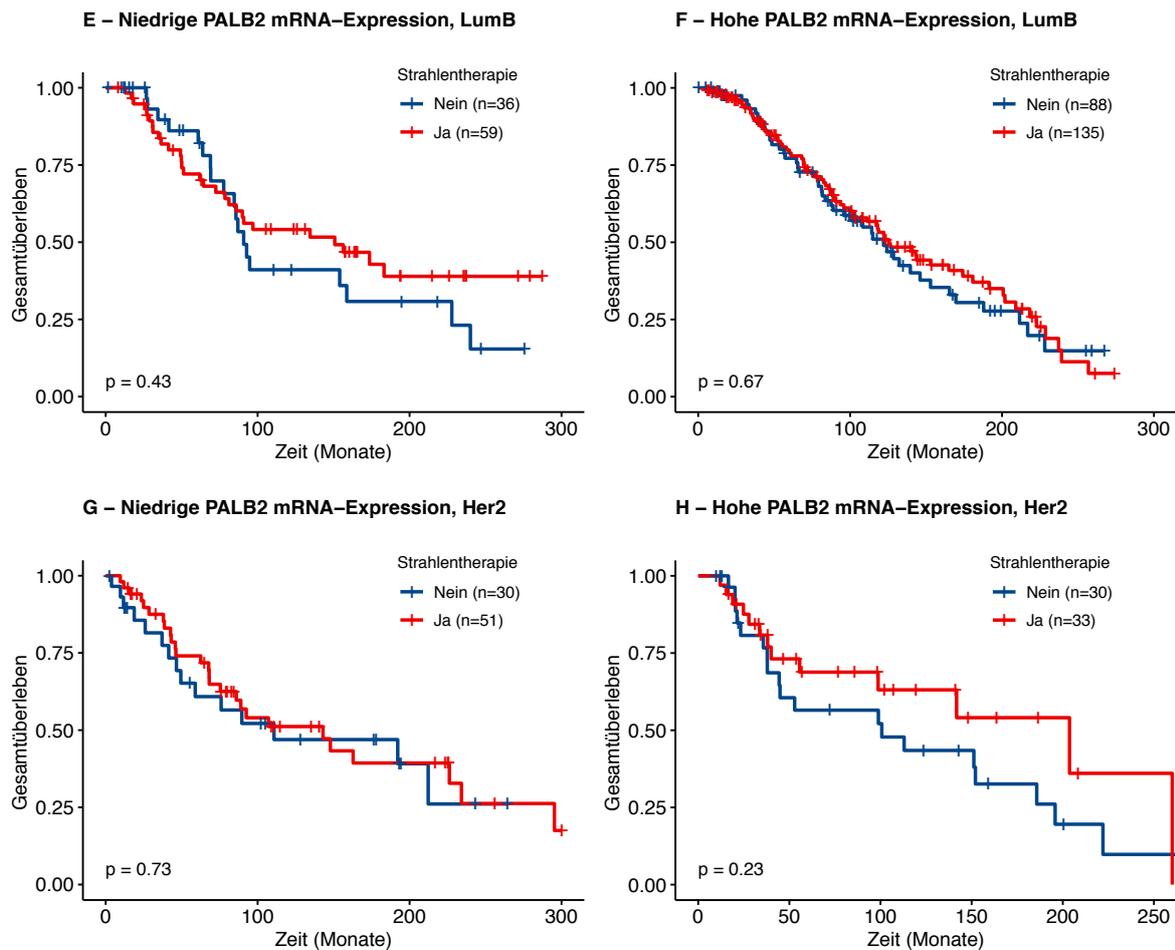


Abbildung 12: Kein Überlebensvorteil durch Strahlentherapie bei Brustkrebspatientinnen mit Tumoren des molekularen Subtyps Luminal-A und geringer PALB2 mRNA-Expression.

Die Überlebenswahrscheinlichkeit von 1442 Patientinnen wurde anhand von Daten der METABRIC Studie (n=952) (Curtis et al. 2012; Pereira et al. 2016) und des TCGA Pan-Cancer Atlas (n=490) für Brustkrebstumoren untersucht. Die Patientinnen entsprechen dem niedrigsten und dem höchsten Quartil der mRNA-Expression (Z-Wert) von PALB2 in den beiden Kohorten. Die Überlebenswahrscheinlichkeit wurde für die Patientinnen mit den Brusttumoren der molekularen Subtypen *basal-like* (A, B), Luminal-A (C, D), Luminal-B (E, F) sowie *Her2-enriched* (G, H) untersucht. Innerhalb der molekularen Subtypen wurden Patientinnen mit niedriger mRNA-Expression von PALB2 sowie für Patientinnen mit hoher mRNA-Expression von PALB2 getrennt betrachtet. Innerhalb jeder Gruppe wurden die Patientinnen nach dem Erhalt von Strahlentherapie stratifiziert (Nein oder Ja). Patientinnen ohne Informationen zur Behandlung mit einer Strahlentherapie sind nicht abgebildet. Die Überlebenswahrscheinlichkeit wurde nach Kaplan-Meier und die Signifikanz durch einen Log-Rank-Test bestimmt.

Abbildung 13 zeigt das Gesamtüberleben der Patientinnen, die mit einer Strahlentherapie behandelt wurden im Vergleich zu denen, die nicht mit einer Strahlentherapie behandelt wurden, und Brusttumoren mit den molekularen Subtypen *basal-like* (A, B), Luminal-A (C, D), Luminal-B (E, F) sowie *Her2-enriched* (G, H). Innerhalb der molekularen Subtypen wurden

Patientinnen mit niedriger mRNA-Expression von ABRAXAS1 sowie Patientinnen mit hoher mRNA-Expression von ABRAXAS1 getrennt betrachtet.

Es konnte kein Einfluss mRNA-Expression von ABRAXAS1 auf den Überlebensvorteil durch Strahlentherapie beobachtet werden. Das mediane Gesamtüberleben wurde nicht erreicht von Patientinnen mit dem molekularen Subtyp *basal-like* und einer niedrigen ABRAXAS1 mRNA-Expression, die mit einer Strahlentherapie behandelt wurden (n=72) und zeigte keinen signifikanten Unterschied zu Patientinnen, die nicht mit einer Strahlentherapie behandelt wurden (n=51) mit einem Gesamtüberleben von 245,1 Monaten (p=0,775). Ebenso zeigte das mediane Gesamtüberleben von 110,9 Monaten von Patientinnen mit dem molekularen Subtyp *basal-like* und einer hohen ABRAXAS1 mRNA-Expression, die mit einer Strahlentherapie behandelt wurden (n=45) keinen signifikanten Unterschied zu Patientinnen, die nicht mit einer Strahlentherapie behandelt wurden (n=20) mit einem Gesamtüberleben von 108,5 Monaten (p=0,474).

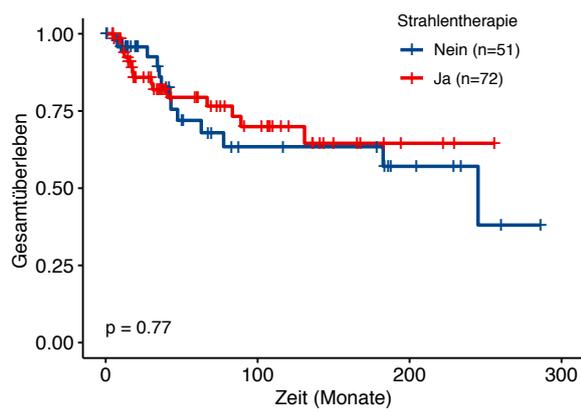
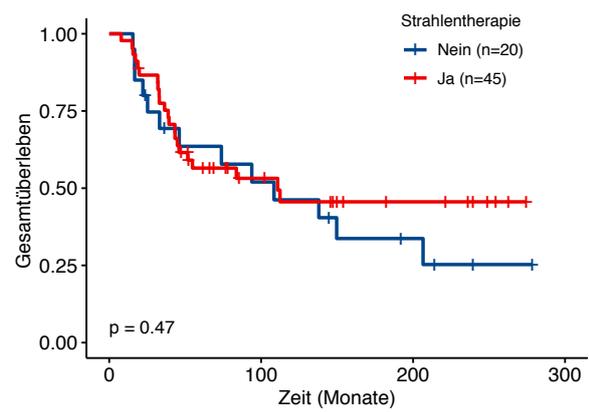
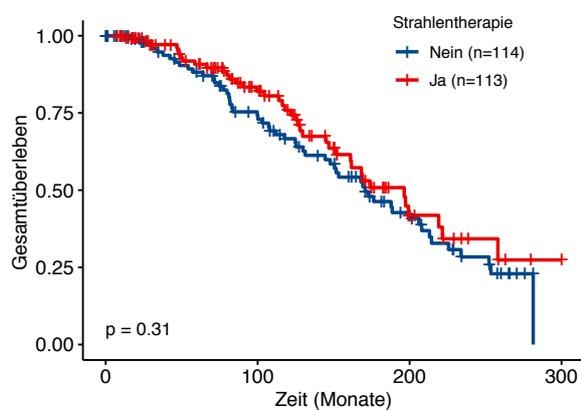
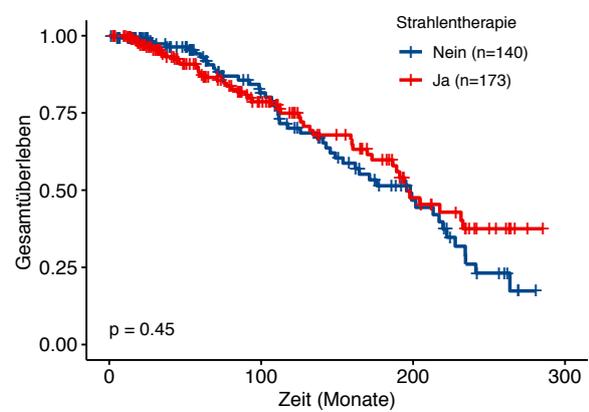
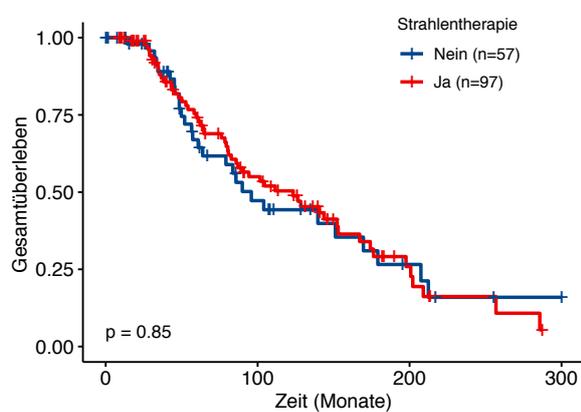
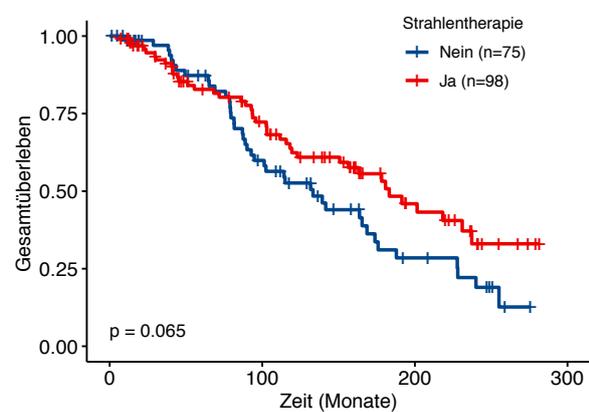
Das mediane Gesamtüberleben von 196,5 von Patientinnen mit dem molekularen Subtyp Luminal-A und einer niedrigen ABRAXAS1 mRNA-Expression, die mit einer Strahlentherapie behandelt wurden (n=113) zeigte keinen signifikanten Unterschied im Vergleich zu Patientinnen, die nicht mit einer Strahlentherapie behandelt wurden (n=114) mit einem Gesamtüberleben von 170,7 Monaten (p=0,309). Ebenso zeigte das mediane Gesamtüberleben von 195,7 Monaten von Patientinnen mit dem molekularen Subtyp Luminal-A und einer hohen ABRAXAS1 mRNA-Expression, die mit einer Strahlentherapie behandelt wurden (n=173) keinen signifikanten Unterschied zu Patientinnen, die nicht mit einer Strahlentherapie behandelt wurden (n=140) mit einem Gesamtüberleben von 198,1 Monaten (p=0,452).

Das mediane Gesamtüberleben von 123,3 Monaten von Patientinnen mit dem molekularen Subtyp Luminal-B und einer niedrigen ABRAXAS1 mRNA-Expression, die mit einer Strahlentherapie behandelt wurden (n=97) zeigte keinen signifikanten Unterschied zu Patientinnen, die nicht mit einer Strahlentherapie behandelt wurden (n=57) mit einem Gesamtüberleben von 95,8 Monaten (p= 0,846). Ebenso zeigte das mediane Gesamtüberleben von 183,2 Monaten von Patientinnen mit dem molekularen Subtyp Luminal-B und einer hohen ABRAXAS1 mRNA-Expression, die mit einer Strahlentherapie behandelt wurden (n=98) keinen signifikanten Unterschied zu Patientinnen, die nicht mit einer Strahlentherapie behandelt wurden (n=75) mit einem Gesamtüberleben von 133,2 Monaten (p= 0,065).

Das mediane Gesamtüberleben von 100,9 Monaten von Patientinnen mit dem molekularen Subtyp *Her2-enriched* und einer niedrigen ABRAXAS1 mRNA-Expression, die mit einer Strahlentherapie behandelt wurden (n=43) zeigte keinen signifikanten Unterschied zu

Patientinnen, die nicht mit einer Strahlentherapie behandelt wurden (n=45) mit einem Gesamtüberleben von 151,2 Monaten (p=0,976). Ebenso zeigte das mediane Gesamtüberleben von 86,5 Monaten von Patientinnen mit dem molekularen Subtyp *Her2-enriched* und einer hohen ABRAXAS1 mRNA-Expression, die mit einer Strahlentherapie behandelt wurden (n=38) keinen signifikanten Unterschied zu Patientinnen, die nicht mit einer Strahlentherapie behandelt wurden (n=16) mit einem Gesamtüberleben von 182,3 Monaten (p=0,376).

Aufgrund der geringen Anzahl an Patientinnen mit dem molekularen Subtyp *normal-like* wurde der Überlebensvorteil durch Strahlentherapie hier nicht untersucht. Patientinnen mit dem molekularen Subtyp *claudin-low* wurden nicht berücksichtigt, da dieser Subtyp nur in der METABRIC Studie bestimmt wurde.

A – Niedrige ABRAXAS1 mRNA-Expression, basal**B – Hohe ABRAXAS1 mRNA-Expression, basal****C – Niedrige ABRAXAS1 mRNA-Expression, LumA****D – Hohe ABRAXAS1 mRNA-Expression, LumA****E – Niedrige ABRAXAS1 mRNA-Expression, LumB****F – Hohe ABRAXAS1 mRNA-Expression, LumB**

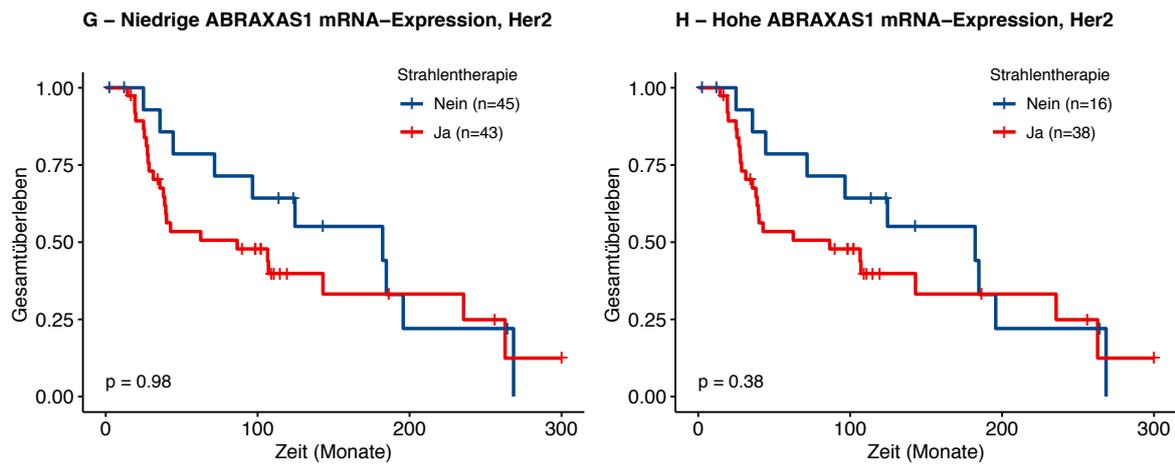


Abbildung 13: Kein Einfluss der ABRAXAS1 mRNA-Expression auf den Überlebensvorteil durch Strahlentherapie in Abhängigkeit vom molekularen Subtyp des Brusttumors.

Die Überlebenswahrscheinlichkeit von 1442 Patientinnen wurde anhand von Daten der METABRIC Studie (n=952) (Curtis et al. 2012; Pereira et al. 2016) und des TCGA Pan-Cancer Atlas (n=490) für Brustkrebstumoren untersucht. Die Patientinnen entsprechen dem niedrigsten und dem höchsten Quartil der mRNA-Expression (Z-Wert) von ABRAXAS1 in den beiden Kohorten. Die Überlebenswahrscheinlichkeit wurde für die Patientinnen mit den Brusttumoren der molekularen Subtypen *basal-like* (A, B), Luminal-A (C, D), Luminal-B (E, F) sowie *Her2-enriched* (G, H) untersucht. Innerhalb der molekularen Subtypen wurden Patientinnen mit niedriger mRNA-Expression von ABRXAS1 sowie für Patientinnen mit hoher mRNA-Expression von ABRAXAS1 getrennt betrachtet. Innerhalb jeder Gruppe wurden die Patientinnen nach dem Erhalt von Strahlentherapie stratifiziert (Nein oder Ja). Patientinnen ohne Informationen zur Behandlung mit einer Strahlentherapie sind nicht abgebildet. Die Überlebenswahrscheinlichkeit wurde nach Kaplan-Meier und die Signifikanz durch einen Log-Rank-Test bestimmt.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Brustkrebspatientinnen im klinischen Stadium II sowie mit dem molekularen Subtyp Luminal-A keinen Überlebensvorteil durch Strahlentherapie haben, wenn ihre Tumore wenig PALB2 mRNA exprimieren. Hingegen bestand bei einer hohen Expression von PALB2 ein Überlebensvorteil durch Strahlentherapie im klinischen Stadium II sowie mit dem molekularen Subtyp Luminal-A. In den klinischen Stadien I, III, IV und molekularen Subtypen Luminal-B, *Her2-enriched* und *basal-like* zeigte sich kein Unterschied zwischen niedriger und hoher mRNA-Expression von PALB2. Zwischen hoher und niedriger mRNA-Expression von ABRAXAS1 bestanden keine Unterschiede hinsichtlich des Überlebensvorteils durch Strahlentherapie in den verschiedenen klinischen Stadien und molekularen Subtypen. Die Ausnahme stellt Stadium I dar, in dem Patientinnen mit niedriger Expression, die mit einer Strahlentherapie behandelt wurden, ein kürzeres

Überleben zeigten. Die mRNA-Expression von PALB2 und ABRAXAS1 zeigte keinen Einfluss auf das Gesamtüberleben von Brustkrebspatientinnen generell.

Insgesamt könnte eine niedrige PALB2 mRNA-Expression einen möglichen prädiktiven Biomarker darstellen, um Patienten im klinischen Stadium II oder mit dem molekularen Subtyp Luminal-A zu identifizieren, die nicht von einer Strahlentherapie profitieren werden. Demgegenüber könnte eine hohe Expression von PALB2 Patientinnen charakterisieren, für die ein Überlebensvorteil durch eine Strahlentherapie zu erwarten ist. Eine Metaanalyse der METABRIC und TCGA Daten konnten generell einen Überlebensvorteil durch Strahlentherapie für Brustkrebspatientinnen im klinischen Stadium II sowie mit den molekularen Subtypen *basal-like* und Luminal-A zeigen (Mao *et al.*, 2017). In den klinischen Stadien I, III und IV sowie bei Tumoren der molekularen Subtypen Luminal-B und *Her2-enriched* konnte kein Überlebensvorteil durch Strahlentherapie beobachtet werden. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit deuten demnach auf eine prädiktive Rolle der PALB2 Expression für das Ansprechen auf Strahlentherapie von Brustkrebspatientinnen in den klinischen Stadien, bzw. in mit den molekularen Subtypen, hin, bei denen generell ein Überlebensvorteil durch Strahlentherapie zu erwarten wäre.

Es ist unklar, ob die prädiktive Rolle von PALB2 und ABRAXAS1 für das Ansprechen auf Strahlentherapie abhängig ist von den Funktionen der Proteine bei der DNA-Replikation oder der Reparatur von DNA-Schäden. Eine fehlerhafte DNA-Replikation als Ausdruck von Replikationsstress kann die genomische Integrität beeinträchtigen und so zur frühen Entstehung von Brustkrebs beitragen (Macheret and Halazonetis, 2015). Um den Einfluss von PALB2 und ABRAXAS1 auf die DNA-Replikation zu untersuchen, wurden im Folgenden lymphoblastoide Zelllinien mit heterozygoten Mutationen im DNA Fiber Assay untersucht.

3.2 Auswirkung der heterozygoten Mutationen c.1592delT in PALB2 und c.1082G>A in ABRAXAS1 auf die Replikationsprogression und -initiation

In Abschnitt 3.1 konnte eine mögliche prädiktive Rolle für das Ansprechen von Brustkrebspatientinnen auf eine Strahlentherapie für die mRNA-Expression von PALB2, nicht aber von ABRAXAS1 gezeigt werden. Es wurde kein Einfluss der Expression der beiden Gene auf das Gesamtüberleben beobachtet. Bereits heterozygote Mutationen in PALB2 und ABRAXAS1 beeinträchtigen in primären Zellen von Brustkrebspatientinnen mehrere

Funktionen des DNA-Reparaturkomplexes Homologe Rekombination (HR) (Nikkilä *et al.*, 2013; Bose *et al.*, 2019). Neben der DNA-Reparatur ist die HR auch an der Replikationsprogression und -initiation beteiligt und sichert so die genomische Integrität (Ait Saada, Lambert and Carr, 2018).

Um die Replikationsprogression und -initiation in Trägern der heterozygoten Mutationen c.1592delT in PALB2 und c.1082G>A in ABRAXAS1 zu vergleichen, wurden die Replikationsstrukturen in lymphoblastoiden Zelllinien mit der DNA Fiber Assay Technik ausgewertet. Mit dem DNA Fiber Assay lassen sich Initiation, Elongation und Termination der DNA-Replikation analysieren. Dazu wurden replizierenden Zellen nacheinander für jeweils 25 min die halogenierten Thymidinanaloga Chlordesoxyuridin (CldU) und Iododesoxyuridin (IdU) über das Zellmedium zugeführt und anstelle der Nukleinbase Thymidin während der S-Phase des Zellzyklus in die DNA eingebaut. Die Darstellung replizierter DNA an Chromatinfasern erfolgt anschließend durch Immunfärbung der Thymidinanaloga. Abbildung 14 zeigt im DNA Fiber Assay dargestellte aktive Replikationsgabeln (1), angehaltene Replikationsgabeln (2), Replikationsursprünge erster (3) und zweiter Ordnung (4) aus einer exemplarischen lymphoblastoiden Zelllinie. Im Fluoreszenzmikroskop erscheinen die Chromatinfasern, die während der CldU-Markierungsphase synthetisiert wurden, rot; die Chromatinfasern, die während der IdU-Markierungsphase synthetisiert wurden, erscheinen grün. Aktive Replikationsgabeln replizierten unidirektional während der CldU- und der IdU-Markierungsphase und erscheinen deshalb rot-grün. Angehaltene Replikationsgabeln replizierten während der CldU-Markierungsphase, doch wurden vor der IdU-Markierungsphase unterbrochen und erscheinen daher nur rot. Replikationsursprünge erster Ordnung wurden während der ersten Markierungsphase mit CldU aktiviert, replizierten bidirektional auch während der zweiten Markungsphase mit IdU und erscheinen deshalb grün-rot-grün. Replikationsursprünge zweiter Ordnung wurden erst in der zweiten Markierungsphase mit IdU aktiviert und erscheinen deshalb nur grün.

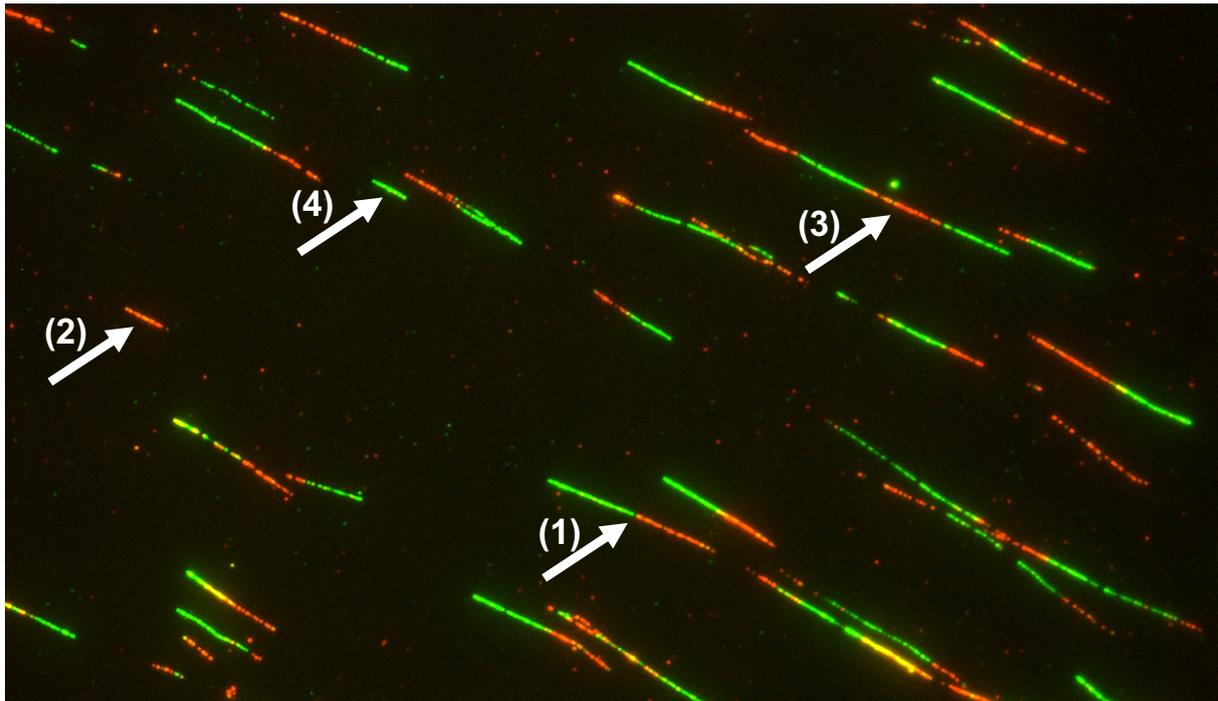


Abbildung 14: DNA-Replikationsstrukturen im DNA Fiber Assay.

Im DNA Fiber Assay wurden exponentiell wachsende lymphoblastoide Zelllinien nacheinander für jeweils 25 min mit CldU (rot) und IdU (grün) markiert, auf Objektträger verteilt, die eingebauten Nukleotide mit geeigneten Antikörpern nachgewiesen und die DNA-Stränge fluoreszenzmikroskopisch analysiert. Es wurden aktive Replikationsgabeln (1), angehaltene Replikationsgabeln (2), Replikationsursprünge erster (3) und zweiter Ordnung (4) analysiert.

3.2.1 Kein Einfluss der heterozygoten Mutationen in PALB2 und ABRAXAS1 auf die Elongationsrate

Um die Replikationsprogression in lymphoblastoiden Trägerzelllinien mit heterozygoten Mutationen in PALB2 (c.1592delT) und ABRAXAS1 (c.1082G>A) und gematchten Kontrollen zu untersuchen, wurden die Zellen im DNA Fiber Assay untersucht. Die unbehandelten exponentiell wachsenden Zellen wurden nacheinander für jeweils 25 min mit CldU und IdU markiert. Anschließend wurden die Chromatinfasern mittels Immunfärbung nachgewiesen. Die mittlere Elongationsrate wurde in symmetrischen Chromatinfasern bestimmt.

Abbildung 15 zeigt die mittlere Elongationsrate (kb/min) in lymphoblastoiden Zelllinien mit heterozygoten Mutationen in PALB2 und ABRAXAS1 sowie in gematchten Kontrollen. Es konnte kein Einfluss der Mutationen in PALB2 und ABRAXAS1 auf die Elongationsrate gezeigt werden. Die Elongationsrate von 0,79 kb/min (95% KI: 0,70 - 0,87) in PALB2-

Trägerzelllinien zeigte keinen signifikanten Unterschied zu den Kontrollen mit einer Elongationsrate von 0,81 kb/min (95% KI: 0,62 - 1,00) ($p=0,3493$). Auch die Elongationsrate von 0,92 kb/min in ABRAXAS1-Trägerzelllinien war vergleichbar mit den Kontrollen (95% KI: 0,73 - 1,12) ($p=0,8012$).

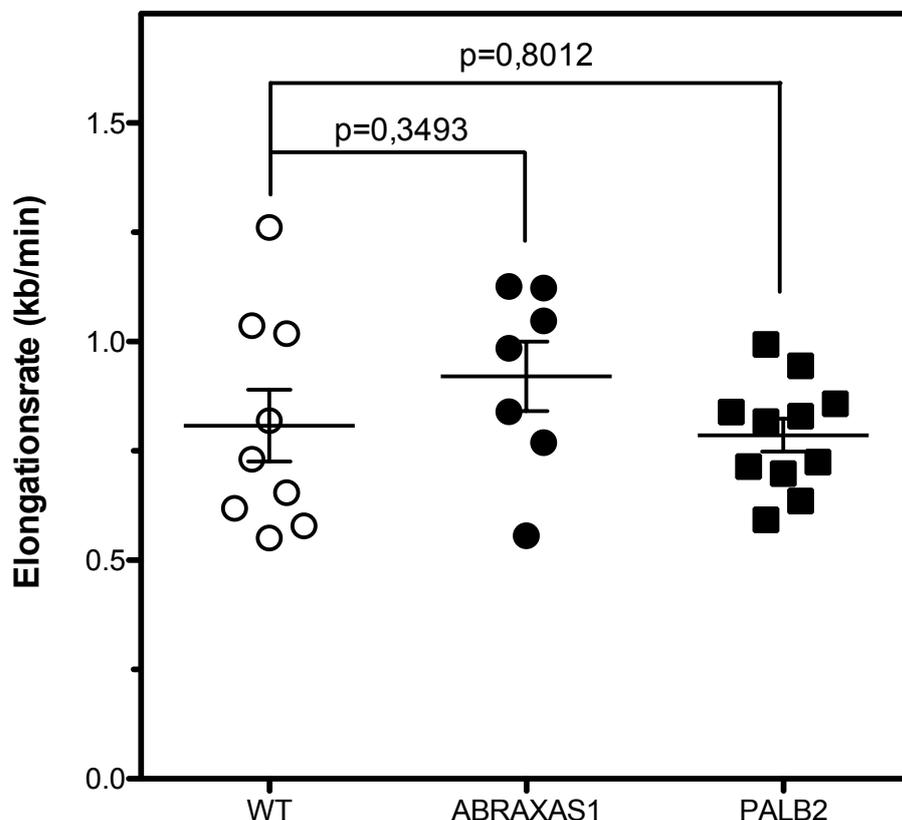


Abbildung 15: Kein Einfluss der heterozygoten Mutationen in PALB2 und ABRAXAS1 auf die Elongationsrate.

Im DNA Fiber Assay wurden exponentiell wachsende lymphoblastoide Zelllinien mit heterozygoten Mutationen in PALB2 und ABRAXAS1 sowie gematchte Wildtyp-Kontrollen (WT) nacheinander für jeweils 25 min mit CldU und IdU markiert und die DNA-Stränge mittels Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Die Elongationsrate wurde anhand der Länge der Chromatinfasern und der Markierungszeit berechnet. Jeder Datenpunkt entspricht drei unabhängigen Experimenten. Dargestellt sind Mittelwerte mit SEM. Unterschiede wurden durch einen zweiseitigen Students t-Test mit einem Signifikanzniveau von $\alpha=0,05$ bestimmt.

3.2.2 Vermehrte Aktivierung von Replikationsursprüngen in Trägern der heterozygoten Mutationen in PALB2 und ABRAXAS1

Die Untersuchung der Replikationsinitiation in lymphoblastoide Trägerzelllinien mit heterozygoten Mutationen in PALB2 (c.1592delT) und ABRAXAS1 (c.1082G>A) und gematchte Kontrollen erfolgte mit dem DNA Fiber Assay. Die unbehandelten exponentiell wachsenden Zellen gemäß dem Protokoll aus Abschnitt 3.2.1 markiert. Die Häufigkeit der Replikationsursprünge erster Ordnung wurde im Verhältnis zu den gesamten auswertbaren DNA-Replikationsstrukturen bestimmt.

Abbildung 16 zeigt die mittlere Häufigkeit von Replikationsursprüngen erster Ordnung (%) in lymphoblastoiden Zelllinien mit heterozygoten Mutationen in PALB2 und ABRAXAS1 sowie in gematchten Kontrollen. Heterozygote Mutationen in PALB2 und ABRAXAS1 führen zu einer vermehrten Aktivierung von Replikationsursprüngen. Die Häufigkeit von Replikationsursprüngen erster Ordnung von 19,6% (95% KI: 14,78 - 24,31) in heterozygoten PALB2-Trägerzelllinien war signifikant höher im Vergleich zu den Kontrollen mit einer Häufigkeit von 11,15% (95% KI: 8,98 - 13,32) ($p=0,004$). Auch in heterozygoten ABRAXAS1-Trägerzelllinien war die Häufigkeit von Replikationsursprüngen von 14,66% (95% KI: 11,44 - 17,88) signifikant höher im Vergleich zu den Kontrollen ($p=0,0425$).

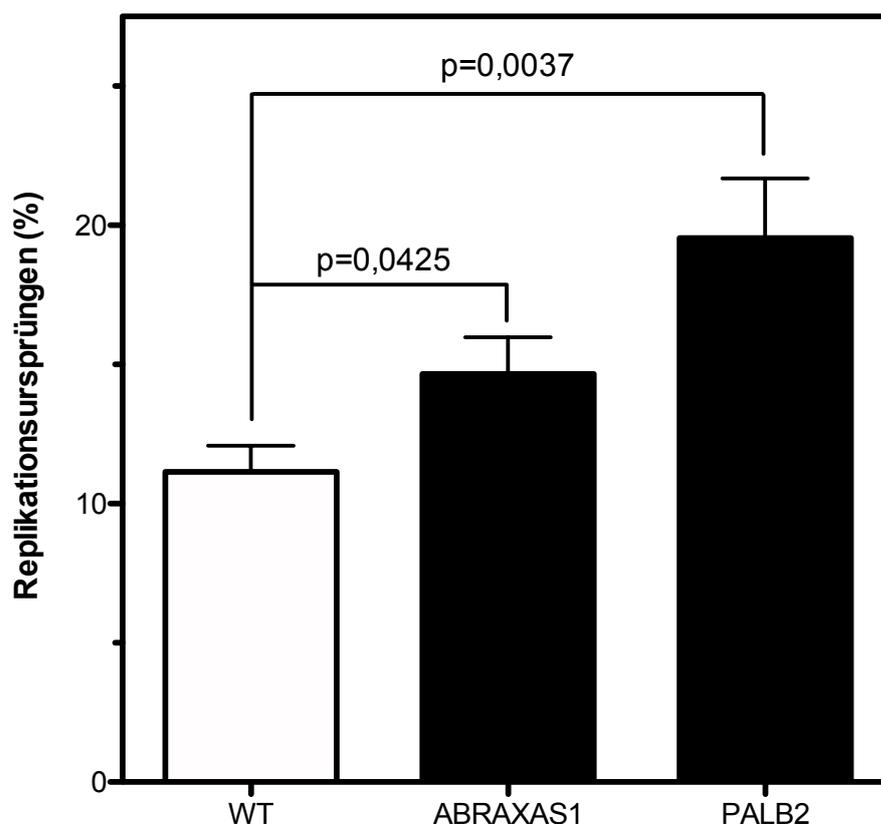


Abbildung 16: Vermehrte Aktivierung von Replikationsursprüngen in Trägern der heterozygoten Mutation in PALB2 und ABRAXAS1.

Im DNA Fiber Assay wurden exponentiell wachsende lymphoblastoide Zelllinien mit heterozygoten Mutationen in PALB2 und ABRAXAS1 sowie gematchte Wildtyp-Kontrollen (WT) nacheinander für jeweils 25 min mit CldU und IdU markiert und die DNA Stränge fluoreszenzmikroskopisch analysiert. Die Häufigkeit der Replikationsursprünge erster Ordnung wurde im Verhältnis zu den gesamten auswertbaren DNA-Replikationsstrukturen bestimmt. Jeder Balken entspricht drei unabhängigen Experimenten. Abgebildet sind Mittelwerte mit SEM. Unterschiede wurden durch einen zweiseitigen Students t-Test mit einem Signifikanzniveau von $\alpha=0,05$ bestimmt.

Zusammenfassend konnte in Abschnitt 3.2 ein Haploinsuffizienz-Phänotyp mit vermehrter Aktivierung von Replikationsursprüngen, ohne veränderte Elongationsrate, in Trägern der heterozygoten Mutation c.1592delT in PALB2 und der heterozygoten Mutation c.1082G>A in ABRAXAS1 beobachtet werden. In PALB2-Trägern zeigte sich eine Zunahme der Replikationsursprünge erster Ordnung um 75,8% im Vergleich zu den Kontrollen, während in ABRAXAS1-Trägern eine Zunahme um 31,5% beobachtet wurde. Dies deutet auf unterschiedliche Bedeutung der HR-Proteine für der DNA-Replikation hin.

Es ist unklar, ob sich die Ausprägung der Haploinsuffizienz-Phänotypen hinsichtlich der Replikationsprogression und -initiation auch unterscheidet bei verschiedenen heterozygoten Mutationen in demselben HR-Gen. Daher sollten im Folgenden überprüft werden, ob sich die Elongationsrate und die Aktivierung von Replikationsursprüngen in Zelllinien mit verschiedenen heterozygoten Mutationen in PALB2 unterscheiden.

3.3 Einfluss der heterozygoten Mutationen in c.1592delT, c.2323C>T, Y1108Sfs und c.3113G>A in PALB2 auf die Replikationsprogression und -initiation

In Abschnitt 3.2 konnte eine vermehrte Aktivierung von Replikationsursprüngen ohne Veränderung der Elongationsrate in Trägern der heterozygoten Mutationen c.1592delT in PALB2 und c.1082G>A in ABRAXAS1 gezeigt werden. Die Zunahme der Replikationsursprünge war in den PALB2-Trägerzelllinien deutlicher ausgeprägt als in ABRAXAS1-Trägern.

Um die Replikationsprogression und -initiation in Trägern verschiedener heterozygoter Mutationen in einem HR-Gen auf zu untersuchen, wurden die Replikationsstrukturen in

lymphoblastoiden Zelllinien mit verschiedenen heterozygoten Mutationen in PALB2 mit der DNA Fiber Assay Technik nach demselben Markierungsprotokoll wie in Abschnitt 3.2 bestimmt. Die Zelllinien mit der heterozygoten c.1592delT Mutation in PALB2 aus der finnischen Bevölkerung wurden verglichen mit Zelllinien mit den heterozygoten c.2323C>T und Y1108Sfs Mutationen in PALB2, beide aus der französisch-kanadischen Bevölkerung, sowie mit Zelllinien mit der heterozygoten c.3113G>A Mutation in PALB2 aus der australischen Bevölkerung.

3.3.1 Verringerte Elongationsrate in Trägern der heterozygoten Mutation c.3113G>A in PALB2

Zur Untersuchung der Replikationsprogression in Trägern verschiedener heterozygoter Mutationen in PALB2 (c.1592delT, c.2323C>T, Y1108Sfs, c.3113G>A) wurden lymphoblastoide Mutationsträgerzelllinien und jeweils gematchte Kontrollen im DNA Fiber Assay untersucht. Die unbehandelten exponentiell wachsenden Zellen wurden nacheinander für jeweils 25 min mit CldU und IdU markiert. Anschließend wurden die Chromatinfasern mittels Immunfärbung nachgewiesen. Die mittlere Elongationsrate wurde in symmetrischen Chromatinfasern bestimmt.

Abbildung 17 zeigt die mittlere Elongationsrate (kb/min) in lymphoblastoiden Zelllinien mit den heterozygoten Mutationen c.1592delT, c.2323C>T, Y1108Sfs, c.3113G>A in PALB2 sowie in gematchten Kontrollen. Die heterozygote Mutation c.3113G>A führte zu einer verringerten Elongationsrate. Die Elongationsrate von 0,82 kb/min (95% KI: 0,75 - 0,89) in Trägern der c.3113G>A Mutation war signifikant niedriger im Vergleich zu den Kontrollen mit einer Elongationsrate von 1,01 kb/min (95% KI: 0,92 - 1,10) ($p=0,0015$). Dagegen war die Elongationsrate von 0,85 kb/min (95% KI: 0,74 - 0,97) in Trägern der c.2323C>T Mutation vergleichbar mit der Elongationsrate von 0,91 kb/min (95% KI: 0,78 - 1,04) in den Kontrollen ($p=0,4996$). Die Elongationsrate von 0,87 kb/min (95% KI: 0,54 - 1,20) in Trägern mit der Y1108Sfs Mutation zeigte ebenfalls keinen signifikanten Unterschied im Vergleich zur Elongationsrate von 0,78 kb/min (95% KI: 0,61 - 0,95) in den Kontrollen ($p=0,3842$).

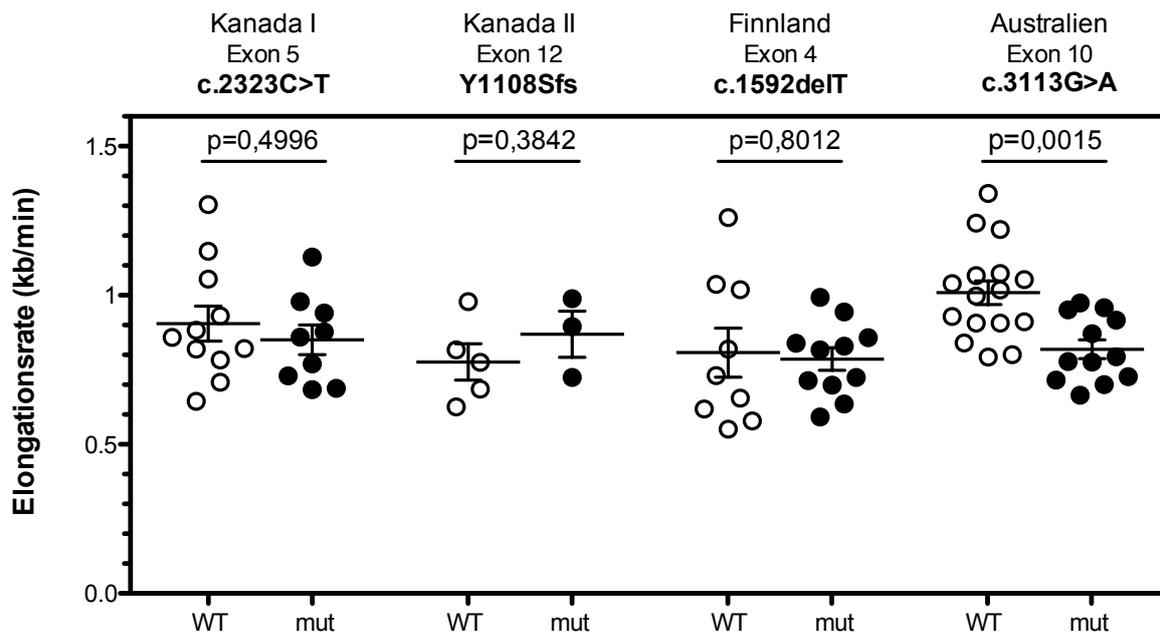


Abbildung 17: Verringerte Elongationsrate in Trägern der heterozygoten Mutation c.3113G>A in PALB2.

Zelllinien mit den heterozygoten Mutationen (mut) c.1592delT (Finnland), c.2323C>T (Kanada I), Y1108Sfs (Kanada II) und c.3113G>A (Australien) in PALB2 und gematchten Wildtyp-Kontrollen (WT) wurden untersucht. Im DNA-Fiber-Assay wurden exponentiell wachsende lymphoblastoide Zelllinien nacheinander für jeweils 25 min mit CldU und IdU markiert und die DNA Stränge fluoreszenzmikroskopisch analysiert. Die Elongationsrate wurde anhand der Länge der Chromatinfasern und der Markierungszeit berechnet. Jeder Datenpunkt entspricht drei unabhängigen Experimenten. Abgebildet sind Mittelwerte mit SEM. Unterschiede wurden durch einen zweiseitigen Students t-Test mit einem Signifikanzniveau von $\alpha=0,05$ bestimmt.

3.3.2 Deutlichste Zunahme der Aktivierung von Replikationsursprüngen in Trägern der heterozygoten Mutation c.3113G>A in PALB2

Die Replikationsinitiation in lymphoblastoiden Trägerzelllinien mit heterozygoten Mutationen in PALB2 (c.1592delT, c.2323C>T, Y1108Sfs, c.3113G>A) und jeweils gematchte Kontrollen wurden im DNA Fiber Assay analysiert. Die unbehandelten exponentiell wachsenden Zellen wurden gemäß dem Protokoll aus Abschnitt 3.3.1 markiert. Die Häufigkeit der Replikationsursprünge erster Ordnung wurde im Verhältnis zu den gesamten auswertbaren DNA-Replikationsstrukturen bestimmt.

Abbildung 18 zeigt die mittlere Häufigkeit von Replikationsursprüngen erster Ordnung (%) lymphoblastoiden Zelllinien mit den heterozygoten Mutationen c.1592delT, c.2323C>T,

Y1108Sfs, c.3113G>A in PALB2 sowie in gematchten Kontrollen. Die heterozygoten Mutationen c.1592delT, c.2323C>T und c.3113G>A in PALB2 führen zu einer vermehrten Aktivierung von Replikationsursprüngen. Bei der Mutation c.3113G>A war die relative Häufigkeit der Replikationsursprünge erster Ordnung mehr als verdoppelt, während bei der Mutation Y1108Sfs keine Veränderung zu beobachten war.

Die Häufigkeit von Replikationsursprüngen erster Ordnung von 29,01% (95% KI: 22,95 - 35,07) in heterozygoten Trägern der Mutation c.3113G>A war signifikant höher im Vergleich zu den gematchten Kontrollen mit einer Häufigkeit von 13,81% (95% KI: 10,54 - 17,12) ($p < 0,0001$). In Trägern der heterozygoten Mutation c.2323C>T konnte eine relative Häufigkeit von Replikationsursprüngen von 16,01% (95% KI: 13,33 - 18,79) beobachtet werden, die ebenfalls signifikant höher war im Vergleich zu 12,74% (95% KI: 10,98 - 14,49) bei den gematchten Kontrollen ($p = 0,0268$). Dahingegen war die relative Häufigkeit von Replikationsursprüngen von 15,03% (95% KI: 4,19 - 25,86) in Trägern der heterozygoten Y1108Sfs Mutation vergleichbar mit der von 11,15% (95% KI: 9,47 - 12,83) in den gematchten Kontrollen ($p = 0,1016$).

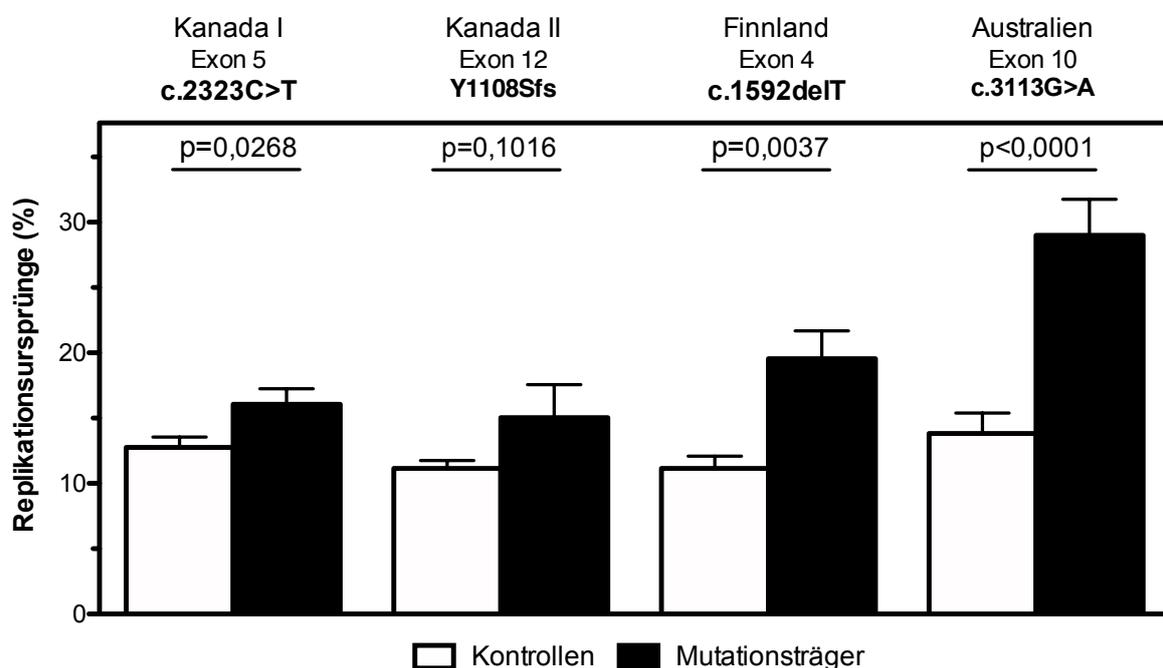


Abbildung 18: Deutlichste Zunahme der Aktivierung von Replikationsursprüngen bei Trägern der heterozygoten Mutation c.3113G>A in PALB2.

Zelllinien mit den heterozygoten Mutationen c.1592delT (Finnland), c.2323C>T (Kanada I), Y1108Sfs (Kanada II) und c.3113G>A (Australien) in PALB2 und gematchten Wildtyp-Kontrollen wurden untersucht. Im DNA Fiber Assay werden exponentiell wachsende lymphoblastoide Zelllinien

nacheinander für jeweils 25 min mit CldU und IdU markiert und die DNA Stränge fluoreszenzmikroskopisch analysiert. Die Häufigkeit der Replikationsursprünge erster Ordnung wurde im Verhältnis zu den gesamten auswertbaren DNA-Replikationsstrukturen bestimmt. Jeder Balken entspricht drei unabhängigen Experimenten. Dargestellt sind Mittelwerte mit SEM. Unterschiede wurden durch einen zweiseitigen Students t-Test mit einem Signifikanzniveau von $\alpha=0,05$ bestimmt.

In Abschnitt 3.3 der vorliegenden Arbeit konnten unterschiedlich ausgeprägte Haploinsuffizienz-Phänotypen für die Progression und Initiation der DNA-Replikation in Trägern verschiedener heterozygoter Mutationen in PALB2 beobachtet werden. Der deutlichste Replikationsdefekt, mit mehr als verdoppelter relativer Häufigkeit der Replikationsursprünge (+110,0%) und Verringerung der Elongationsrate um 18,8% zeigte sich in Trägerzelllinien der heterozygoten c.3113G>A Mutation in PALB2. Eine Zunahme der Replikationsursprünge um 75,8%, ohne Reduktion der Elongationsrate wurde in Trägern der heterozygoten Mutation c.1592delT in PALB2 festgestellt (siehe Abschnitt 3.2). Der moderatere Phänotyp mit einer um 25,6% erhöhten relativen Häufigkeit der Replikationsursprünge ohne signifikant veränderte Elongationsrate in Trägern der heterozygoten c.2323C>T Mutation in PALB2 ähnelte Trägern der heterozygoten c.1082G>A Mutation in ABRAXAS1, in denen eine Zunahme der Replikationsursprünge um 31,5% ohne veränderte Elongationsrate beobachtet wurde (siehe Abschnitt 3.2). Weder zu einer signifikanten Veränderung der Elongationsrate noch der Feuerrate der Replikationsursprünge führte die heterozygoten Y1108Sfs Mutation in PALB2. Neben der Replikationsprogression und -initiation sind Proteine des HR Komplexes auch über den Schutz angehaltener Replikationsgabeln an der Erhaltung der genomischen Stabilität beteiligt (Ait Saada, Lambert and Carr, 2018; Rickman and Smogorzewska, 2019). Um die Verbindung zwischen HR und einer effizienten DNA-Replikation zur Erhaltung der genomischen Stabilität weiter zu untersuchen, wurden im Folgenden der Einfluss der heterozygoten Mutationen c.1592delT in PALB2 und c.1082G>A in ABRAXAS1 auf den Replikationsgabelschutz unter Replikationsstress untersucht.

3.4 Einfluss der heterozygoten Mutationen c.1592delT in PALB2 und c.1082G> in ABRAXAS1 auf den Replikationsgabelschutz

Die Beeinträchtigung der Replikationsgabelprogression ist ein entscheidendes Merkmal von Replikationsstress (Feng *et al.*, 2011). Kommt es zum Anhalten von Replikationsgabeln und kann die Integrität der angehaltenen Replikationsgabeln nicht aufrechterhalten werden, so ist

die vollständige Verdopplung des Genoms innerhalb einer S-Phase des Zellzyklus gefährdet. Infolgedessen kommt es zur genomischen Instabilität der Zelle. Die HR ist von zentraler Bedeutung zum Replikationsgabelschutz unter Replikationsstress (Ait Saada, Lambert and Carr, 2018).

Im Abschnitt 3.2 konnte eine vermehrte Aktivierung von Replikationsursprüngen ohne Verringerung der Elongationsrate in Zellen mit den heterozygoten Mutationen c.1592delT in PALB2 und c.1082G>A in ABRAXAS1 gezeigt werden. Der beobachtete Haploinsuffizienz-Phänotyp könnte bedingt sein durch eine verminderte Fähigkeit zum Schutz von angehaltenen Replikationsgabeln. Können angehaltene Replikationsgabeln nicht stabilisiert werden und kollabieren, so werden mehr ruhende Replikationsursprünge aktiviert, um die vollständige Replikation während der S-Phase zu gewährleisten.

Zur Analyse des Replikationsgabelschutzes im unbehandelten Zustand, nach Unterbrechung der Replikation sowie nach DNA-Schädigung durch Bestrahlung wurden die Replikationsstrukturen in lymphoblastoiden Zelllinien mit den heterozygoten Mutationen c.1592delT in PALB2 und c.1082G>A in ABRAXAS1 nach verschiedenen Markierungsprotokollen mit der DNA Fiber Assay Technik ausgewertet. Um den Replikationsgabelschutz im unbehandelten Zustand zu charakterisieren, wurden den Zellen nacheinander für jeweils 25 min CldU und IdU zugeführt (analog des Markierungsprotokolls aus Abschnitt 3.2 und 3.3). Zur Charakterisierung des Replikationsgabelschutzes nach Unterbrechung der Replikation wurden die Zellen zwischen den beiden Markierungsphasen für vier Stunden mit 4 µm Hydroxyurea (HU) behandelt. Der Replikationsgabelschutz nach Schädigung wurde in Zellen untersucht, die zwischen den beiden Markierungsphasen mit 2 Gy bestrahlt wurden.

3.4.1 Kein Einfluss der heterozygoten Mutationen in PALB2 und ABRAXAS1 auf das Anhalten von Replikationsgabeln in unbehandelten Zelllinien

Das Anhalten von Replikationsgabeln in unbehandelten lymphoblastoiden Trägerzelllinien mit heterozygoten Mutationen in PALB2 (c.1592delT) und ABRAXAS1 (c.1082G>A) sowie gematchte Kontrollen wurde im DNA Fiber Assay untersucht. Die unbehandelten exponentiell wachsenden Zellen wurden gemäß dem Protokoll aus Abschnitt 3.2 und 3.3 markiert. Die Häufigkeit der angehaltenen Replikationsgabeln wurde im Verhältnis zu den gesamten auswertbaren DNA-Replikationsstrukturen bestimmt.

Abbildung 19 zeigt die Häufigkeit angehaltener Replikationsgabeln (%) in lymphoblastoiden Zelllinien mit heterozygoten Mutationen in PALB2 und ABRAXAS1 sowie in gematchten Kontrollen. Es konnte kein Einfluss heterozygoter Mutationen in PALB2 und ABRAXAS1 auf die Häufigkeit der angehaltenen Replikationsgabeln im unbehandelten Zustand gezeigt werden. Die Häufigkeit angehaltener Replikationsgabeln von 10,41% (95% KI: 5,04 - 15,77) in Zellen mit der heterozygoten Mutation in PALB2 war vergleichbar mit 12,32% (95% KI: 11,14 - 13,50) angehaltenen Replikationsgabeln in den Kontrollen ($p=0,4898$). Auch in heterozygoten ABRAXAS1-Trägerzelllinien zeigte die Häufigkeit der angehaltenen Replikationsgabeln von 13,32% (95% KI: 10,44 - 16,20) keinen signifikanten Unterschied im Vergleich zu den Kontrollen ($p=0,4112$).

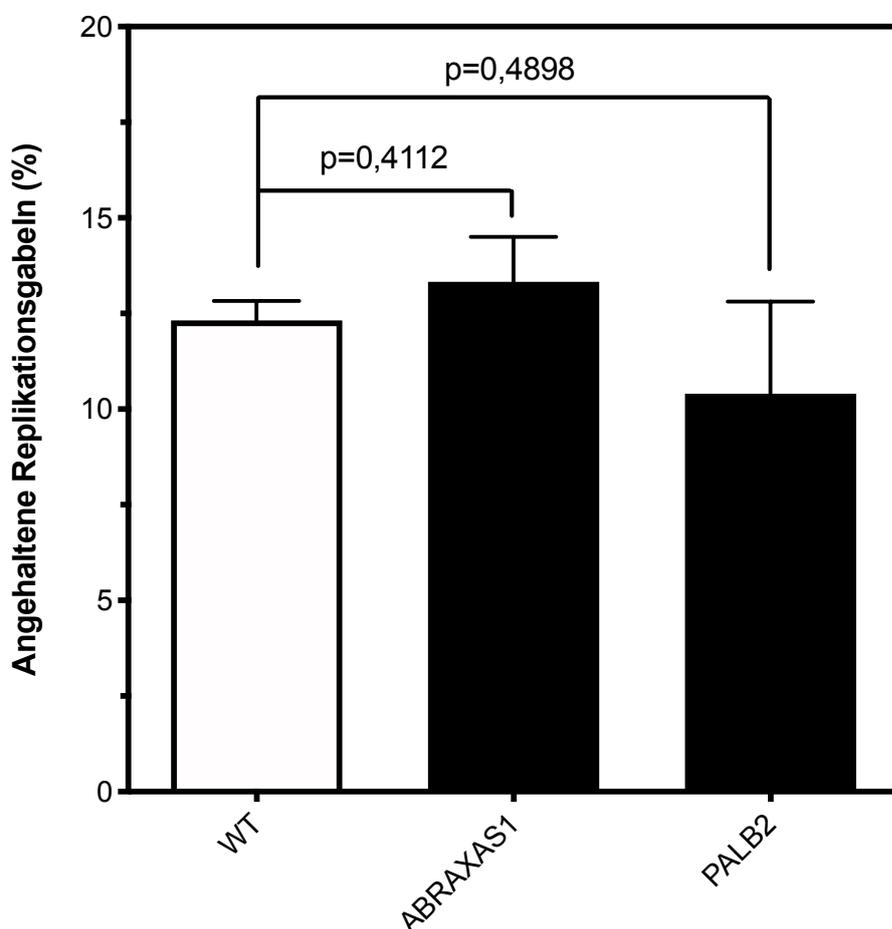


Abbildung 19: Kein Einfluss heterozygoter Mutationen in PALB2 und ABRAXAS1 auf das Anhalten von Replikationsgabeln in unbehandelten Zelllinien.

Im DNA-Fiber-Assay wurden exponentiell wachsende lymphoblastoide Zelllinien mit heterozygoten Mutationen in PALB2 und ABRAXAS1 sowie gematchte Wildtyp-Kontrollen (WT) nacheinander für jeweils 25 min mit CldU und IdU markiert und die DNA Stränge fluoreszenzmikroskopisch analysiert. Die Häufigkeit der gestoppten Replikationsgabeln wurde im Verhältnis zu den gesamten auswertbaren

DNA-Replikationsstrukturen bestimmt. Jeder Datenpunkt entspricht drei unabhängigen Experimenten. Dargestellt sind Mittelwerte mit SEM. Unterschiede wurden durch einen zweiseitigen Students t-Test mit einem Signifikanzniveau von $\alpha=0,05$ bestimmt.

3.4.2 Moderate, nicht signifikante Zunahme angehaltener Replikationsgabeln nach Hydroxyurea-Behandlung bei der heterozygoten Mutation in PALB2

Im Folgenden sollte überprüft werden, ob es zu einem vermehrten Anhalten von Replikationsgabeln nach HU-induzierter Unterbrechung der Replikation in lymphoblastoiden Zelllinien mit den heterozygoten Mutationen in PALB2 und ABRAXAS1 kommt. Dazu wurden im DNA Fiber Assay die Zellen zwischen den jeweils 25-minütigen CldU- und IdU-Markierungsphasen für 4 Stunden mit 4 μ M HU inkubiert, um die Replikation zeitweise zu unterbrechen.

Abbildung 20 zeigt die relative Häufigkeit angehaltener Replikationsgabeln (%) nach HU-Behandlung in lymphoblastoiden Zelllinien mit heterozygoten Mutationen in PALB2 und ABRAXAS1 sowie in gematchten Kontrollen. Es konnte eine moderate, jedoch nicht signifikante Zunahme der angehaltenen Replikationsgabeln in PALB2-Trägerzelllinien beobachtet werden.

Die relative Häufigkeit der angehaltenen Replikationsgabeln nach HU-Behandlung 29,7% (95% KI: 18,81 - 40,51) in PALB2-Trägerzelllinien war moderat höher als die Häufigkeit von 23,4% (95% KI: 17,18 - 29,59) in den Kontrollen, ohne eine statistische Signifikanz zu erreichen ($p=0,2365$). In Zelllinien mit der heterozygoten Mutation in ABRAXAS1 unterschied sich die Häufigkeit der angehaltenen Replikationsgabeln von 22,5% (95% KI: 15,90 - 29,16) nicht signifikant von den Kontrollen ($p=0,8293$).

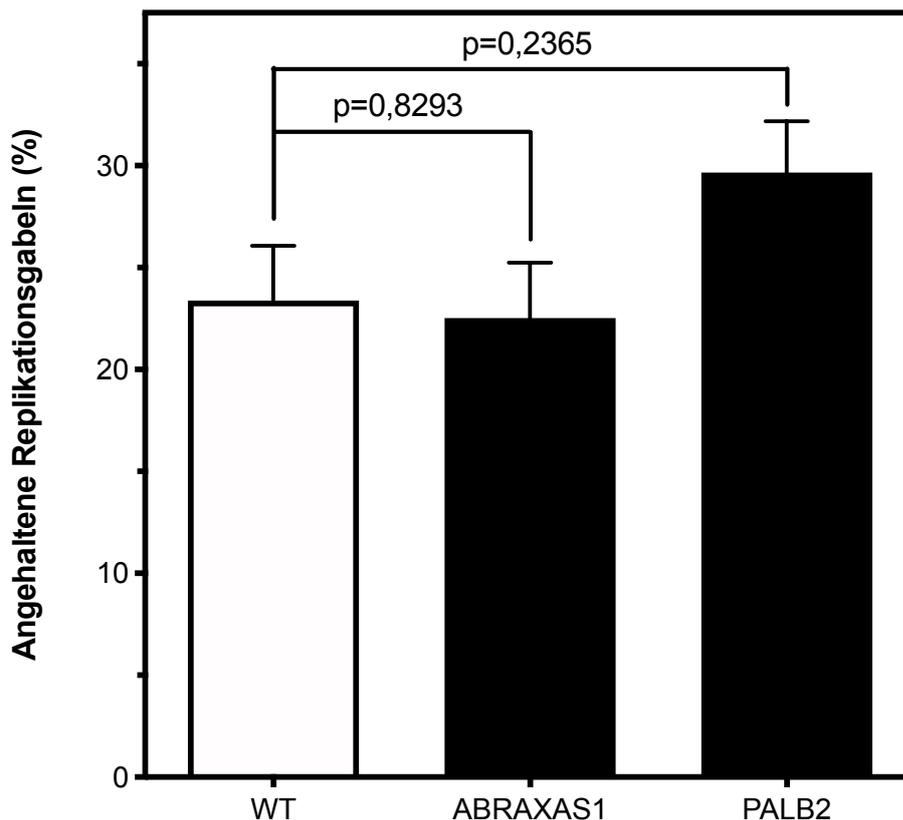


Abbildung 20: Moderate, nicht signifikante Zunahme angehaltener Replikationsgabeln nach HU-Behandlung in Zelllinien mit der heterozygoten Mutation in PALB2.

Im DNA-Fiber-Assay werden exponentiell wachsende lymphoblastoide Zelllinien mit heterozygoten Mutationen in PALB2 und ABRAXAS1 sowie gematchte Wildtyp-Kontrollen (WT) nacheinander für jeweils 25 min mit CldU und IdU markiert. Zwischen den Markierungsphasen wurde die DNA-Replikation durch eine 4 stündige Behandlung mit 4 mM HU unterbrochen. Anschließend wurden die DNA Stränge mittels Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Die Häufigkeit der gestoppten Replikationsgabeln wurde anhand ihres prozentualen Anteils an den insgesamt auswertbaren DNA-Replikationsstrukturen bestimmt. Jeder Balken entspricht drei unabhängigen Experimenten. Dargestellt sind Mittelwerte mit SEM. Unterschiede wurden durch einen zweiseitigen Students t-Test mit einem Signifikanzniveau von $\alpha=0,05$ bestimmt.

3.4.3 Moderate, nicht signifikante Reduktion der Elongationsrate nach Hydroxyurea-Behandlung bei der heterozygoten Mutation in PALB2

Weiterhin sollte untersucht werden, ob der Neustart angehaltener Replikationsgabeln durch heterozygote Mutationen in PALB2 und ABRAXAS1 verlangsamt wird. Dazu wurden die exponentiell wachsenden lymphoblastoiden Zelllinien mit den heterozygoten Mutationen in PALB2 und ABRAXAS1 sowie gematchte Kontrollen im DNA Fiber Assay entsprechend dem

Protokoll aus Abschnitt 3.4.2 zunächst mit CldU markiert, dann mit HU inkubiert und anschließend mit IdU markiert. Die mittlere IdU-Stranglänge wurde in Chromatinfasern bestimmt, die während der ersten und zweiten Markierungsphase replizierten.

Abbildung 21 zeigt die mittlere IdU-Stranglänge (μm) nach HU-Behandlung in heterozygoten PALB2- und ABRAXAS1-Trägerzelllinien und den gematchten Kontrollzelllinien. Es zeigte sich eine moderate, nicht signifikante Reduktion der IdU-Stranglängen in PALB2-Trägerzelllinien. Die durchschnittliche IdU-Stranglänge nach HU Behandlung von $1,52 \mu\text{m}$ (95% KI: 1,25 - 1,79) in PALB2-Trägern war moderat kürzer als die IdU-Stranglänge von $1,70 \mu\text{m}$ (95% KI: 1,47 - 1,93) in den Kontrollen, ohne eine statistische Signifikanz zu erreichen ($p=0,2808$). In ABRAXAS1-Trägern unterschied sich die IdU-Stranglänge nach der HU-Behandlung $1,72 \mu\text{m}$ (95% KI: 1,46 - 1,99) nicht signifikant von den Kontrollen ($p=0,8744$).

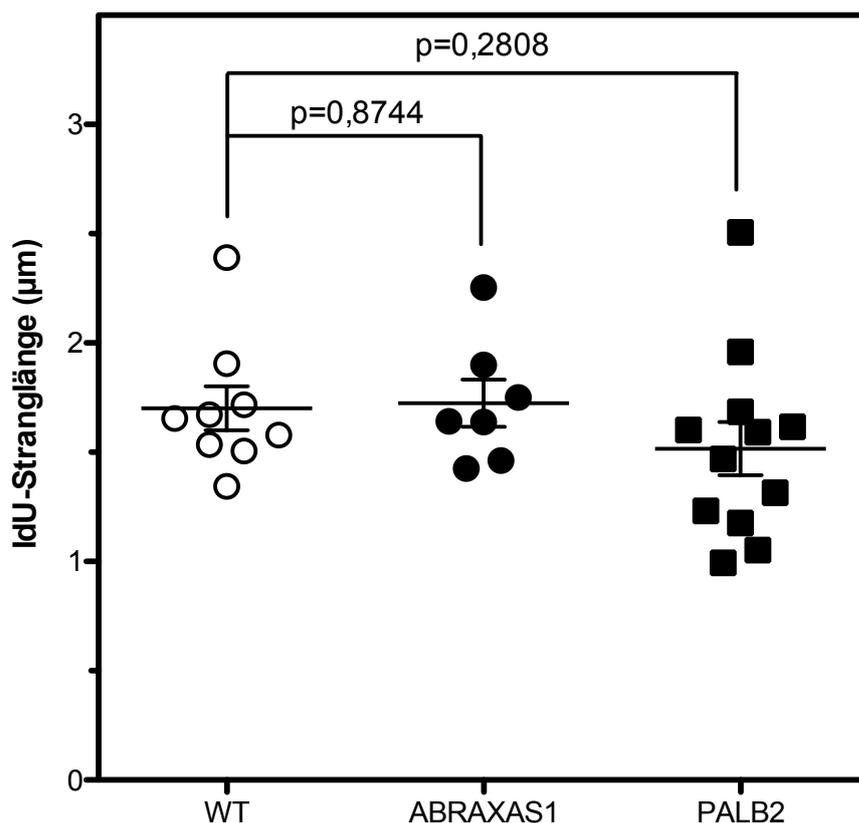


Abbildung 21: Kein Einfluss der heterozygoten Mutationen in ABRAXAS1 und PALB2 auf die IdU-Stranglänge nach HU-Behandlung.

Im DNA Fiber Assay werden exponentiell wachsende lymphoblastoide Zelllinien mit heterozygoten Mutationen in PALB2 und ABRAXAS1 sowie gematchte Wildtyp-Kontrollen (WT) nacheinander für jeweils 25 min mit CldU und IdU markiert. Zwischen den Markierungsphasen wurde die DNA-Replikation durch eine 4-stündige Behandlung mit 4 mM Hydroxyurea (HU) angehalten. Anschließend

wurden die DNA-Stränge mittels Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Die Länge der IdU markierten Chromatinfasern wurde in μm bestimmt. Abgebildet sind Mittelwerte mit SEM. Unterschiede wurden mittels eines zweiseitigen Students t-Tests mit einem Signifikanzniveau von $\alpha=0,05$ bestimmt.

3.4.4 Kein Einfluss der heterozygoten Mutationen in PALB2 und ABRAXAS1 auf den Abbau entstehender DNA-Stränge nach Hydroxyurea-Behandlung

Die Stabilisierung angehaltener Replikationsgabeln durch HR-Proteine verhindert den übermäßigen Abbau der entstehenden DNA-Stränge, der die Integrität des Genoms gefährden würde (Schlacher *et al.*, 2011). Um den Einfluss der heterozygoten Mutationen in PALB2 und ABRAXAS1 auf den Abbau der DNA-Stränge an angehaltenen Replikationsgabeln zu untersuchen wurden die exponentiell wachsenden lymphoblastoiden Zellen im DNA Fiber Assay entsprechend dem Protokoll aus Abschnitt 3.4.2 und 3.4.3 zunächst mit CldU markiert, dann mit HU inkubiert und anschließend mit IdU markiert. Die mittlere CldU-Stranglänge nach HU-Behandlung der Zellen wurde jeweils normiert auf die mittlere CldU-Stranglänge in unbehandelten Zellen.

Abbildung 22 zeigt die normierte CldU-Stranglänge in PALB2- und ABRAXAS1-Trägerzelllinien sowie gematchten Kontrollen nach HU-Behandlung. Es konnte kein übermäßiger Abbau der entstehenden DNA-Stränge in heterozygoten PALB2- und ABRAXAS1-Trägern beobachtet werden. Die relative CldU-Stranglänge von 0,86 (95% KI: 0,74 - 1,04) in heterozygoten PALB2-Trägern war vergleichbar mit 0,83 (95% KI: 0,75 - 0,91) in Kontrollzelllinien ($p=0,4675$). Die heterozygoten ABRAXAS1-Trägerzelllinien zeigten mit einer relativen CldU-Stranglänge von 0,74 (95% KI: 0,64 - 0,84) ebenfalls keinen signifikanten Unterschied im Vergleich zu den Kontrollen ($p=0,1147$).

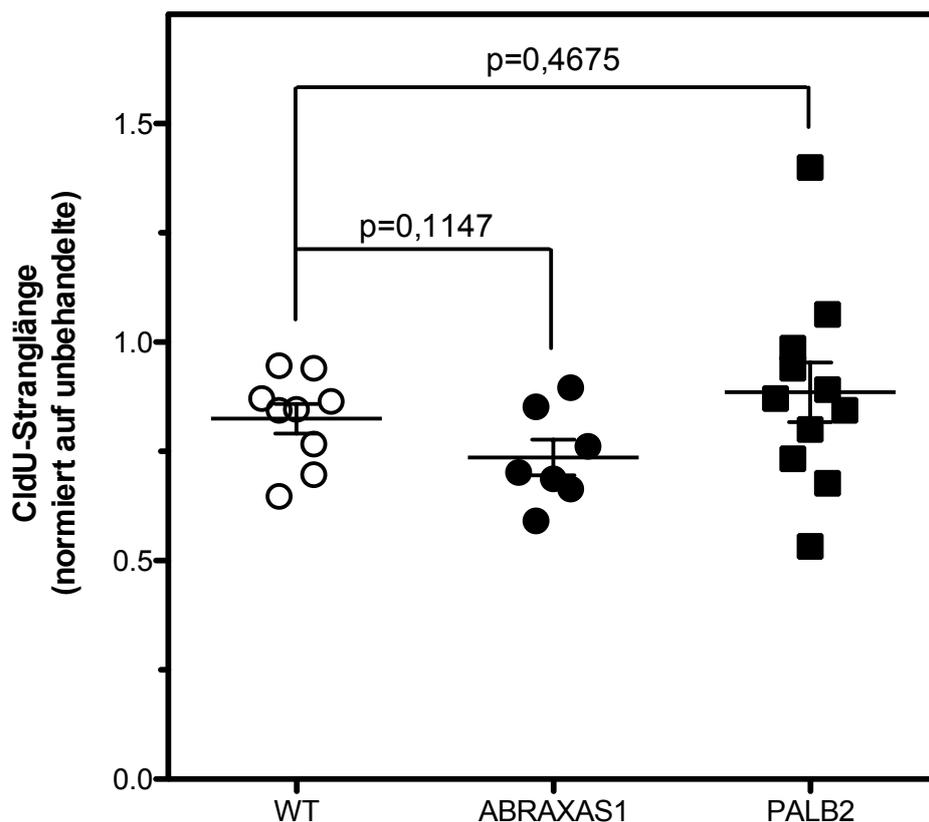


Abbildung 22: Kein Einfluss der heterozygoten Mutationen in PALB2 und ABRAXAS1 auf die CldU-Stranglänge nach HU-Behandlung.

Im DNA Fiber Assay werden exponentiell wachsende lymphoblastoide Zelllinien mit heterozygoten Mutationen in PALB2 und ABRAXAS1 sowie gematchte Wildtyp-Kontrollen (WT) nacheinander für jeweils 25 min mit CldU und IdU markiert. Zwischen den Markierungsphasen wurde die DNA-Replikation durch eine 4 stündige Behandlung mit 4 mM HU angehalten. Anschließend wurden die DNA-Stränge mittels Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Die CldU-Stranglänge nach der HU-Behandlung wurde auf die mittlere Stranglänge der jeweiligen Zelllinien im unbehandelten Zustand normiert. Jeder Datenpunkt entspricht drei unabhängigen Experimenten. Abgebildet sind Mittelwerte mit SEM. Unterschiede wurden durch einen zweiseitigen Students t-Test mit einem Signifikanzniveau von $\alpha=0,05$ bestimmt.

3.4.5 Vermehrt angehaltene Replikationsgabeln nach Bestrahlung bei der heterozygoten Mutation in PALB2

Im Folgenden sollte das Anhalten aktiver Replikationsgabeln nach durch Bestrahlung verursachter DNA-Schädigung in lymphoblastoiden Trägerzelllinien mit den heterozygoten Mutationen in PALB2 und ABRAXAS1 sowie in gematchten Kontrollen untersucht werden.

Im DNA Fiber Assay wurden die Zellen dazu zwischen den jeweils 25-minütigen CldU- und IdU-Markierungsphasen mit 2 Gy bestrahlt. Anschließend wurden die Chromatinfasern durch Immunfärbung dargestellt und die Häufigkeit der angehaltenen Replikationsgabeln im Verhältnis zu den gesamten auswertbaren DNA-Replikationsstrukturen bestimmt.

Abbildung 23 zeigt die relative Häufigkeit angehaltener Replikationsgabeln (%) nach Bestrahlung in PALB2- und ABRAXAS1-Trägerzelllinien sowie in gematchten Kontrollen. In PALB2-Trägern konnten vermehrt angehaltene Replikationsgabeln nach Bestrahlung beobachtet werden. Die Häufigkeit der angehaltenen Replikationsgabeln in PALB2-Trägern von 24,2% (95% KI: 18,37 - 30,01) war signifikant höher im Vergleich zu 12,4% (95% KI: 9,40 - 15,34) in den Kontrollzelllinien ($p=0,004$). In ABRAXAS1-Trägern war die Häufigkeit der angehaltenen Replikationsgabeln von 12,9% (95% KI: 9,42 - 16,39) mit den Kontrollen vergleichbar ($p=0,7800$).

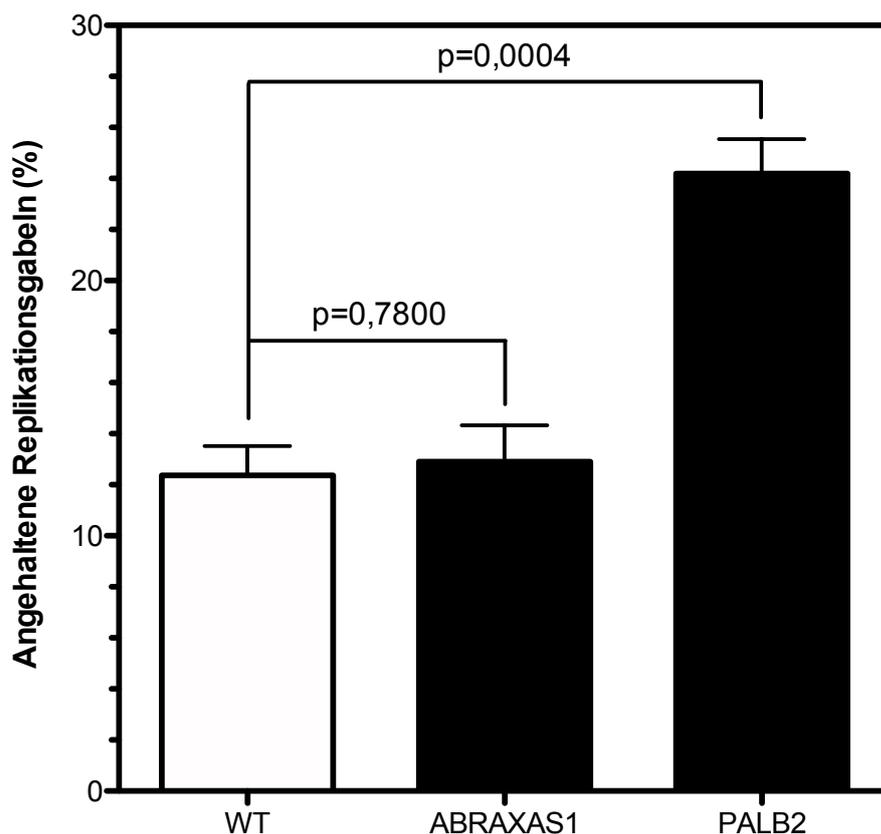


Abbildung 23: Vermehrt angehaltene Replikationsgabeln nach Bestrahlung in Zelllinien mit der heterozygoten Mutation in PALB2.

Im DNA Fiber Assay werden exponentiell wachsende lymphoblastoide Zelllinien mit heterozygoten Mutationen in PALB2 (PALB2) und ABRAXAS1 (ABRAXAS1) sowie gematchte Wildtyp-Kontrollen (WT) nacheinander für jeweils 25 min mit CldU und IdU markiert. Zwischen den Markierungsphasen

wurde durch Bestrahlung mit 6 Gy (Dosisrate: 2 Gy/min) DNA Schäden erzeugt. Anschließend wurden die DNA-Stränge fluoreszenzmikroskopisch analysiert. Die Häufigkeit der angehaltenen Replikationsgabeln wurde im Verhältnis zu den gesamten auswertbaren DNA-Replikationsstrukturen bestimmt. Die abgebildeten Mittelwerte mit SEM entsprechen drei unabhängigen Experimenten. Unterschiede wurden durch einen zweiseitigen Students t-Tests mit einem Signifikanzniveau von $\alpha=0,05$ bestimmt.

In Abschnitt 3.4 konnte keine Beeinträchtigung des Replikationsgabelschutzes in unbehandelten Zellen mit den heterozygoten Mutationen c.1592delT in PALB2 und c.1082G> in ABRAXAS1 gezeigt werden. In unbehandelten PALB2- und ABRAXAS1-Mutationsträgern wurde keine Zunahme der angehaltenen Replikationsgabeln beobachtet. Nach verstärktem Replikationsstress durch HU-induzierte Unterbrechung der Replikation kam es zu einer moderaten Zunahme angehaltener Replikationsgabeln in PALB2-Trägern im Vergleich zu den Kontrollen, die jedoch keine statistische Signifikanz erreichte. Die IdU-Stranglänge nach HU-Behandlung war ebenfalls moderat verringert in PALB2-Trägern, ohne eine statistische Signifikanz zu erreichen. Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass der Neustart der Replikation in Trägern der heterozygoten Mutation in PALB2 verzögert war. Es fand kein übermäßiger Abbau der entstehenden Stränge nach HU-Behandlung in PALB2- und ABRAXAS1-Mutationsträgern statt. Nach Bestrahlung zeigte sich eine Zunahme angehaltener Replikationsgabeln in PALB2-Trägern im Vergleich zu den Kontrollen. Im Gegensatz dazu wurde nach Bestrahlung keine Zunahme angehaltener Replikationsgabeln in ABRAXAS1-Trägern beobachtet. In Abschnitt 3.2 wurden eine deutlichere Zunahme der Aktivierung von Replikationsursprüngen in PALB2-Trägern als in ABRAXAS1-Träger gezeigt. Der Replikationsdefekt durch die heterozygote Mutation c.1592delT in PALB2 scheint deutlicher ausgeprägt zu sein als der durch die heterozygote Mutation c.1082G>A in ABRAXAS1.

4 Diskussion

Der Schutz der genomischen Integrität bei Replikationsstress ist von entscheidender Bedeutung für das zelluläre Überleben. Wird die DNA-Replikation durch DNA-Schäden beeinträchtigt, kommt es zur Aktivierung der DDR. Die biologisch am bedeutsamsten DNA-Schäden sind DSBs. Wenn DSBs nicht repariert werden, können sie zum Zelltod führen; wenn sie fehlerhaft repariert werden, können sie chromosomale Translokationen verursachen, welche mit der Krebsentstehung in Verbindung stehen (Jeggo and Löbrich, 2007). An der Reparatur von DSBs vorwiegend beteiligt sind die HR und das NHEJ (Kan and Zhang, 2015). Die HR stellt zudem einen bedeutenden Mechanismus zum Schutz von Replikationsgabeln dar (Moynahan and Jasin, 2010). Keimbahnmutationen in BRCA1 und BRCA2 beeinträchtigen die HR und sind mit einem stark erhöhten Brustkrebsrisiko assoziiert (Kuchenbaecker *et al.*, 2017). Eine erhöhte genomische Instabilität wird als Ursache für die Tumorentstehung vermutet. Auch Keimbahnmutationen in PALB2 und ABRAXAS1 wurden mit Defekten der HR und einer Tumorprädisposition in Verbindung gebracht (Erkko *et al.*, 2007; Castillo *et al.*, 2014). Keimbahnmutationen in PALB2 und ABRAXAS1 sind mit einem moderaten bis hohen Brustkrebsrisiko assoziiert, während Mutationen in BRAC1 und BRCA2 zu einem hohen Risiko für Brustkrebs führen (Erkko *et al.*, 2007; Solyom *et al.*, 2012; Kuchenbaecker *et al.*, 2017). Die zellulären Mechanismen, durch die Keimbahnmutationen in verschiedenen HR-Genen zu einer Brustkrebsprädisposition führen, ist nicht abschließend geklärt. Weiterhin ist unklar, ob die Prognose und das Therapieansprechen von Brustkrebspatientinnen durch Mutationen in HR-Genen beeinflusst werden.

Daher sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersucht werden, ob das Gesamtüberleben und der Überlebensvorteil durch Strahlentherapie von Brustkrebspatientinnen durch die mRNA-Expression von PALB2 oder ABRAXAS1 beeinflusst werden. Die Nutzung der Expressionsdaten von Brusttumoren als prognostischer oder prädiktiver Marker könnte neue Möglichkeiten zur personalisierten Brustkrebstherapie bieten. Strahlensensitivere Patientinnen könnten durch eine Reduktion der Strahlendosis vor erhöhter Toxizität bewahrt werden, strahlenresistentere Patientinnen könnten eine höhere Dosis erhalten, um die lokale Kontrolle der Tumorerkrankung zu gewährleisten.

Weiterhin sollten im Rahmen dieser Arbeit die Auswirkungen von heterozygoten Mutationen in PALB2 und ABRAXAS1 auf die Replikationsprogression und -initiation sowie den Replikationsgabelschutz analysiert werden. Die Charakterisierung der Replikationsdefekte

könnte helfen, die Rolle von PALB2 und ABRAXAS1 bei der Brustkrebsentstehung besser zu verstehen.

4.1 Prädiktive Rolle der Expression von Genen der Homologen Rekombination für das Ansprechen von Brustkrebspatientinnen auf Strahlentherapie

Um den Einfluss von PALB2 und ABRAXAS1 auf den Überlebensvorteil durch Strahlentherapie von Brustkrebspatientinnen zu untersuchen wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit mRNA-Expressions- und Überlebensdaten aus der METABRIC Studie (Curtis *et al.*, 2012; Pereira *et al.*, 2016) und dem TCGA Pan-Cancer Atlas (The Cancer Genome Atlas Network, 2012) in einer Metaanalyse ausgewertet. Die Untersuchung der mRNA-Expressionsdaten ist von besonderer Bedeutung, da Keimbahnmutationen in PALB2 und ABRAXAS1 selten sind (Cybulski *et al.*, 2015; Renault *et al.*, 2016). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Brustkrebspatientinnen im klinischen Stadium II sowie mit dem molekularen Subtyp Luminal-A keinen Überlebensvorteil durch Strahlentherapie haben, wenn ihre Tumore eine geringe mRNA-Expression von PALB2 zeigen. Bei hoher Expression von PALB2 bestand hingegen ein Überlebensvorteil durch Strahlentherapie in diesem Stadium, bzw. bei diesem molekularen Subtyp. Die mRNA-Expression von ABRAXAS1 hatte keine Auswirkungen auf den Überlebensvorteil durch Strahlentherapie in den verschiedenen klinischen Stadien, bzw. bei den verschiedenen molekularen Subtypen.

Der Unterschied hinsichtlich des Überlebensvorteils durch Strahlentherapie zwischen hoher und niedriger Expression von PALB2 zeigt sich in dem klinischen Stadium, bzw. bei dem molekularen Subtyp, bei dem ein Ansprechen auf die Strahlentherapie zu erwarten wäre. Generell konnte ein Überlebensvorteil durch Strahlentherapie für Brustkrebspatientinnen im klinischen Stadium II sowie mit den molekularen Subtypen *basal-like* und Luminal-A von Mao *et al.* in einer Metaanalyse der METABRIC und TCGA Daten gezeigt werden (Mao *et al.*, 2017). In den klinischen Stadien I, III und IV sowie bei Tumoren der molekularen Subtypen Luminal-B und *Her2-enriched* konnte kein Überlebensvorteil durch Strahlentherapie beobachtet werden (Mao *et al.*, 2017).

Die Beobachtung, dass ein Überlebensvorteil durch Strahlentherapie bei hoher PALB2-Expression, nicht aber bei niedriger Expression, beobachtet werden konnte, erscheint aufgrund der Rolle von PALB2 bei der DDR zunächst unerwartet. Der Wirksamkeit ionisierender

Strahlung bei der Strahlentherapie zur Krebsbehandlung geht vor allem auf die Induktion von DSBs zurück. Eine gestörte Reparatur von DSBs durch Defekte der HR-Genen BRCA1 und BRCA2 führt *in vitro* zu einer erhöhten Strahlensensitivität (Shen *et al.*, 1998). Die intrinsische Strahlensensitivität von Brusttumoren wird jedoch durch verschiedene Mechanismen beeinflusst. So lässt sich die Strahlenempfindlichkeit von luminalen Brustkrebszelllinien deutlich erhöhen sowohl durch molekulare Inhibition der BRCA1-Rad51-vermittelten HR und des Ku80-vermittelten NHEJ zur Reparatur von DNA-DSBs (Luo *et al.*, 2016). BRCA1 interagiert sowohl mit PALB2 als auch mit ABRAXAS1. Ein erhöhte Strahlensensitivität durch beeinträchtigte DSB-Reparatur bei Defekten in PALB2 und ABRAXAS1 wäre daher denkbar. Park *et al.* zeigten erstmals, dass Mutationen in PALB2, die die Bindung zu BRCA2 und RAD51 beeinträchtigen, zu einer erhöhten Strahlensensitivität und einem HR-Defekt in Brustkrebszelllinien führen (Park *et al.*, 2014). Der Einfluss von Defekten in ABRAXAS1 auf die Strahlensensitivität wurde zuerst von Castillo *et al.* untersucht. Ein ABRAXAS1 *knockout* führte zu einer deutlich gesteigerten Strahlensensitivität in Mäusen (Castillo *et al.*, 2014). Auf zellulärer Ebene zeigten die Autoren einen Defekt der DNA-Reparatur durch ABRAXAS1 *knockout* (Castillo *et al.*, 2014). In Anbetracht dieser Ergebnisse wäre zu erwarten, dass eine niedrige Expression von PALB2 und ABRAXAS1 klinisch zu einer erhöhten Strahlensensitivität führt. In Brustkrebspatientinnen, die mit Strahlentherapie behandelt werden, könnte eine erhöhte Strahlensensitivität einerseits zu einem besseren Therapieansprechen führen, andererseits zu einer stärkeren strahleninduzierten Toxizität. Bei einer niedrigen Expression von PALB2 bestand in der vorliegenden Arbeit jedoch kein Überlebensvorteil durch Strahlentherapie für Brustkrebspatientinnen, für die ein Therapieansprechen zu erwarten gewesen wäre. Eine mögliche Erklärung ist, dass Tumoren mit niedriger PALB2-Expression weniger aggressiv sein könnten und der Überlebensvorteil durch Strahlentherapie deshalb geringer ausgeprägt ist. Dafür spricht, dass das mediane Gesamtüberleben der Patientinnen mit Luminal-A Brusttumoren, die nicht mit Strahlentherapie behandelt wurden, und niedriger PALB2-Expression länger war, als bei einer hohen Expression (187,0 Monate gegenüber 131,3 Monaten) (siehe Abschnitt 3.1.4). Eine aktuelle *in vitro* Studie von Li *et al.* deutet darauf hin, dass die Überexpression von PALB2 die Migration und Invasion von Brustkrebszellen fördert (Li *et al.*, 2018). Eine erhöhte Expression von PALB2 korrelierte in dieser Studie zudem mit aggressiveren Tumoren und einem kürzeren Gesamtüberleben von Brustkrebspatientinnen. Für den Überlebensvorteil durch Strahlentherapie von Brustkrebspatientinnen entscheidend ist die Reduktion des Rezidivrisikos (Wang *et al.*, 2011). Somit könnte ein geringeres Rezidivrisiko der weniger aggressiven Tumoren mit niedriger

PALB2-Expression dafür verantwortlich sein, dass der Überlebensvorteil durch Strahlentherapie weniger ausgeprägt ist.

Die Überexpression von PALB2 in aggressiveren Tumoren erscheint unerwartet, da PALB2 als Tumorsuppressorgen gilt und Dysfunktionen die genomische Instabilität fördern (Nikkilä *et al.*, 2013). Mögliche Erklärungen für die PALB2-Überexpression sind, dass die Expression von PALB2 in Krebszellen induziert wird, um die DNA-Reparatur oder den Replikationsgabelschutz zu fördern, oder dass die PALB2-Expression durch zelluläre Proliferation induziert werden könnte (Li *et al.*, 2018). Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass PALB2 bei der Entstehung und bei der Progression von Brustkrebs unterschiedliche Rollen einnehmen könnte. Es ist unklar, ob diese Rolle spezifisch für PALB2 ist. In der vorliegenden Arbeit konnte kein vergleichbarer Einfluss der Expression von ABRAXAS1 auf den Überlebensvorteil durch Strahlentherapie beobachtet werden. Der Zusammenhang zwischen der Expression von anderen HR-Genen und der Prognose von Krebspatienten wurde in früheren Arbeiten untersucht. Auch eine niedrige BRCA1-Expression wurde als günstiger prognostischer Marker identifiziert, korrelierte jedoch mit einem verbesserten Ansprechen auf eine Chemotherapie bei Patientinnen mit epithelalem Ovarialkarzinom (Carser *et al.*, 2011).

Im Gegensatz zu den Beobachtungen von Carser *et al.* und der vorliegenden Arbeit beschrieben Söderlund *et al.*, bei einer geringen Expression des BRCA1/BRCA2/Rad51-Komplexes eine schlechte Prognose und eine gutes Ansprechen auf Strahlentherapien, in einer Studie mit Brustkrebspatientinnen im Frühstadium (Söderlund, Skoog, *et al.*, 2007). Diese Beobachtungen unterscheiden sich von einer früheren Arbeit dieser Gruppe, in der bei einer geringen Expression des am NHEJ beteiligten Mre11/Rad50/Nbs1-Komplex ein schlechtes Ansprechen auf die Strahlentherapie festgestellt wurde (Söderlund, Stål, *et al.*, 2007). Dies deutet darauf hin, dass sich an der HR und anderen DNA-Reparaturkomplexen beteiligte Proteine hinsichtlich ihrer Bedeutung für die Brustkrebsprogression und die klinische Strahlensensitivität unterscheiden. Die Funktionen von PALB2 und ABRAXAS1 in diesem Zusammenhang sollte in zukünftigen Arbeiten näher untersucht werden.

Eine Einschränkung der vorliegenden Arbeit ist die retrospektive Auswertung der METABRIC und TCGA Daten. Der Einfluss unbekannter Faktoren auf den Überlebensvorteil durch Strahlentherapie kann daher nicht sicher ausgeschlossen werden. Der Auswirkung der PALB2-Expression auf die lokalen und systemischen Brustkrebsprogression, die Strahlensensitivität und den Überlebensvorteil durch Strahlentherapie von Brustkrebspatientinnen sollte in klinischen Studien weiter untersucht werden. Die Expression von PALB2 und anderen HR-Proteinen könnte einen prognostisch wertvollen Marker für viele Patientinnen mit

sporadischem Brustkrebs darstellen. In Zukunft könnte es zudem möglich sein, PALB2 und weitere HR-Proteine mit Medikamenten gezielt zu hemmen, um Patienten für die Strahlentherapie zu sensibilisieren.

4.2 Replikationsdefekte bei Mutationen in Genen der Homologen Rekombination

PALB2, ABRAXAS1 und weitere HR-Proteine sind am Replikationsgabelschutz, der DDR und der DNA-Reparatur beteiligt, und gewährleisten so die genomische Stabilität. Heterozygote Keimbahnmutationen in HR-Genen sind mit einem erhöhten Brustkrebsrisiko assoziiert (Kuchenbaecker *et al.*, 2017). Eine Haploinsuffizienz für bestimmte Funktionen der HR-Proteine wird als Ursache der Brustkrebsprädisposition in heterozygoten Mutationsträgern angenommen (Pathania *et al.*, 2014).

In der vorliegenden Arbeit konnte ein Haploinsuffizienz-Phänotyp für die DNA-Replikation in Trägern der heterozygoten Mutationen c.1592delT in PALB2 und c.1082G>A in ABRAXAS1 beobachtet werden. Eine Haploinsuffizienz für die Replikationsinitiation manifestierte sich in PALB2- und ABRAXAS1-Trägern in einer erhöhten Feuerrate von Replikationsursprüngen, ohne veränderte Elongationsrate. Die Feuerrate von Replikationsursprüngen war in PALB2-Trägern deutlicher erhöht als in ABRAXAS1-Trägern.

Die Ausprägung des Defekts der Replikationsinitiation und -progression unterscheidet sich nicht nur zwischen PALB2- und ABRAXAS1-Trägern. Zwischen den Trägern der heterozygoten Mutationen c.1592delT, c.2323C>T, Y1108Sfs, c.3113G>A in PALB2 bestanden noch deutlichere Unterschiede, als zwischen den Trägern von c.1082G>A in ABRAXAS1 und c.1592delT in PALB2. Der deutlichste Replikationsdefekt, mit mehr als verdoppeltem Anteil der Replikationsursprünge und Verringerung der Elongationsrate zeigte sich in Trägern der heterozygoten c.3113G>A Mutation in PALB2. Der moderatere Phänotyp in Trägern der heterozygoten c.2323C>T Mutation in PALB2 ähnelte Trägern der heterozygoten c.1082G>A Mutation in ABRAXAS1. Demgegenüber wurde weder eine Veränderung der Elongationsrate noch der Feuerrate der Replikationsursprünge in Trägern der heterozygoten Y1108Sfs Mutation in PALB2 beobachtet.

Der Replikationsgabelschutz war nur in PALB2-Trägern beeinträchtigt. Nach HU-induzierter Unterbrechung der Replikation zeigten sich eine moderate, nicht signifikante Zunahme der angehaltenen Replikationsgabeln sowie eine moderate, nicht signifikante Reduktion der

mittleren IdU-Stranglänge in Trägern der heterozygoten Mutationen c.1592delT in PALB2. Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass der Neustart angehaltener Replikationsgabeln durch die Mutation in PALB2 beeinträchtigt ist. Ein exzessiver Abbau der entstehenden DNA-Stränge an angehaltenen Replikationsgabeln konnte jedoch nicht festgestellt werden. Nach DNA-Schäden durch Bestrahlung kam es zu einer deutlichen Zunahme angehaltener Replikationsgabeln in Trägern der c.1592delT Mutation in PALB2. Im unbehandelten Zustand konnte kein vermehrtes Anhalten von Replikationsgabeln beobachtet werden.

4.2.1 Replikationsgabelschutz

Am Schutz angehaltener Replikationsgabeln durch RAD51 vor dem MRE11-abhängigen Abbau sind sowohl BRCA1 als auch BRCA2 beteiligt (Sidorova, 2017). Bei Defekten in BRCA1/2 kommt es zu einem exzessiven Abbau der wachsenden DNA-Stränge an angehaltenen Replikationsgabeln und damit zu erhöhter chromosomaler Instabilität (Schlacher *et al.*, 2011; Schlacher, Wu and Jasin, 2012). Mehrere Arbeiten deuten auf eine Rolle von BRCA1 und BRCA2 für den RAD51-vermittelten Schutz angehaltener DNA-Stränge vor dem Abbau durch Nukleasen hin, bei der die Interaktion mit PALB2 von untergeordneter Bedeutung sein könnte. Damit stehen sie im Einklang mit der Beobachtung der vorliegenden Arbeit, dass in heterozygoten PALB2-Trägern kein exzessiver Abbau der angehaltener DNA-Stränge nach HU-Behandlung auftritt. Pathania *et al.* konnten eine BRCA1-Haploinsuffizienz für die Stabilisierung angehaltener Replikationsgabeln in primären Fibroblasten und humanen Brustepithelzelllinien beobachten (Pathania *et al.*, 2014). Nach HU-Behandlung zeigte sich ein vermehrter Abbau der entstehenden DNA-Stränge in den heterozygoten BRCA1-Trägern (Pathania *et al.*, 2014). Eine aktuelle Arbeit von Daza-Martin *et al.* zeigte eine direkte Funktion von BRCA1 für den Replikationsgabelschutz über Isomerisierung mit BARD1, die unabhängig von der BRCA1-PALB2-Interaktion ist (Daza-Martin *et al.*, 2019). Die Ergebnisse von Daza-Martin *et al.* deuten darauf hin, dass der BRCA1-BARD1 durch verstärkte Interaktion die RAD51-Filamente bei der Stabilisierung angehaltener Replikationsgabeln unterstützt (Daza-Martin *et al.*, 2019). Die genauen Mechanismen sind dabei jedoch noch unklar. Für den BRCA2-vermittelten Schutz angehaltener Replikationsgabeln ist eine C-terminale Domäne von BRCA2 entscheidend, die RAD51-Filamente stabilisiert (Schlacher *et al.*, 2011). Diese Domäne ist unabhängig von der N-terminalen Transaktivierungsdomäne, über BRCA2 mit PALB2 interagiert. Diese Domäne ist nicht an der Beladung der DNA mit RAD51 beteiligt und für die HR entbehrlich (Schlacher *et al.*, 2011).

Die vorliegende Arbeit lieferte jedoch Hinweise, dass PALB2 am Neustart angehaltener Replikationsgabeln beteiligt sein könnte. In den Trägern der heterozygoten c.1592delT Mutation in PALB2 kam es nach HU-Behandlung zu vermehrt angehaltenen Replikationsgabeln und kürzeren DNA-Strängen im Anschluss an die HU-Behandlung. Diese Veränderungen waren jeweils statistisch nicht signifikant. Eine Arbeit von Murphy *et al.* lieferte ebenfalls Hinweise, dass PALB2 am Neustart angehaltener Replikationsgabeln beteiligt sein könnte (Murphy *et al.*, 2014). Diese Autoren zeigten, dass PALB2 und BRCA2 von phosphoryliertem RPA zu ssDNA-Strängen an angehaltenen Replikationsgabeln rekrutiert und dadurch den Neustart des Replisoms unterstützt (Murphy *et al.*, 2014). In Zellen mit PALB2 *knockdown* konnte eine deutliche Reduktion der Elongationsrate nach HU-Behandlung für einen Zeitraum von 50 min beobachtet werden (Murphy *et al.*, 2014). Weiterhin ließ sich die Elongationsrate nach HU-Behandlung durch Induktion der PALB2-Expression erhöhen in Zellen, die zuvor kein PALB2 exprimierten (Murphy *et al.*, 2014). Die Tatsache, dass Murphy *et al.* eine noch deutlichere Beeinträchtigung des Neustarts beobachten konnten, könnte dadurch bedingt sein, dass die Autoren Zellen mit komplettem PALB2 *knockout* untersuchten, während in der vorliegenden Arbeit Zellen mit heterozygoten Mutationen analysiert wurden. Die zellulären Mechanismen über die PALB2 den Neustart angehaltener Replikationen unterstützt, sollten in zukünftigen Experimenten untersucht werden.

Im Gegensatz dazu konnte keine Beeinträchtigung des Schutzes angehaltener Replikationsgabeln in Trägern von c.1082G>A in ABRAXAS1 beobachtet werden. Weder der Neustart angehaltener Replikationsgabeln war beeinträchtigt, noch kam es zu einem exzessiven Abbau der entstehenden Stränge an angehaltenen Replikationsgabeln. Diese Beobachtungen stehen im Einklang mit Arbeiten von Castillo *et al.*, die keine Rolle von ABRAXAS1 beim Schutz angehaltener Replikationsgabeln beobachten konnten (Castillo *et al.*, 2014). In ABRAXAS1 *knockout* Mausembryonen Fibroblasten zeigte sich kein Abbau der entstehenden DNA-Stränge nach HU-induzierter Unterbrechung der Replikation (Castillo *et al.*, 2014). Auch am effektiven Neustart angehaltener Replikationsgabel war ABRAXAS1 nicht beteiligt (Castillo *et al.*, 2014). Der *knockout* von BRCA1 führte hingegen zu einem deutlichen Defekt des Replikationsgabelschutzes (Castillo *et al.*, 2014). Die Beobachtungen deuten darauf hin, dass der von ABRAXAS1 gebildete BRCA1-A Komplex für den Replikationsgabelschutz entbehrlich ist. Die Rolle von BRCA1 für den Replikationsgabelschutz scheint unabhängig von ABRAXAS1 zu sein.

Nach DNA-Schäden durch Bestrahlung konnten in der vorliegenden Arbeit vermehrt angehaltene Replikationsgabeln in Trägern der heterozygoten Mutation c.1592delT in PALB2

nachgewiesen werden, nicht aber in Trägern der heterozygoten c.1082G>A Mutation in ABRAXAS1. Diese Beobachtungen könnten auf eine beeinträchtigte DDR in Zellen mit heterozygoter Mutation in PALB2 hinweisen.

Die Tatsache, dass PALB2 im Rahmen der DDR ein Substrat verschiedener Kinasen, wie ATM, ATR und CDKs ist deutet auf seine wichtige Rolle bei verschiedenen Schritten der HR hin (Nepomuceno *et al.*, 2017). Wie bereits in Abschnitt 4.1 diskutiert, konnte gezeigt werden, dass Mutationen in PALB2, die über die C-terminale WD-40-Domäne die Bindung zu BRCA2 und RAD51 beeinträchtigen, zu einer erhöhten Strahlensensitivität führen (Park *et al.*, 2014). Auch die in der vorliegenden Arbeit untersuchte Mutation c.1592delT in PALB2 trunziert das Proteinprodukt vor der WD40-Domäne. Somit ist denkbar, dass eine gestörte DDR durch mangelnde Interaktion mit BRCA2 und RAD51 mit der beobachteten Zunahme der angehaltenen Replikationsgabeln nach Bestrahlung in Zusammenhang steht. Auch in Zellen mit einem *knockout* von ABRAXAS1 konnte eine gestörte DNA-Reparatur und eine gesteigerte Strahlensensitivität nachgewiesen werden (Castillo *et al.*, 2014). Möglicherweise ist ABRAXAS1 als Mediator bei der DDR nach Bestrahlung jedoch weniger entscheidend als PALB2, so dass heterozygote Mutationen in ABRAXAS1 noch keinen Einfluss haben.

Die Auswirkungen von PALB2-Mutationen auf den Neustart der Replikation sollten in zukünftigen Arbeiten untersucht werden. Die vorliegende Arbeit liefert Hinweise auf einen verzögerten Neustart in PALB2-Trägern, ohne exzessiven Abbau angehaltener Stränge. Untersuchungen mit PALB2 *knockout* Zellen oder verschiedenen heterozygoten Mutationsträgern könnten helfen, die zugrundeliegenden Mechanismen zu verstehen.

Die in der vorliegenden Arbeit analysierten angehaltenen Replikationsgabeln nach Bestrahlung ermöglichen keine unmittelbaren Aussagen über die DNA-Reparatur und Strahlensensitivität der untersuchten Zellen. Die DNA-Reparaturkapazität könnte beispielsweise durch Färbung und Quantifizierung von γ H2AX-Foci oder den Comet-Assay nach Bestrahlung näher untersucht werden. Untersuchungen zum klonogen Überleben von Zellkulturen nach Bestrahlung könnten helfen, die Strahlensensitivität der heterozygoten Träger zu bestimmen. Zukünftige Arbeiten sollten die DNA-Reparatur nach Bestrahlung sowie die Strahlensensitivität in Trägern heterozygoter Mutationen in PALB2 und ABRAXAS1 genauer charakterisieren. Weiterhin könnte die Sensitivität für verschiedene DNA-Schäden von Interesse sein.

4.2.2 Replikationsinitiation und -progression

In der vorliegenden Arbeit konnte beobachtet werden, dass ein Haploinsuffizienz für die DNA-Replikation durch Mutationen in PALB2 und ABRAXAS1 hervorgerufen werden kann. Dieser Replikationsdefekt zeigte sich mit einer vermehrten Aktivierung von Replikationsursprüngen und einer Reduktion der Elongationsrate. Die Beeinträchtigung von Replikationsinitiation und -progression unterscheidet sich sowohl zwischen PALB2 und ABRAXAS1-Trägern, als auch zwischen Trägern verschiedener Mutationen in PALB2. Die Träger der c.3113G>A Mutation in PALB2 zeigten die deutlichste Zunahme der Aktivierung von Replikationsursprüngen und als einzige auch eine signifikante Verringerung der Elongationsrate.

Frühere Arbeiten, die Replikationsdefekte durch Mutationen in verschiedenen an der HR beteiligten Genen zeigten, unterstützen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit. So zeigten Daboussi *et al.* einen ausgeprägten Replikationsdefekt mit exzessivem Feuern von Replikationsursprüngen einhergehend mit einer deutlichen Reduktion der Elongationsrate in Hamsteroarialzellen mit verringerter Aktivität der HR-Proteine BRCA2, XRCC2 oder RAD51 (Daboussi *et al.*, 2008). Schwab *et al.* beobachteten, dass Zellen mit homozygoten Mutationen in FANCM die DNA-Synthese an angehaltene Replikationsgabeln nicht wiederaufgenommen können (Schwab, Blackford und Niedzwiedz, 2010). In diesen FANCM-Trägerzelllinien wurde eine Zunahme der Aktivierung von Replikationsursprüngen ohne Veränderung der Elongationsrate nachgewiesen. FANCM ist eines von 17 Proteinen, die in Patienten mit dem chromosomalen Instabilitätssyndrom Fanconi-Anämie mutiert sind (Soulier, 2011).

Die Replikationsinitiation und -progression während der S-Phase werden reguliert durch die Zellzyklus-Kontrollpunktkinase ATR und die nachgeschaltete Effektor kinase Chk1 (Feijoo *et al.*, 2001). Chk1 fördert während der normalen S-Phase die Replikationsgabelprogression, indem es die Aktivität der Replikationsursprünge kontrolliert. Petermann *et al.* zeigten, dass Chk1 während der Replikation und der normalen S-Phase die Aktivierung von Replikationsursprüngen unterdrückt, indem es die cyclinabhängigen Kinase Cdk2 inhibiert (Petermann, Woodcock and Helleday, 2010). Eine reduzierte Aktivität von Chk1 führte in dieser Arbeit zu einem vermehrten Feuern von Replikationsursprüngen und einer reduzierten Elongationsrate. Diese Ergebnisse unterstreichen den auch in der vorliegenden Arbeit beobachteten Zusammenhang zwischen einer Erhöhung der Replikationsinitiation und einer Verlangsamung der Replikationsgabelprogression. Eine unterschiedliche starke Aktivierung der ATR-Chk1-Signalkaskade in den Mutationsträgern könnte die Ausprägungen der Defekte der Replikationsinitiation und -progression erklären. Der Zusammenhang zwischen PALB2 und ATR wurde von Nikkilä *et al.* in heterozygoten PALB2-Mutationsträgern untersucht

(Nikkilä *et al.*, 2013). Dabei zeigte sich, dass je weniger PALB2 eine Zelle enthielt, desto mehr ATR exprimiert wurde. Eine höhere Expression von ATR korrelierte mit kürzeren Distanzen zwischen Replikationsursprüngen, was auf eine Aktivierung der Replikationsinitiation hindeutet. Es ist nicht bekannt, über welche Mechanismen PALB2 die Expression von ATR beeinflusst.

Die Aktivierung der ATR-Chk1-Signalkaskade in der S-Phase wurden in der vorliegenden Arbeit nicht direkt analysiert. Zukünftige Arbeiten sollten untersuchen, inwiefern die verschiedenen Mutationen in PALB2 und ABRAXAS1 zu einer unterschiedlichen Aktivierung der intra-S-Phase Signalkaskaden führen oder ihre Expression regulieren, und über welche Mechanismen diese Regulation erfolgt. Die Aktivität der intra-S-Phase Signalkaskaden könnte beispielweise mit der Western Blot Technik nachgewiesen werden.

Interessanterweise hatten Trägerinnen der Mutation c.3113G>A in PALB2 das niedrigste mittlere Erkrankungsalter von 42 Jahren (Teo *et al.*, 2013) und zudem auf zellulärer Ebene den stärksten Replikationsdefekt mit exzessivem Feuern von Replikationsursprüngen und einer verringerten Elongationsrate in der vorliegenden Arbeit. Es ist unklar, inwiefern die Ausprägung des Replikationsdefekts mit dem Erkrankungsalter und dem Brustkrebsrisiko von Mutationsträgerinnen zusammenhängen. Zukünftige Arbeiten sollten Trägerinnen verschiedener Brustkrebsrisikogenvarianten auf Replikationsdefekte untersuchen und beurteilen, ob die Beobachtungen auf zellulärer Ebene mit klinischen Daten zu Krankheitsrisiko und -alter korrelieren. Damit könnte die prognostische Rolle verschiedener Mutationen für ihre Trägerinnen genauer geklärt werden.

4.3 Ausblick

Brustkrebs ist weltweit die häufigste Krebserkrankung der Frau. Die Erkrankung kann sich auf vielfältige Weise präsentieren und entsprechend komplex sind die Therapieoptionen. Um jeder Patientin die optimale, individualisierte Therapie zukommen zu lassen, ist ein besseres Verständnis der Entstehung von Brustkrebs und seiner zellulären Reaktion auf verschiedene Therapien notwendig. Aktuell fehlen klinisch etablierte Marker für die Strahlensensitivität von Brustkrebspatientinnen, die Therapieentscheidungen beeinflussen. Die Beobachtungen der vorliegenden Arbeit, dass Brustkrebspatientinnen mit einer hohen Expression von PALB2 von einer Strahlentherapie profitieren, nicht aber solche mit einer niedrigen Expression, sollten in klinischen Studien näher untersucht werden. Möglicherweise ist das Rezidivrisiko der Tumoren

mit hoher PALB2-Expression höher und der Überlebensvorteil durch eine Strahlentherapie entsprechend ausgeprägter.

Eine aktuelle Studie legt nahe, dass die Überexpression von PALB2 *in vitro* die Migration und Invasion von Brustkrebszellen fördert (Li *et al.*, 2018). Zudem korrelierte in dieser Arbeit die erhöhte Expression von PALB2 mit aggressiveren Tumoren und einem kürzeren Gesamtüberleben. Die Beobachtungen sind erstaunlich, da PALB2 als Tumorsuppressor gilt. Genauere Untersuchungen zu den Mechanismen, über die PALB2 die Brustkrebsprogression fördert könnten helfen, prädiktive Marker für das Ansprechen auf Strahlentherapie und andere Behandlungen zu etablieren. Inwiefern die Expression von PALB2, ABRAXAS1 und anderen HR-Genen einen Einfluss auf die Tumorprogression hat ist unklar und war nicht Gegenstand der vorliegenden Arbeit.

Erblicher Brustkrebs ist im Vergleich zum sporadischen Brustkrebs selten. Dennoch sind die Mechanismen der Tumorgenese hier von großem Interesse, denn Patientinnen erkranken oft bereits in jungen Jahren. Screeninguntersuchungen, die an das individuelle Risiko angepasst sind, könnten helfen, frühzeitig eine schonende Therapie einzuleiten. Durch Untersuchungen der zellulären Prozesse in Trägerinnen von pathogenen Mutationen in Brustkrebsrisikogenen könnte die frühe Tumorentstehung besser verstanden werden. Die Erkenntnisse könnten eingesetzt werden, um individualisierte Screeninguntersuchungen und Therapien anzubieten und Risikopatientinnen eine zuverlässigere genetische Beratung zu geben. Daher sind Untersuchungen an primären humanen Zellen, wie in der vorliegenden Arbeit, von großer Bedeutung. Die Beobachtung, dass verschiedene heterozygote Mutationen in PALB2 und ABRAXAS1 die Replikation in den untersuchten Zelllinien in unterschiedlichem Maße stören, sollte näher untersucht werden. Es ist unklar, welche klinischen Auswirkungen diese Haploinsuffizienz für die DNA-Replikation hat. Denkbar wäre, dass der konstant höhere Replikationsstress in Patientinnen mit einem stärkeren Replikationsdefekt zu früheren Tumorentstehung beiträgt.

5 Abkürzungsverzeichnis

ABR	N-terminale Domäne von ABRAXAS1 über die MERIT40, RAP80 und BRCC45 gebunden werden
ABRAXAS1	<i>BRCA1 A complex subunit abraxas 1</i>
altNHEJ	Alternatives <i>non-homologous end joining</i>
ATM	<i>Ataxia-telangiectasia mutated</i>
BARD1	<i>BRCA1 Associated RING Domain 1 Protein</i>
BET	Brusterhaltende Therapie
BRCA1	<i>Breast cancer susceptibility gene 1</i>
BRCA2	<i>Breast cancer susceptibility gene 2</i>
BRCC36	<i>BRCA1/BRCA2-Containing Complex, Subunit 3</i>
BRCC45	Alternative Bezeichnung des <i>BRE (Brain and Reproductive organ Expressed)</i> Proteins aus dem BRCA1-A Komplex
BRCT	<i>BRCA1 C Terminus Domäne</i>
BRIP1	<i>BRCA1-interacting protein C-terminal helicase 1</i>
BSC	<i>Best supportive care</i>
bzw.	Beziehungsweise
ChAM	<i>Chromatin association motif</i>
CDK1	<i>Cyclin-dependent kinase 1</i>
CDK2	<i>Cyclin-dependent kinase 2</i>
CldU	Chlordesoxyuridin
CT	Computertomographie
CtIP	<i>CtBP-interacting protein</i>
DBD	DNA-Bindungsdomäne
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNA-PKcs	<i>DNA-Dependent Protein Kinase Catalytic Subunit</i>
DSB	DNA-Doppelstrangbruch
DSS1	<i>Deleted in split-hand/split-foot syndrome</i>
<i>et al.</i>	Und andere
FANCM	<i>Fanconi anemia, complementation group M</i>
ggf.	Gegebenenfalls
Gy	Gray
h	Stunden

H ₂ O	Wasser
HCL	Chlorwasserstoff
Her2	<i>Human epidermal growth receptor-2</i>
HR	Homologe Rekombination
HU	Hydroxyurea
IdU	Iododesoxyuridin
kb/m	Kilobasen pro Minute
KI	Konfidenzintervall
Ki-67	Nukleäres Protein und Proliferationsmarker Ki-67
Ku70/80	Heterodimerkomplex aus XRCC6 und XRCC5
Ku80	Proteinprodukt des XRCC5 Gens
LK	Lymphknoten
LumA	Luminal-A
LumB	Luminal-B
MERIT40	Teil des RAP80 Komplexes (ABRAXAS1, MERIT40, BRCC45, BRCC36)
METABRIC	Molecular Taxonomy of Breast Cancer International Consortium
min	Minuten
MORF4L1	<i>Mortality Factor 4 Like 1</i> Gen
MRE11	DNA-Doppelstrangbruch Protein MRE11
MRN	Komplex aus Mre11, Rad50 und NBS1
MRT	Magnetresonanztomographie
mut	Mutiert
NA	Nicht verfügbar
NC	Nicht klassifiziert
Nbs1	Nibrin, Proteinprodukt des NBN Gens
NHEJ	<i>Non-homologous end joining</i>
mRNA	<i>Messenger RNA (ribonucleic acid)</i>
PALB2	<i>Partner and localizer of BRCA2</i>
PARP	<i>Poly ADP ribose polymerase</i>
PIKK	<i>PI3-kinase-related protein kinase</i>
Rad50	<i>DNA repair protein RAD50</i>
RAD51	Gen, welches das DNA-Reparaturprotein Rad51 kodiert
RAP80	<i>Receptor-associated protein 80</i>
SCD	<i>SCD, SQ/TQ cluster domain</i>

ssDNA	<i>Single strand DNA</i> , DNA-Einzelstrang
SEM	<i>Standard error of the mean</i> , Standardfehler des Mittelwerts
SNLE	Sentinel-Lymphknotenbiopsie
S-Phase	Synthesephase des Zellzyklus
pSPxF-Motiv	Phosphoryliertes Serin-Prolin-x-Phenylalanin Motiv, Bindungsstelle für die BRCA1-BRCT Domäne
TOPBP1	<i>DNA topoisomerase 2-binding protein 1</i>
TCGA	<i>The Cancer Genome Atlas</i>
UICC	<i>Union internationale contre le cancer</i>
XLF	XRCC4-like factor
XRCC2	<i>X-Ray Repair Cross Complementing 2</i>
WD40	Interaktionsdomäne eukaryotischer Proteine
WT	Wildtyp
γ H2AX	Phosphoryliertes Histon H2AX
μ l	Mikroliter
μ m	Mikrometer
μ M	Mikromolar
$^{\circ}$ C	Grad Celsius
%	Prozent

6 Literaturverzeichnis

- Ahnesorg, P., Smith, P. and Jackson, S. P. (2006) 'XLF interacts with the XRCC4-DNA Ligase IV complex to promote DNA nonhomologous end-joining', *Cell*, 124(2), pp. 301–313. doi: 10.1016/j.cell.2005.12.031.
- Ait Saada, A., Lambert, S. A. E. and Carr, A. M. (2018) 'Preserving replication fork integrity and competence via the homologous recombination pathway', *DNA Repair*. Elsevier, 71(August), pp. 135–147. doi: 10.1016/j.dnarep.2018.08.017.
- Amat, S. *et al.* (2002) 'Scarff-Bloom-Richardson (SBR) grading: a pleiotropic marker of chemosensitivity in invasive ductal breast carcinomas treated by neoadjuvant chemotherapy.', *International journal of oncology*, 20(4), pp. 791–796. doi: 10.3892/ijo.20.4.791.
- Baeyens, A. *et al.* (2004) 'Chromosomal radiosensitivity in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers', *International Journal of Radiation Biology*, 80(10), pp. 745–756. doi: 10.1080/09553000400017937.
- Bleuyard, J. Y. *et al.* (2012) 'ChAM, a novel motif that mediates PALB2 intrinsic chromatin binding and facilitates DNA repair', *EMBO Reports*, 13(2), pp. 135–141. doi: 10.1038/embor.2011.243.
- Bose, M. *et al.* (2019) 'BRCA1 mislocalization leads to aberrant DNA damage response in heterozygous ABRAXAS1 mutation carrier cells', *Human Molecular Genetics*, ddz252. doi: 10.1093/hmg/ddz252.
- Buisson, R. *et al.* (2017) 'Coupling of Homologous Recombination and the Checkpoint by ATR', *Molecular Cell*, 65(2), pp. 336–346. doi: 10.1016/j.molcel.2016.12.007.
- Burstein, H. J. *et al.* (2016) 'Adjuvant Endocrine therapy for women with hormone receptor-positive breast cancer: American society of clinical oncology clinical practice guideline update on ovarian suppression', *Journal of Clinical Oncology*, 34(14), pp. 1689–1701. doi: 10.1200/JCO.2015.65.9573.
- Bzymek, M. *et al.* (2010) 'Double holliday junctions are intermediates of DNA break repair', *Nature*. Nature Publishing Group, 464(7290), pp. 937–941. doi: 10.1038/nature08868.
- Carser, J. E. *et al.* (2011) 'BRCA1 is both a prognostic and predictive biomarker of response to chemotherapy in sporadic epithelial ovarian cancer', *Gynecologic Oncology*. Elsevier Inc., 123(3), pp. 492–498. doi: 10.1016/j.ygyno.2011.08.017.
- Carter, C., Allen, C. and Henson, D. (1989) 'Relation of tumor size, lymph node status and prognosis in breast cancer', *Cancer*, 63, pp. 181–187. doi: 10.1016/0960-7404(93)90064-6.
- Castillo, A. *et al.* (2014) 'The BRCA1-interacting protein Abraxas is required for genomic

- stability and tumor suppression.’, *Cell reports*, 8(3), pp. 807–17. doi: 10.1016/j.celrep.2014.06.050.
- Cerami, E. *et al.* (2012) ‘The cBio Cancer Genomics Portal: An open platform for exploring multidimensional cancer genomics data’, *Cancer Discovery*, 2(5), pp. 401–404. doi: 10.1158/2159-8290.CD-12-0095.
- Chaudhuri, A. R. *et al.* (2016) ‘Replication fork stability confers chemoresistance in BRCA-deficient cells’, *Nature*. Nature Publishing Group, 535(7612), pp. 382–387. doi: 10.1038/nature18325.
- Coates, A. S. *et al.* (2015) ‘Tailoring therapies-improving the management of early breast cancer: St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2015’, *Annals of Oncology*, 26(8), pp. 1533–1546. doi: 10.1093/annonc/mdv221.
- Coles, C. E. *et al.* (2017) ‘Partial-breast radiotherapy after breast conservation surgery for patients with early breast cancer (UK IMPORT LOW trial): 5-year results from a multicentre, randomised, controlled, phase 3, non-inferiority trial’, *The Lancet*, 390(10099), pp. 1048–1060. doi: 10.1016/S0140-6736(17)31145-5.
- Curtis, C. *et al.* (2012) ‘The genomic and transcriptomic architecture of 2,000 breast tumours reveals novel subgroups’, *Nature*, 486(7403), pp. 346–352. doi: 10.1038/nature10983.
- Cybulski, C. *et al.* (2015) ‘Clinical outcomes in women with breast cancer and a PALB2 mutation: a prospective cohort analysis’, *The Lancet Oncology*, 16(June), pp. 638–644. doi: 10.1016/S1470-2045(15)70142-7.
- Daboussi, F. *et al.* (2008) ‘A homologous recombination defect affects replication-fork progression in mammalian cells’, *Journal of Cell Science*, 121(2), pp. 162–166. doi: 10.1242/jcs.010330.
- Daley, J. M. *et al.* (2015) ‘Biochemical mechanism of DSB end resection and its regulation’, *DNA Repair*. Elsevier B.V., 32, pp. 66–74. doi: 10.1016/j.dnarep.2015.04.015.
- Daza-Martin, M. *et al.* (2019) ‘Isomerization of BRCA1–BARD1 promotes replication fork protection’, *Nature*. Springer US, 571(7766), pp. 521–527. doi: 10.1038/s41586-019-1363-4.
- Dikomey, E. *et al.* (2016) ‘Strahlenempfindlichkeit von Tumorzellen’, in Zeller, J. and Zur Hausen, H. (eds) *Onkologie: Grundlagen - Diagnostik - Therapie - Entwicklung*. 37. Erg. L. ecomed Storck.
- Ding, X. *et al.* (2016) ‘Synthetic viability by BRCA2 and PARP1/ARTD1 deficiencies’, *Nature Communications*, 7(May). doi: 10.1038/ncomms12425.
- Dray, E. *et al.* (2010) ‘Enhancement of the RAD51 Recombinase Activity by the Tumor Suppressor PALB2’, *Nat Struct Mol Biol*, 17(10), pp. 1255–1259. doi: doi:10.1038/nsmb.1916.

- EBCTCG (2011a) 'Effect of radiotherapy after breast-conserving surgery on 10-year recurrence and 15-year breast cancer death: Meta-analysis of individual patient data for 10 801 women in 17 randomised trials', *The Lancet*. Elsevier Ltd, 378(9804), pp. 1707–1716. doi: 10.1016/S0140-6736(11)61629-2.
- EBCTCG (2011b) 'Relevance of breast cancer hormone receptors and other factors to the efficacy of adjuvant tamoxifen: Patient-level meta-analysis of randomised trials', *The Lancet*. Elsevier Ltd, 378(9793), pp. 771–784. doi: 10.1016/S0140-6736(11)60993-8.
- Erkko, H. *et al.* (2007) 'A recurrent mutation in PALB2 in Finnish cancer families', *Nature*, 446(7133), pp. 316–319. doi: 10.1038/nature05609.
- Erkko, H. *et al.* (2008) 'Penetrance analysis of the PALB2 c.1592delT founder mutation', *Clinical Cancer Research*, 14(14), pp. 4667–4671. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-08-0210.
- Feijoo, C. *et al.* (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), pp. 913–923. doi: 10.1083/jcb.200104099.
- Feng, W. *et al.* (2011) 'Replication stress-induced chromosome breakage is correlated with replication fork progression and is preceded by single-stranded DNA formation', *G3: Genes, Genomes, Genetics*, 1(5), pp. 327–335. doi: 10.1534/g3.111.000554.
- Feng, W. and Jasin, M. (2017) 'Homologous recombination and replication fork protection: BRCA2 and more!', *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.*, 82, pp. 329–338. doi: doi:10.1101/sqb.2017.82.035006.
- Foulkes, W. D. *et al.* (2007) 'Identification of a novel truncating PALB2 mutation and analysis of its contribution to early-onset breast cancer in French-Canadian women', *Breast Cancer Research*, 9(6), pp. 1–9. doi: 10.1186/bcr1828.
- Fulford, L. G. *et al.* (2007) 'Basal-like grade III invasive ductal carcinoma of the breast: Patterns of metastasis and long-term survival', *Breast Cancer Research*, 9(1), pp. 1–11. doi: 10.1186/bcr1636.
- Gaillard, H., García-Muse, T. and Aguilera, A. (2015) 'Replication stress and cancer', *Nature Reviews Cancer*. Nature Publishing Group, 15(5), pp. 276–280. doi: 10.1038/nrc3916.
- Galea, M. H. *et al.* (1992) 'The Nottingham prognostic index in primary breast cancer', *Breast Cancer Research and Treatment*, 22(3), pp. 207–219. doi: 10.1007/BF01840834.
- Gao, J. *et al.* (2014) 'Integrative Analysis of Complex Cancer Genomics and Clinical Profiles Using the cBioPortal', *Sci Signal*, 6(269), pp. 1–34. doi: doi:10.1126/scisignal.2004088.
- De Gelder, R. *et al.* (2015) 'The effects of population-based mammography screening starting between age 40 and 50 in the presence of adjuvant systemic therapy', *International Journal of*

- Cancer*, 137(1), pp. 165–172. doi: 10.1002/ijc.29364.
- Giersiepen, K. *et al.* (2005) *Gesundheitsberichterstattung des Bundes - Brustkrebs*, Robert Koch-Institut Gesundheitsberichterstattung des Bundes.
- Gilchrist, K. W. *et al.* (1985) ‘Interobserver reproducibility of histopathological features in stage II breast cancer: An ECOG study’, *Breast Cancer Research and Treatment*, 5(1), pp. 3–10. doi: 10.1007/BF01807642.
- Giuliano, A. E. *et al.* (1995) ‘Improved axillary staging of breast cancer with sentinel lymphadenectomy’, *Annals of Surgery*, 222(3), pp. 394–401. doi: 10.1097/00000658-199509000-00016.
- Giuliano, A. and Hortobagyi, G. N. (2017) ‘AJCC Cancer Staging Manual 8th Edition: Breast’, in *AJCC Cancer Staging Manual, 8th Edition*. doi: 10.5005/jp/books/14184_23.
- Gorodetska, I., Kozeretska, I. and Dubrovska, A. (2019) ‘BRCA genes: The role in genome stability, cancer stemness and therapy resistance’, *Journal of Cancer*, 10(9), pp. 2109–2127. doi: 10.7150/jca.30410.
- Group, A. B. C. S. (2000) ‘Prevalence and penetrance of BRCA1 and BRCA2 mutations in a population-based series of breast cancer cases’, *British Journal of Cancer*, 83(10), pp. 1301–1308. doi: 10.1054/bjoc.2000.1407.
- Group, I. C. H. (1996) ‘RADIOTHERAPY WITH OR WITHOUT HYPERTHERMIA IN THE TREATMENT OF SUPERFICIAL LOCALIZED BREAST CANCER: RESULTS FROM FIVE RANDOMIZED CONTROLLED TRIALS INTERNATIONAL COLLABORATIVE HYPERTHERMIA GROUP: UK Medical Research Council: European Society for Hyperthermi’, *Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys.*, 35(4), pp. 73–744.
- Group, T. B. I. G. (BIG) 1-98 C. (2009) ‘A Comparison of Letrozole and Tamoxifen in Postmenopausal Women with Early Breast Cancer’, *The New England Journal of Medicine*, 360(25), pp. 2605–2615.
- Gu, J. *et al.* (2010) ‘DNA-PKcs regulates a single-stranded DNA endonuclease activity of Artemis’, *DNA Repair*. Elsevier B.V., 9(4), pp. 429–437. doi: 10.1016/j.dnarep.2010.01.001.
- Haanpää, M. *et al.* (2013) ‘Evaluation of the need for routine clinical testing of PALB2 c.1592delT mutation in BRCA negative Northern Finnish breast cancer families’, *BMC Medical Genetics*, 14(1). doi: 10.1186/1471-2350-14-82.
- Haidich, A. (2010) ‘Meta-analysis in medical research’, *HIPPOKRATIA*, 14, pp. 29–37.
- Haviland, J. S. *et al.* (2013) ‘The UK Standardisation of Breast Radiotherapy (START) trials of radiotherapy hypofractionation for treatment of early breast cancer: 10-year follow-up results of two randomised controlled trials’, *The Lancet Oncology*. Elsevier Ltd, 14(11), pp. 1086–

1094. doi: 10.1016/S1470-2045(13)70386-3.

Hayakawa, T. *et al.* (2010) 'MRG15 binds directly to PALB2 and stimulates homology-directed repair of chromosomal breaks', *Journal of Cell Science*, 123(7), pp. 1124–1130. doi: 10.1242/jcs.060178.

Houtgraaf, J. H., Versmissen, J. and van der Giessen, W. J. (2006) 'A concise review of DNA damage checkpoints and repair in mammalian cells', *Cardiovascular Revascularization Medicine*, 7(3), pp. 165–172. doi: 10.1016/j.carrev.2006.02.002.

Hu, Y. *et al.* (2011) 'RAP80-directed tuning of BRCA1 homologous recombination function at ionizing radiation-induced nuclear foci', *Genes and Development*, 25(7), pp. 685–700. doi: 10.1101/gad.2011011.

Inagaki, A., Schoenmakers, S. and Baarends, W. M. (2010) 'DNA double strand break repair, chromosome synapsis and transcriptional silencing in meiosis', *Epigenetics*, 5(4), pp. 255–266. doi: 10.4161/epi.5.4.11518.

Isakoff, S. J. (2010) 'Triple Negative Breast Cancer: Role of Specific Chemotherapy Agents', *Cancer J*, 16(1), pp. 53–61. doi: doi:10.1097/PPO.0b013e3181d24ff7.

Jackson, D. A. and Pombo, A. (1998) 'Replicon clusters are stable units of chromosome structure: Evidence that nuclear organization contributes to the efficient activation and propagation of S phase in human cells', *Journal of Cell Biology*, 140(6), pp. 1285–1295. doi: 10.1083/jcb.140.6.1285.

Jang, N. Y. *et al.* (2015) 'Radiosensitization with combined use of olaparib and PI-103 in triple-negative breast cancer.', *BMC cancer*, 15, p. 89. doi: 10.1186/s12885-015-1090-7.

Jeggo, P. A. and Löbrich, M. (2007) 'DNA double-strand breaks: Their cellular and clinical impact?', *Oncogene*, 26(56), pp. 7717–7719. doi: 10.1038/sj.onc.1210868.

Kan, C. and Zhang, J. (2015) 'BRCA1 mutation: A predictive marker for radiation therapy?', *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*, 93(2), pp. 281–293. doi: 10.1016/j.ijrobp.2015.05.037.

Kassambara, A. *et al.* (2019) *Survminer Package*. Available at: <http://www.sthda.com/english/rpkgs/survminer/> (Accessed: 19 April 2019).

Keisch, M. *et al.* (2003) 'Initial clinical experience with the MammoSite breast brachytherapy applicator in women with early-stage breast cancer treated with breast-conserving therapy', *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*, 55(2), pp. 289–293. doi: 10.1016/S0360-3016(02)04277-3.

Kohler, B. A. *et al.* (2015) 'Annual report to the nation on the status of cancer, 1975-2011, featuring incidence of breast cancer subtypes by race/ethnicity, poverty, and state', *Journal of*

the National Cancer Institute, 107(6). doi: 10.1093/jnci/djv048.

Krag, D. N. *et al.* (1993) ‘Surgical resection and radiolocalization of the sentinel lymph node in breast cancer using a gamma probe’, *Surgical Oncology*, 2(6), pp. 335–340. doi: 10.1016/0960-7404(93)90064-6.

Kuchenbaecker, K. B. *et al.* (2017) ‘Risks of breast, ovarian, and contralateral breast cancer for BRCA1 and BRCA2 mutation carriers’, *JAMA - Journal of the American Medical Association*, 317(23), pp. 2402–2416. doi: 10.1001/jama.2017.7112.

Kyrieleis, O. J. P. *et al.* (2016) ‘Three-Dimensional Architecture of the Human BRCA1-A Histone Deubiquitinase Core Complex’, *Cell Reports*. Elsevier Company., 17(12), pp. 3099–3106. doi: 10.1016/j.celrep.2016.11.063.

Li, J. *et al.* (2018) ‘High expression of PALB2 predicts poor prognosis in patients with advanced breast cancer’, *FEBS Open Bio*, 8(1), pp. 56–63. doi: 10.1002/2211-5463.12356.

Liu, J. *et al.* (2010) ‘Human BRCA2 protein promotes RAD51 filament formation on RPA-covered single-stranded DNA’, *Nature Structural and Molecular Biology*. Nature Publishing Group, 17(10), pp. 1260–1262. doi: 10.1038/nsmb.1904.

Liu, Z., Wu, J. and Yu, X. (2007) ‘CCDC98 targets BRCA1 to DNA damage sites’, *Nature Structural and Molecular Biology*, 14(8), pp. 716–720. doi: 10.1038/nsmb1279.

Llombart-Cussac, A. *et al.* (2017) ‘HER2-enriched subtype as a predictor of pathological complete response following trastuzumab and lapatinib without chemotherapy in early-stage HER2-positive breast cancer (PAMELA): an open-label, single-group, multicentre, phase 2 trial’, *The Lancet Oncology*. Elsevier Ltd, 18(4), pp. 545–554. doi: 10.1016/S1470-2045(17)30021-9.

Luo, Y. *et al.* (2016) ‘Valproic acid causes radiosensitivity of breast cancer cells: Via disrupting the DNA repair pathway’, *Toxicology Research*. Royal Society of Chemistry, 5(3), pp. 859–870. doi: 10.1039/c5tx00476d.

Macheret, M. and Halazonetis, T. D. (2015) ‘DNA Replication Stress as a Hallmark of Cancer’, *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 10(1), pp. 425–448. doi: 10.1146/annurev-pathol-012414-040424.

Mao, J. H. *et al.* (2017) ‘Revisiting the impact of age and molecular subtype on overall survival after radiotherapy in breast cancer patients’, *Scientific Reports*. Springer US, 7(1), pp. 1–8. doi: 10.1038/s41598-017-12949-5.

Mao, Z. *et al.* (2008) ‘Comparison of nonhomologous end joining and homologous recombination in human cells’, *DNA Repair*, 7(8), pp. 1765–1771. doi: 10.1016/j.dnarep.2008.06.018.

- Maréchal, A. and Zou, L. (2013) 'DNA damage sensing by the ATM and ATR kinases', *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5(9), pp. 1–18. doi: 10.1101/cshperspect.a012716.
- Moynahan, M. E. and Jasin, M. (2010) 'Mitotic homologous recombination maintains genomic stability', *Nat Rev Mol Cell Biol.*, 11(3), pp. 196–207. doi: 10.1038/nrm2851.
- Munoz, D. *et al.* (2014) 'Effects of screening and systemic adjuvant therapy on ER-Specific US breast cancer mortality', *Journal of the National Cancer Institute*, 106(11). doi: 10.1093/jnci/dju289.
- Murphy, A. K. *et al.* (2014) 'Phosphorylated RPA recruits PALB2 to stalled DNA replication forks to facilitate fork recovery', *Journal of Cell Biology*, 206(4), pp. 493–507. doi: 10.1083/jcb.201404111.
- Nepomuceno, T. C. *et al.* (2017) 'The role of PALB2 in the DNA damage response and cancer predisposition', *International Journal of Molecular Sciences*, 18(9), pp. 1–20. doi: 10.3390/ijms18091886.
- Nikkilä, J. *et al.* (2013) 'Heterozygous mutations in PALB2 cause DNA replication and damage response defects.', *Nature communications*, 4, p. 2578. doi: 10.1038/ncomms3578.
- Obermeier, K. *et al.* (2015) 'Heterozygous PALB2 c.1592delT mutation channels DNA double-strand break repair into error-prone pathways in breast cancer patients', *Oncogene*. Nature Publishing Group, (February), pp. 1–11. doi: 10.1038/onc.2015.448.
- Oliver, A. W. *et al.* (2009) 'Structural basis for recruitment of BRCA2 by PALB2', *EMBO Reports*, 10(9), pp. 990–996. doi: 10.1038/embor.2009.126.
- Oros, K. K. *et al.* (2004) 'Significant proportion of breast and/or ovarian cancer families of French Canadian descent harbor 1 of 5 BRCA1 and BRCA2 mutations', *International Journal of Cancer*, 112(3), pp. 411–419. doi: 10.1002/ijc.20406.
- Palma, D. A. *et al.* (2019) 'Stereotactic ablative radiotherapy versus standard of care palliative treatment in patients with oligometastatic cancers (SABR-COMET): a randomised, phase 2, open-label trial', *The Lancet*, 393(10185), pp. 2051–2058. doi: 10.1016/S0140-6736(18)32487-5.
- Park, J. Y. *et al.* (2014) 'Breast cancer-associated missense mutants of the PALB2 WD40 domain, which directly binds RAD51C, RAD51 and BRCA2, disrupt DNA repair', *Oncogene*. Nature Publishing Group, 33(40), pp. 4803–4812. doi: 10.1038/onc.2013.421.
- Patanaphan, V., Salazar, O. M. and Risco, R. (1988) 'Breast Cancer: Metastatic Patterns and Their Prognosis', *South Med J*, 81(9), pp. 1109–12.
- Pathania, S. *et al.* (2014) 'BRCA1 haploinsufficiency for replication stress suppression in primary cells', *Nature communications*. doi: 10.1038/ncomms6496.

- Pereira, B. *et al.* (2016) ‘The somatic mutation profiles of 2,433 breast cancers refines their genomic and transcriptomic landscapes’, *Nature Communications*. Nature Publishing Group, 7. doi: 10.1038/ncomms11479.
- Petermann, E., Woodcock, M. and Helleday, T. (2010) ‘Chk1 promotes replication fork progression by controlling replication initiation’, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(37), pp. 16090–16095. doi: 10.1073/pnas.1005031107.
- Poli, J. *et al.* (2012) ‘dNTP pools determine fork progression and origin usage under replication stress’, *EMBO Journal*, 31(4), pp. 883–894. doi: 10.1038/emboj.2011.470.
- Prakash, R. *et al.* (2015) ‘Homologous recombination and human health: The roles of BRCA1, BRCA2, and associated proteins’, *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 7(4), pp. 1–27. doi: 10.1101/cshperspect.a016600.
- Reddy, Y. V. R. *et al.* (2004) ‘Non-homologous end joining requires that the DNA-PK complex undergo an autophosphorylation-dependent rearrangement at DNA ends’, *Journal of Biological Chemistry*, 279(38), pp. 39408–39413. doi: 10.1074/jbc.M406432200.
- Renault, A. L. *et al.* (2016) ‘ABRAXAS (FAM175A) and breast cancer susceptibility: No evidence of association in the breast cancer family registry’, *PLoS ONE*, 11(6), p. 3. doi: 10.1371/journal.pone.0156820.
- Rickman, K. and Smogorzewska, A. (2019) ‘Advances in understanding DNA processing and protection at stalled replication forks’, *Journal of Cell Biology*, 218(4), pp. 1096–1107. doi: 10.1083/jcb.201809012.
- Rosenthal, S. I. *et al.* (2002) ‘Comparison of HER-2/neu oncogene amplification detected by fluorescence in situ hybridization in lobular and ductal breast cancer’, *Applied Immunohistochemistry and Molecular Morphology*, 10(1), pp. 40–46. doi: 10.1097/00022744-200203000-00007.
- Rothkamm, K. *et al.* (2003) ‘Pathways of DNA Double-Strand Break Repair during the Mammalian Cell Cycle’, *Molecular and Cellular Biology*, 23(September), pp. 5706–5715. doi: 10.1128/MCB.23.16.5706–5715.2003.
- Rowland, J. H. *et al.* (2000) ‘Role of Breast Reconstructive Surgery in Physical and Emotional Outcomes Among Breast Cancer Survivors gested that conservation or restitution of the breast might mitigate the nega- tive effects of breast cancer on women ’ s ectomy , mastectomy alone , or’, *J Natl Cancer Inst*, 92(17), pp. 1422–1429. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10974078>.
- Roy, R., Chun, J. and Powell, S. N. (2012) ‘BRCA1 and BRCA2: Different roles in a common

pathway of genome protection', *Nature Reviews Cancer*. Nature Publishing Group, pp. 68–78. doi: 10.1038/nrc3181.

Ruhstaller, T. *et al.* (2019) 'Adjuvant letrozole and tamoxifen alone or sequentially for postmenopausal women with hormone receptor-positive breast cancer: Long-term follow-up of the BiG 1-98 trial', *Journal of Clinical Oncology*, 37(2), pp. 105–114. doi: 10.1200/JCO.18.00440.

Saleh-Gohari, N. and Helleday, T. (2004) 'Conservative homologous recombination preferentially repairs DNA double-strand breaks in the S phase of the cell cycle in human cells', *Nucleic Acids Research*, 32(12), pp. 3683–3688. doi: 10.1093/nar/gkh703.

Sarantaus, L. *et al.* (2000) 'Multiple founder effects and geographical clustering of BRCA1 and BRCA2 families in Finland', *European Journal of Human Genetics*, 8(10), pp. 757–763. doi: 10.1038/sj.ejhg.5200529.

Schlacher, K. *et al.* (2011) 'Double-strand break repair-independent role for BRCA2 in blocking stalled replication fork degradation by MRE11', *Cell*. Elsevier Inc., 145(4), pp. 529–542. doi: 10.1016/j.cell.2011.03.041.

Schlacher, K., Wu, H. and Jasin, M. (2012) 'A Distinct Replication Fork Protection Pathway Connects Fanconi Anemia Tumor Suppressors to RAD51-BRCA1/2', *Cancer Cell*. Elsevier Inc., 22(1), pp. 106–116. doi: 10.1016/j.ccr.2012.05.015.

Schwab, R. A., Blackford, A. N. and Niedzwiedz, W. (2010) 'ATR activation and replication fork restart are defective in FANCM-deficient cells', *EMBO Journal*. Nature Publishing Group, 29(4), pp. 806–818. doi: 10.1038/emboj.2009.385.

Shaitelman, S. F. *et al.* (2015) 'Acute and short-term toxic effects of conventionally fractionated vs hypofractionated whole-breast irradiation: A randomized clinical trial', *JAMA Oncology*, 1(7), pp. 931–941. doi: 10.1001/jamaoncol.2015.2666.

Shen, S. X. *et al.* (1998) 'A targeted disruption of the murine *Brcal* gene causes γ -irradiation hypersensitivity and genetic instability', *Oncogene*, 17(24), pp. 3115–3124. doi: 10.1038/sj.onc.1202243.

Shuen, A. Y. and Foulkes, W. D. (2011) 'Inherited mutations in breast cancer genes-risk and response', *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 16(1), pp. 3–15. doi: 10.1007/s10911-011-9213-5.

Sidorova, J. (2017) 'A game of substrates: replication fork remodeling and its roles in genome stability and chemo-resistance', *Cell Stress*, 1(3), pp. 115–133. doi: 10.15698/cst2017.12.114.

Sigurdsson, S. *et al.* (2001) 'Basis for Avid Homologous DNA Strand Exchange by Human Rad51 and RPA', *Journal of Biological Chemistry*, 276(12), pp. 8798–8806. doi:

10.1074/jbc.M010011200.

Slamon, D. *et al.* (2011) ‘Adjuvant trastuzumab in HER2-positive breast cancer’, *New England Journal of Medicine*, 365(7), pp. 1273–83.

Slater, E. P. *et al.* (2010) ‘PALB2 mutations in European familial pancreatic cancer families’, *Clinical Genetics*, 78(5), pp. 490–494. doi: 10.1111/j.1399-0004.2010.01425.x.

Smith, B. D. *et al.* (2018) ‘Radiation Therapy for the Whole Breast: An American Society for Radiation Oncology (ASTRO) Evidence-Based Guideline Conflict of Interest Disclosure Statement’, *Practical Radiation Oncology*. Available at: [https://www.practicalradonc.org/cms/10.1016/j.prro.2018.01.012/attachment/775de137-63cb-4c5d-a7f9-](https://www.practicalradonc.org/cms/10.1016/j.prro.2018.01.012/attachment/775de137-63cb-4c5d-a7f9-95556340d0f6/mmc1.pdf)

[95556340d0f6/mmc1.pdf](https://www.practicalradonc.org/cms/attachment/2119105247/2089218135/mmc1.pdf)
<http://www.practicalradonc.org/cms/attachment/2119105247/2089218135/mmc1.pdf>.

Söderlund, K., Stål, O., *et al.* (2007) ‘Intact Mre11/Rad50/Nbs1 Complex Predicts Good Response to Radiotherapy in Early Breast Cancer’, *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*, 68(1), pp. 50–58. doi: 10.1016/j.ijrobp.2006.12.005.

Söderlund, K., Skoog, L., *et al.* (2007) ‘The BRCA1/BRCA2/Rad51 complex is a prognostic and predictive factor in early breast cancer’, *Radiotherapy and Oncology*, 84(3), pp. 242–251. doi: 10.1016/j.radonc.2007.06.012.

Solyom, S. *et al.* (2012) ‘Breast Cancer–Associated Abraxas Mutation Disrupts Nuclear Localization and DNA Damage Response Functions’, *Sci Transl Med*, 4(122). doi: 10.1126/scitranslmed.3003223.Breast.

Somyajit, K. *et al.* (2015) ‘Mammalian RAD51 paralogs protect nascent DNA at stalled forks and mediate replication restart’, *Nucleic Acids Research*, 43(20), pp. 9835–9855. doi: 10.1093/nar/gkv880.

Souchon, R. *et al.* (2009) ‘DEGRO practice guidelines for palliative radiotherapy of metastatic breast cancer: BBone metastases and metastatic spinal cord compression (MSCC)’, *Strahlentherapie und Onkologie*, 185(7), pp. 417–424. doi: 10.1007/s00066-009-2044-2.

Soulier, J. (2011) ‘Fanconi anemia’, *Hematology*.

Southey, M. C. *et al.* (2010) ‘A PALB2 mutation associated with high risk of breast cancer’, *Breast Cancer Research*, 12(6). doi: 10.1186/bcr2796.

Técher, H. *et al.* (2017) ‘The impact of replication stress on replication dynamics and DNA damage in vertebrate cells’, *Nature Reviews Genetics*. Nature Publishing Group, 18(9), pp. 535–550. doi: 10.1038/nrg.2017.46.

Teo, Z. L. *et al.* (2013) ‘Prevalence of PALB2 mutations in Australasian multiple-case breast

- cancer families', *Breast Cancer Research*, 15(1), pp. 1–14. doi: 10.1186/bcr3392.
- The Cancer Genome Atlas Network (2012) 'Comprehensive molecular portraits of human breast tumours', *Nature*, 490(7418), pp. 61–70. doi: 10.1038/nature11412.
- Tischkowitz, M. *et al.* (2013) 'Contribution of the PALB2 c.2323C>T [p.Q775X] Founder mutation in well-defined breast and/or ovarian cancer families and unselected ovarian cancer cases of French Canadian descent', *BMC Medical Genetics*. *BMC Medical Genetics*, 14(1), p. 1. doi: 10.1186/1471-2350-14-5.
- Tsuzuki, T. *et al.* (1996) 'Targeted disruption of the Rad51 gene leads to lethality in embryonic mice', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(13), pp. 6236–6240. doi: 10.1073/pnas.93.13.6236.
- Vaidya, J. S. *et al.* (2010) 'Targeted intraoperative radiotherapy versus whole breast radiotherapy for breast cancer (TARGIT-A trial): An international, prospective, randomised, non-inferiority phase 3 trial', *The Lancet*, 376(9735), pp. 91–102. doi: 10.1016/S0140-6736(10)60837-9.
- Veronesi, U. *et al.* (2002) 'Twenty-year follow-up of a randomized study comparing breast-conserving surgery with radical mastectomy for early breast cancer', *New England Journal of Medicine*, 347(16), pp. 1227–1232. doi: 10.1056/NEJMoa020989.
- Veronesi, U. and Zurrada, S. (1996) 'Breast cancer surgery: A century after Halsted', *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 122(2), pp. 74–77. doi: 10.1007/BF01226264.
- Walsh, C. S. (2015) 'Two decades beyond BRCA1/2: Homologous recombination, hereditary cancer risk and a target for ovarian cancer therapy?', *Gynecologic Oncology*. Elsevier B.V., 137(2), pp. 343–350. doi: 10.1016/j.ygyno.2015.02.017.
- Walsh, T. and King, M. C. (2007) 'Ten Genes for Inherited Breast Cancer', *Cancer Cell*, 11(2), pp. 103–105. doi: 10.1016/j.ccr.2007.01.010.
- Wang, B. *et al.* (2007) 'Abraxas and RAP80 form a BRCA1 protein complex required for the DNA damage response', *Science*, 316(5828), pp. 1194–1198. doi: 10.1126/science.1139476.
- Wang, B. (2012) 'BRCA1 tumor suppressor network: focusing on its tail', *Cell & Bioscience*, 2(1), p. 6. doi: 10.1186/PREACCEPT-1109880912645841.
- Wang, Hongyan *et al.* (2004) 'ATR affecting cell radiosensitivity is dependent on homologous recombination repair but independent of nonhomologous end joining', *Cancer Research*, 64(19), pp. 7139–7143. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-04-1289.
- Wang, Y. *et al.* (2011) 'A retrospective study of breast cancer subtypes: The risk of relapse and the relations with treatments', *Breast Cancer Research and Treatment*, 130(2), pp. 489–498. doi: 10.1007/s10549-011-1709-6.

WHO Cancer Facts Sheet (2018) *WHO*. Available at: <http://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/900-world-fact-sheets.pdf> (Accessed: 20 April 2020).

Wörmann, B. *et al.* (2018) 'Mammakarzinom der Frau', in *Empfehlungen der Fachgesellschaft zur Diagnostik und Therapie hämatologischer und onkologischer Erkrankungen*. doi: 10.1007/3-540-31303-6_224.

Wu, Q. *et al.* (2016) 'Structure of BRCA1-BRCT / Abraxas Complex Reveals Phosphorylation-Dependent BRCT Dimerization at DNA Damage Sites Article Structure of BRCA1-BRCT / Abraxas Complex Reveals Phosphorylation-Dependent BRCT Dimerization at DNA Damage Sites', *Molecular Cell*. The Authors, pp. 1–15. doi: 10.1016/j.molcel.2015.12.017.

Zentrum Für Krebsregisterdaten - Brustkrebs (2019) *Robert Koch Institut*. Available at: https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/Brustkrebs/brustkrebs_node.html (Accessed: 20 April 2020).

Zhang, F. *et al.* (2009) 'PALB2 Links BRCA1 and BRCA2 in the DNA-Damage Response', *Current Biology*. Elsevier Ltd, 19(6), pp. 524–529. doi: 10.1016/j.cub.2009.02.018.

7 Danksagung

An erster Stelle danken möchte ich meiner Betreuerin, Prof. Dr. Kerstin Borgmann, für das entgegengebrachte Vertrauen, die motivierende Unterstützung und die vielen bereichernden Diskussionen. Die Zeit in ihrer Arbeitsgruppe hat mein Interesse an der wissenschaftlichen Arbeit in der Radioonkologie entscheidend geprägt. Ganz besonderen Dank auch für die Unterstützung des kurzen Fortbildungsaufenthalts an der Universität Stockholms sowie bei der Bewerbung um ein Promotionsstipendium.

Prof. Dr. Kai Rothkamm möchte ich für die Möglichkeit danken, an diesem Projekt in seinem Labor arbeiten zu dürfen.

Besonderer Dank gilt auch Britta Riepen für die Einarbeitung und die vielen guten Gespräche. Ohne sie wäre die Zeit im Labor nicht dieselbe gewesen.

Danken möchte ich Dr. Felix Meyer für seine kompetente und hilfreiche Unterstützung.

Herzlichen Dank an alle anderen Mitarbeitenden, ehemaligen Mitarbeitenden sowie Doktorandinnen und Doktoranden des Labors für Strahlenbiologie und Experimentelle Radioonkologie für ihre freundliche Unterstützung und den regelmäßigen Austausch.

Danken möchte ich auch der Hamburger Krebsgesellschaft für die finanzielle Unterstützung meines Promotionsvorhabens.

Ganz besonders danken möchte ich zum Schluss Anissa für ihr Verständnis und ihre bedingungslose Unterstützung sowie meiner Familie für ihre Geduld und ihren Zuspruch zu jeder Zeit. Diesen wichtigen Schritt hätte ich ohne euch so nicht gehen können.

8 Lebenslauf

Lebenslauf wurde aus datenschutzrechtlichen Gründen entfernt.

9 Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe. Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

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

Unterschrift:

Jonas Willmann