

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Labor für Strahlenbiologie und experimentelle Radioonkologie
Klinik für Strahlentherapie und Radioonkologie

Leitung: Prof. Dr. med. Cordula Petersen

Verstärkte Initiierung der DNA Replikation führt zu erhöhter genomischer Instabilität in jungen und hirnmetastasierten Brustkrebspatientinnen

DISSERTATION

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

vorgelegt von:

Katinka-Aileen Levesque
aus Berlin

Hamburg 2020

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

Mündliche Prüfung im Rahmen des Promotionsverfahrens am 21.05.2021

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. med. Martin Horstmann

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

Weitere Kommissionsmitglieder: Prof. Dr. med. Cordula Petersen; Prof. Dr. med. Christian Kubisch

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung.....	5
2. Summary.....	6
3. Einleitung.....	8
3.1. Brustkrebs.....	8
3.1.1. Allgemeines.....	8
3.1.2. Epidemiologie.....	8
3.1.3. Diagnostik und Stadieneinteilung.....	9
3.1.4. Histologische Klassifikation und prognostische Faktoren.....	10
3.1.4.1 Histologisches Grading.....	10
3.1.4.2 Hormonrezeptorstatus.....	11
3.1.4.3 Her2-Rezeptorstatus.....	11
3.1.4.4 Ki-67.....	11
3.1.4.5 Intrinsische Subtypen.....	12
3.1.5. Therapie.....	12
3.2. Besondere Subgruppe: junge Brustkrebspatientinnen.....	13
3.2.1. Relevanz der Subgruppe.....	13
3.2.2. Epidemiologie des EOBC.....	14
3.2.3. Diagnostik bei EOBC.....	14
3.2.4. Prognose bei EOBC.....	16
3.2.5. Risikogene.....	18
3.3. Besondere Subgruppe: Hirnmetastasierte Brustkrebspatientinnen.....	18
3.3.1. Überblick zur Hirnmetastasierung.....	18
3.3.2. Epidemiologie.....	19
3.3.3. Blut-Hirn-Schranke.....	19
3.3.4. Remodeling der Hirnmetastatischen Nische.....	20
3.4. Homologe Rekombination (HR).....	21
3.4.1. Funktion der HR.....	21
3.4.2. Vereinfachter Ablauf der HR.....	21
3.5. Ziel der Arbeit.....	22
4. Material und Methoden.....	24
4.1. Material.....	24
4.1.1. Verwendete Zellen.....	24
4.1.2. Antikörper.....	24
4.1.3. Zellmedien und Reagenzien.....	25
4.1.4. Puffer und Lösungen.....	25
4.1.5. Verbrauchsmaterialien.....	25
4.1.6. Geräte.....	26
4.1.7. Software.....	27
4.2. Methoden.....	27
4.2.1. Lymphozytenisolierung.....	27

4.2.2. DNA-Isolierung.....	28
4.2.3. DNA-Fiber Assay.....	29
4.2.3.1 Markierung unbehandelter Lymphozyten mit CldU und IdU.....	29
4.2.3.2 Spreizen der markierten DNA auf Objektträgern.....	30
4.2.3.3 Immunfärbung der Chromatinfasern.....	31
4.2.3.4 Aufnahmen im Fluoreszenzmikroskop.....	31
4.2.3.5 Auswertung mit ImageJ.....	32
4.2.3.6 Statistik.....	33
5. Ergebnisse:.....	34
5.1.1. Replikationsgeschwindigkeit in BM, jungen und älteren Brustkrebspatientinnen.....	34
5.1.2. I/C Rate in BM, jungen und älteren Brustkrebspatientinnen.....	36
5.1.3. Replikationsursprünge in BM, jungen und älteren Brustkrebspatientinnen.....	38
5.1.4. Replikationsursprünge 1. Ordnung in BM, jungen und älteren und Brustkrebspatientinnen.....	39
5.1.5. Replikationsursprünge 2. Ordnung in BM, jungen und älteren Brustkrebspatientinnen.....	41
6. Diskussion.....	42
6.1. Diskussion der Ergebnisse.....	42
6.1.1. Patientinnen mit Hirnmetastasierung zeigen erhöhten DNA Replikationsstress.....	42
6.1.2. Unterschiedlich hohe Elongationsraten der Nukleotidanaloga CldU und IdU bei gleicher Markierungszeit.....	43
6.1.3. Erniedrigte I/C Ratio mit weiterer Abnahme im zeitlichen Verlauf als Indikator einer herabgesetzten Replikationsprogression in der BM-Gruppe.....	44
6.1.4. Zunahme der Replikationsursprünge als Marker für Replikationsstress.....	45
6.1.5. Zunahme der Replikationsursprünge 1. Ordnung als Marker für Replikationsstress.....	46
6.1.6. Keine Zunahme der Replikationsursprünge 2. Ordnung.....	47
6.2. Diskussion der methodischen Herangehensweise.....	48
6.2.1. Definition der Patientengruppen: Kontrollgruppe.....	48
6.2.2. Definition der Patientengruppen: Systematik innerhalb der Patientengruppen.....	48
6.2.3. Verwendung von primären Lymphozyten statt lymphoblastoider Zellkulturen.....	49
6.2.4. Intraobserver Variabilität und Interobserver Variabilität.....	49
7. Abkürzungsverzeichnis.....	51
8. Literaturverzeichnis.....	53
9. Danksagung.....	58
10. Lebenslauf.....	59
11. Eidesstattliche Versicherung.....	60

1. Zusammenfassung

Brustkrebs ist die häufigste Tumorerkrankung der Frau, welche aufgrund bestehender Therapien relativ gut behandelbar ist. Allerdings gibt es Subgruppen, für die dies nicht zutrifft. Es handelt sich u.a. um junge bzw. Patientinnen, bei denen Hirnmetastasen vorliegen. Eine mögliche Verbindung beider Patientinnengruppen könnte eine erhöhte genomische Instabilität sein, die zu einem frühen Auftreten bzw. zu einer besonders aggressiven Ausprägung der Erkrankung führen könnte. Ursache für eine erhöhte genomische Instabilität können Fehler in der DNA Replikation sein, die zu einer verstärkten und frühzeitigen Akkumulation von Mutationen führen könnten. Ziel dieser Arbeit war es, zu überprüfen, ob DNA Replikationsstress in primären Zellen einen möglichen Indikator für eine erhöhte genomische Instabilität bei jungen und hirnmetastasierten Brustkrebspatientinnen darstellt und ob sich dieser über eine verstärkte Initiierung der DNA Replikation quantifizieren lässt. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurden drei Patientinnenkollektive ausgewählt:

100 junge Brustkrebspatientinnen im Alter unter 45 Jahren (Early Onset Breast Cancer = EOBC), 22 Brustkrebspatientinnen mit zerebral metastasiertem Brustkrebs (Brain Metastases = BM) und 100 über 60 jährige Brustkrebspatientinnen. Methodisch wurde mittels DNA Fiber Assay die DNA Replikation räumlich und zeitlich visualisiert und quantitative Informationen über den DNA-Replikationsfortschritt gewonnen. Verwendet wurden zur Teilung angeregte primäre Lymphozyten aus frischen, peripheren Blutproben.

Besonders in der Gruppe hirnmetastasierter Brustkrebspatientinnen kann die Arbeitshypothese bestätigt werden. Mithilfe des hochspezifischen DNA Fiber Assays fiel die Wahl der Methode auf das adäquate Instrument, um eine genomische Instabilität sowohl über die Replikationsprogression (bestimmt über die Elongationsrate in kb/min) und das Verhältnis der Elongation in Kilobasen während der IdU Markierungsphase zur CldU Markierungsphase (I/C Ratio), als auch über die Initiierungen von Replikationsursprüngen und hier in besonderem Maße über die Initiierung von Replikationsursprüngen 1. Ordnung abzubilden.

In der Gruppe junger Brustkrebspatientinnen lässt sich ebenfalls eine genomische Instabilität über signifikant vermehrte Initiierungen von Replikationsursprüngen darstellen. Auch hier zeichnen sich speziell die Initiierungen der Replikationsursprünge 1. Ordnung als wichtigster Parameter zur Erfassung einer genomischen Instabilität aus. Die Parameter Replikationsprogression und I/C Ratio erbrachten in der jungen Patientengruppe hingegen keine Hinweise auf eine genomische Instabilität.

Zusammenfassend zeigte sich, dass besonders die Initiierungen von Replikationsursprüngen 1. Ordnung für beide Gruppen signifikante Parameter darstellen, um die genomische Instabilität mittels DNA Fiber Assay zu quantifizieren. Die Hypothese, dass eine verstärkte Initiierung der DNA Replikation zu einer erhöhten genomischen Instabilität in jungen und hirnmetastasierten Brustkrebspatientinnen führt, wird mit der hier vorgestellten Arbeit bestätigt. Die verstärkte Initiierung von Replikationsursprüngen könnte zukünftig als Parameter dazu beitragen, gezielt junge Frauen mit hohem Brustkrebsrisiko zu identifizieren und Biomarker, die das Risiko der Entwicklung von Hirnmetastasen abschätzen lassen, zu entwickeln.

2. Summary

Breast cancer is the most common tumor disease in women, which is relatively easy to treat due to existing therapies. However, there are subgroups for which this is not true. These are, among others, young patients or patients with brain metastases. A possible connection between the two groups of patients could be an increased genomic instability, which could lead to an early onset or a particularly aggressive development of the disease. Increased genomic instability could be caused by errors in DNA replication, which could lead to an increased and early accumulation of mutations. The aim of this work was to investigate whether DNA replication stress in primary cells is a possible indicator of increased genomic instability in young and brain-metastatic breast cancer patients and whether this can be quantified by increased initiation of DNA replication. To test this hypothesis, three patient collectives were selected: 100 young breast cancer patients under 45 years of age (Early Onset Breast Cancer = EOBC), 22 breast cancer patients with cerebral metastatic breast cancer (Brain Metastases = BM) and 100 breast cancer patients over 60 years of age. The DNA Fiber Assay was used to visualize DNA replication in space and time and to obtain quantitative information on the progress of DNA replication. Primary lymphocytes from fresh, peripheral blood samples were used to stimulate the division of DNA.

Especially in the group of brain metastasized breast cancer patients the working hypothesis can be confirmed. Using the highly specific DNA Fiber Assay, the method was chosen to map genomic instability both via replication progression (determined via the elongation rate in kb/min) and the ratio of elongation in kilobases during the IdU labeling phase to the CldU labeling phase (I/C ratio), as

well as via the initiation of replication origins and here in particular via the initiation of 1st order replication origins.

In the group of young breast cancer patients, genomic instability can also be shown by significantly increased initiation of replication origins. Here, too, the initiation of first-order origins of replication is the most important parameter for detecting genomic instability. However, the parameters replication progression and I/C ratio did not show any evidence of genomic instability in the young patient group.

In summary, it was shown that especially the initiation of 1st order replication origins are significant parameters for both groups to quantify genomic instability by DNA Fiber Assay. The hypothesis that increased initiation of DNA replication leads to increased genomic instability in young and brain metastatic breast cancer patients is confirmed by the work presented here. The increased initiation of replication origins could in the future contribute as a parameter to specifically identify young women with a high risk of breast cancer and to develop biomarkers to assess the risk of developing brain metastases.

3. Einleitung

3.1. Brustkrebs

3.1.1. Allgemeines

Jede achte Frau in Deutschland erkrankt im Laufe ihres Lebens an Brustkrebs¹.

Das Mammographie-Screening Programm, das im Sinne einer Sekundärprävention einen Brustkrebs in früheren Stadien diagnostiziert, wird in Deutschland für Frauen zwischen 50 und 69 Jahren empfohlen. Jedoch sind knapp 15 % der Frauen bei Diagnosestellung jünger als 50 Jahre² und es zeichnet sich ab, dass sich die Krebserkrankung bei jungen Patientinnen von der Erkrankung der älteren Patientinnen hinsichtlich, Ätiologie, Tumorbilogie, und Prognose unterscheidet³. Es bedarf neuer effektiver Strategien risikobasiert zu screenen⁴, um auch die potentiellen jungen Patientinnen in ein intensiviertes Früherkennungsprogramm einschließen zu können.

3.1.2. Epidemiologie

Während jede achte Frau in Deutschland im Laufe ihres Lebens an Brustkrebs erkrankt, sind Männer mit einem Lebenszeitrisiko von lediglich 0,1% deutlich seltener betroffen und werden aus diesem Grund nicht weiter in dieser Arbeit thematisiert. Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei ca. 64 Jahren².

Risikofaktoren sind neben einem westlichen Lebensstil, Übergewicht, dichtem Brustgewebe und familiärer Prädisposition vor allem das Alter, sodass in Hinblick auf unsere Gesellschaft von einer steigenden Inzidenz auszugehen ist⁵. Weltweit ist Brustkrebs die häufigste Krebserkrankung (24,2 %) und auch die häufigste Todesursache (15,0 %) bei Frauen, gefolgt von Lungenkrebs (13,8%) und Darmkrebs (9,5 %) ⁶. Fortschritte in der systemischen Therapie haben zu einer deutlichen Abnahme der Sterblichkeitsrate geführt^{7,8}. Abhängig von Tumorstadium und tumorbiologischen Eigenschaften variiert die Mortalität.

3.1.3. Diagnostik und Stadieneinteilung

Ergibt die klinische Brustuntersuchung einen auffälligen Befund, wird die Diagnostik durch geeignete bildgebende Verfahren wie Mammografie und Sonografie, und ggf. eine histologische Untersuchung komplettiert. Eine Ausbreitungsdiagnostik wird bei neu diagnostiziertem Brustkrebs ab UICC-Stadium II mit vorliegenden Risikofaktoren oder bestehendem Verdacht auf eine Metastasierung durchgeführt. Es besteht aus bildgebenden Verfahren zur Beurteilung von Lunge, Leber, Knochen und somit meist aus einer Computertomografie des Thorax und Abdomens, und einer Skelettszintigrafie⁵.

Je nach Ausbreitung des Brustkrebses spricht man von verschiedenen Stadien. Zur Stadieneinteilung wird die TNM-Klassifikation (englisch: tumor, node, metastasis) herangezogen.

Die Größe und lokale Ausdehnung des Primärtumors wird mit „T“, das Fehlen oder Vorhandensein von örtlich oder benachbarten (regionären) Lymphknotenmetastasen wird mit „N“ beschrieben. „M“ gibt Auskunft über das Fehlen oder Vorhandensein von Fernmetastasen.

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 inflammatorisches Mammakarzinom)	N0 – 2	M0	IIIB
jedes T	N3 (≥10 befallene Lymphknoten in der Axilla und/oder Befall infra- oder supraclavikulärer Lymphknoten)	M0	IIIC
jedes T	jedes N	M1 (außerhalb von Brust und benachbarten Lymphknotenregionen)	IV

Tabelle 1: Anatomische Stadieneinteilung für Brustkrebs nach UICC. UICC: Union internationale contre le cancer; Tis: Tumor in situ, noch nicht ins umliegende Gewebe eingedrungen; T1mic: Tumor mit Mikroinvasion von 0,1cm oder weniger⁹.

3.1.4. Histologische Klassifikation und prognostische Faktoren

3.1.4.1 Histologisches Grading

Das Grading von malignen Brusttumoren trifft eine Aussage zum Malignitätsgrad des Tumors und erfolgt nach Elston und Ellis¹⁰. Die histo-und zytologischen Kriterien, die semiquantitativ beurteilt werden, sind Tubulusbildung, Kernpleomorphie und Mitoserate⁵. Sie bilden einen Score, der folgende Unterteilung ermöglicht: G1 (gut differenziert), G2 (mäßig differenziert), G3 (schlecht differenziert). Mit Hilfe des Gradings lässt sich in Zusammenschau mit der Tumorgöße und dem Lymphknotenstatus der Nottingham-Prognose-Index bestimmen, der als prognostisch sehr aussagekräftig gilt¹¹.

Merkmal	Kriterium	Scorewert
Grading (Elston, CW et al. 1991)	G1	1
	G2	2
	G3	3
Lymphknotenstatus	pN0	1
	1-3 LK positiv	2
	≥ 4 LK positiv	3
Indexwert = Größe (in cm) x 0,2 + Scorewert Grading + Scorewert LK-Status		
Indexwert	Prognose	15-Jahres-Überlebensrate
≤ 3,4	Gut	80 %
3,41-5,40	intermediär	42 %
> 5,40	schlecht	13 %

Tabelle 2: Nottingham-Prognose-Index^{5,11}

3.1.4.2 Hormonrezeptorstatus

Immunhistochemisch können Hormonrezeptoren für Östrogen (ER) und Progesteron (PgR) auf Brustkrebstumoren nachgewiesen werden. Der Hormonrezeptorstatus gilt als positiv, wenn mindestens 1% positive Tumorzellkerne vorliegen. Bei Positivität ist eine medikamentöse Hormontherapie, wie z.B. mit Tamoxifen als selektiven Östrogenrezeptormodulator möglich⁵.

3.1.4.3 Her2-Rezeptorstatus

Eine Überexpression des Onkogens Her2 (*human epidermal growth factor receptor-2*) korreliert mit einer schlechteren Prognose in unbehandelten Patientinnen. Her2 fungiert allerdings auch als medikamentöses Target des monoklonalen Antikörpers Trastuzumab, unter dessen Behandlung es zu einer deutlichen Verbesserung der Prognose von Patientinnen mit Her2-positiven Tumoren kam¹².

3.1.4.4 Ki-67

Ki-67 ist ein prognostischer Marker, der immunhistochemisch nachgewiesen wird. Er gilt als unabhängiger Marker für das Gesamtüberleben von Brustkrebspatientinnen. Eine Metaanalyse von Pe-

trelli et al. zeigte, dass Patientinnen, deren Tumor eine hohe Ki-67 Positivität zeigte, eine signifikant schlechtere Prognose aufwiesen, als Frauen mit Ki-67-niedrigexprimierenden Tumoren¹³. Der Ki-67-Proliferationsindex liegt bei Patientinnen mit mit genetischer Disposition in der Regel über 30%. Bei einer Ki-67-Positivität $\geq 25\%$ kann von einem erhöhten Risiko ausgegangen werden⁵.

3.1.4.5 Intrinsische Subtypen

Je nach Genexpressionsprofil, lassen sich vier molekulare Subtypen beim Brustkrebs unterscheiden, die in Hinblick auf den zu erwartenden klinischen Verlauf und das Therapieansprechen relevant sind¹⁴:

- Luminal A: ER- und / oder PgR-positiv und HER2-negativ und Ki-67niedrig
- Luminal B:
 - HER2-negativ: ER- und / oder PgR-positiv und HER2-negativ und Ki-67hoch
 - HER2-positiv: ER- und / oder PgR-positiv und HER2-positiv und Ki-67hoch oder niedrig
- HER2-positiv: ER- und PgR-negativ und HER2-positiv
- Triple negativ: ER-, PgR- und HER2-negativ.

Patientinnen mit Triple negative Tumoren zeigen das schlechteste Überleben. Sie kommen gehäuft bei jungen Brustkrebspatientinnen vor, und neigen am meisten zur Hirnmetastasierung^{3,15}.

3.1.5. Therapie

Die Therapie des Mammakarzinoms ist stadienabhängig und erfolgt in Deutschland nach erfolgter Vorstellung in einer interdisziplinären Tumorkonferenz. Handelt es sich um eine nicht fortgeschrittene Erkrankung wird die operative Therapie mit Entfernung des Tumors in sano (R0) meist brusterhaltend angestrebt. Nach brusterhaltender operativer Therapie muss die Bestrahlung des betroffenen Gebiets erfolgen. Je nach Tumorausdehnung, vorhandenem Brustgewebe und Wunsch der Patientin kann die operative Therapie auch im Sinne einer Mastektomie durchgeführt werden, ggf. mit primärer oder sekundärer Rekonstruktion. Bei palpatorisch und sonografisch unauffälligem Lymphknotenstatus wird empfohlen, eine Sentinellymphonedektomie (SNLE) durchzuführen. Klinisch auffällige Lymphknoten werden intraoperativ mitentfernt. Bei höheren Tumorstadien ohne geplante adjuvante Radiotherapie wird zur Axillendisektion geraten⁵. Wenn nicht zuvor schon in Form einer

neoadjuvanten Chemotherapie therapiert wurde, folgt bei positivem Nodalstatus, G3-Tumoren, HER2 positiven, Östrogen- und Progesteron negativen Tumoren, sowie bei jungen Patientinnen unter 35 Jahren eine adjuvante Chemotherapie. Üblicherweise verwendete Substanzen sind hier Anthracycline gefolgt von einem Taxan⁵.

Ist das Brustkrebsgewebe Östrogen- und oder Progesteronrezeptor positiv, sollte nach Abschluss der Chemotherapie eine endokrine Therapie mittels Tamoxifen und (bei prämenopausalen Patientinnen mit Risikoprofil unter Ovarialsuppression) Aromatasehemmer durchgeführt werden. Diese reduzieren signifikant die Rezidivwahrscheinlichkeit um ca. 40%⁵.

Ein neuerer Therapiepfad bildet die Antikörpertherapie, die bei HER2 positiven Tumoren über ein Jahr mittels Trastuzumab erfolgen soll.

Für Brustkrebserkrankungen im fortgeschrittenem Stadium drängen zahlreiche Immunmodulatoren, sogenannte Checkpointinhibitoren in Form von Antikörpern auf den Markt. Zu nennen ist hier insbesondere Atezolizumab, ein monoklonaler Antikörper, der auf das Membranprotein PD-L1 (Programmed cell death 1 ligand1) abzielt. Dieses bindet an den Rezeptor PD-1, der unter anderem von einigen Brustkrebstumoren ausgebildet wird. Die Bindung führt vereinfacht beschrieben zur Inaktivierung von Effektor-T-Zellen und somit zur Hemmung der Immunantwort, sodass das Tumorstadium erleichtert wird. Atezolizumab wirkt diesem Hemmsignal über eine Blockade von PD-L1 entgegen. Der Tumor wird für das Immunsystem wieder angreifbar¹⁶.

3.2. Besondere Subgruppe: junge Brustkrebspatientinnen

3.2.1. Relevanz der Subgruppe

Eine besondere Subgruppe bilden junge Brustkrebspatientinnen (Early onset of Breast Cancer = EOBC). Je nach betrachteter Studie, werden junge Brustkrebspatientinnen dieser Gruppe über die Erstmanifestation eines Brustkrebses bis zu einer bestimmten Altersgrenze definiert. Je nach Studie wird diese zwischen 35 und 45 Jahren festgelegt. In den USA machen junge Brustkrebspatientinnen < 40 Jahren einen Anteil von 5,6 % aller Brustkrebspatientinnen aus³. Eine besondere Herausforderung stellt diese Gruppe unter sozialmedizinischer Betrachtungsweise dar; denn in der Gesellschaft tragen diese Frauen eine völlig andere Rolle in der Familie und im Arbeitsleben als ältere Brust-

krebspatientinnen. Es handelt sich aber auch deswegen um eine besondere Subgruppe, weil sie bisher keinem Screeningprogramm der Früherkennung zugeführt wird. Junge Frauen mit Brustkrebsmanifestation zeigen häufiger als ältere Frauen fortgeschrittene Erkrankungsstadien bei Diagnosestellung³. Darüber hinaus zeigen sie andere Risikofaktoren, histologische Profile mit aggressiveren Tumoren und ein signifikant schlechteres Überleben, sodass es von besonderem Interesse ist, Tumorgenese und -biologie dieser Subgruppe weiter zu untersuchen.

3.2.2. Epidemiologie des EOBC

In der dritten und vierten Lebensdekade steigt das Risiko bei EOBC Patientinnen rasant an. Von allen Krebsarten bei Frauen macht der Brustkrebs 2 % im Alter von 20 Jahren und bereits 40 % im Alter von 40 Jahren aus¹⁷. Die Inzidenz ist in Industrie- und weniger entwickelten Ländern gleich¹⁸ und unter europäischen Frauen von 1980 bis 2008 leicht zunehmend mit ca. 1,2 % pro Jahr¹⁹. Die Risikofaktoren für ein EOBC unterscheiden sich teilweise von denen einer sporadischen Brustkrebserkrankung und sind häufig nicht beeinflussbar. So zum Beispiel ein schlanker Ernährungszustand¹⁸, anovulatorische Infertilität²⁰, eine hohe mammografische Dichte der Brust, oder die ethnische Zugehörigkeit. Junge Afroamerikanerinnen unter 35 J. haben eine höhere Brustkrebsinzidenz und eine dreifach erhöhte Mortalität im Vergleich zu jungen weißen Frauen^{3,21}. Zu den Risikofaktoren gehören weiter die Einnahme oraler Kontrazeptiva, wobei sich das Risiko 10 Jahre nach Absetzen der oralen Kontrazeptiva wieder normalisiert¹⁸. Bei älteren Patientinnen wirken Geburten protektiv für die Entwicklung einer Brustkrebserkrankung. Bei jüngeren scheint im Gegenteil das Risiko nach einer Geburt transient erhöht zu sein. Dabei steigt die Inzidenz bei Erstgebärenden, die älter als 30 Jahre alt sind²². Ein weiterer, nicht modifizierbarer Risikofaktor ist die genetische Prädisposition, auf die weiter unten genauer eingegangen wird.

3.2.3. Diagnostik bei EOBC

Frauen mit genetischem Risiko erkranken häufig früher an Brustkrebs und werden durch das gängige Früherkennungssystem nicht erfasst. In Deutschland wurde ein Brustkrebscreening zur Sekundärprävention implementiert, das Frauen zwischen dem 50. und 69. Lebensjahr die Durchführung

einer jährlichen Mammographie empfiehlt. Nach der deutschen S3-Leitlinie für Früherkennung, Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms ist die Mammografie die wirksamste Methode, um die Mortalität bei Brustkrebs zu reduzieren. Dieser Effekt wurde auch bei Frauen zwischen dem 40. und 49. Lebensjahr in geringerem Ausmaß gesehen, jedoch ist hier die Wahrscheinlichkeit für falsch positive und falsch negative Befunde größer, sodass ein regelmäßiges Screening in den Leitlinien nur nach Risikoabwägung empfohlen wird. Eine Risikostratifizierung kann nach folgenden Kriterien durchgeführt werden:

3.30.	Evidenzbasierte Empfehlung
Empfehlungsgrad B	<p>Eine genetische Untersuchung sollte angeboten werden, wenn eine familiäre bzw. individuelle Belastung vorliegt, die mit einer mindestens 10 %-igen Mutationsnachweiswahrscheinlichkeit einhergeht.</p> <p>Dies trifft zu, wenn in einer Linie der Familie</p> <ul style="list-style-type: none"> • mindestens 3 Frauen an Brustkrebs erkrankt sind • mindestens 2 Frauen an Brustkrebs erkrankt sind, davon 1 vor dem 51. Lebensjahr • mindestens 1 Frau an Brustkrebs und 1 Frau an Eierstockkrebs erkrankt sind • mindestens 2 Frauen an Eierstockkrebs erkrankt sind • mindestens 1 Frau an Brust- und Eierstockkrebs erkrankt ist • mindestens 1 Frau mit 35 Jahren oder jünger an Brustkrebs erkrankt ist • mindestens 1 Frau mit 50 Jahren oder jünger an bilateralem Brustkrebs erkrankt ist • mindestens 1 Mann an Brustkrebs und eine Frau an Brust- oder Eierstockkrebs erkrankt sind <p>Es ist eine angemessene Bedenkzeit vor Durchführung der Diagnostik zu beachten.</p>

Tabelle 3: Abschätzung des Erkrankungsrisikos für hereditären Brustkrebs⁵

Wird einer der obigen Punkte bejaht, wird die Durchführung einer genetischen Testung empfohlen. Ein mögliches Genpanel berücksichtigt die bekannten Risikogene für den erblichen Brustkrebs, Eierstockkrebs und den Gebärmutter-schleimhautkrebs (ATM, BRCA1, BRCA2, BARD1, BLM, BRIP1, CDH1, CHEK2, PALB2, PMS2, FAM175A, FANCC/-M, RAD51B/-C/-D, TP53, PTEN, STK11, NF1 und CDH1)²³. Liegt ein genetisches Risiko bei einer Frau vor, wird der Einschluss in ein intensiviertes Früherkennungsprogramm empfohlen. Hier erfolgen neben regelmäßiger Tast- und Brustultraschalluntersuchungen auch die jährliche Untersuchung mittels Magnetresonanztomografie⁵.

3.2.4. Prognose bei EOBC

Aufgrund des fehlenden systematischen Screenings jüngerer Frauen ist es nicht verwunderlich, dass EOBC-Patientinnen häufiger als ältere Patientinnen ein fortgeschrittenes Tumorstadium zum Diagnosezeitpunkt haben. Zwei von drei 25-29 jährige haben ein UICC Stadium II-III. Bei Frauen über 40 Jahren sind es nur geringfügig mehr als eine von drei²⁴. Junge Brustkrebspatientinnen haben häufiger aggressivere, Triple negative Tumoren, häufiger HER2 positive Tumoren und insgesamt ein bis zu 9-fach erhöhtes Rezidivrisiko²⁵⁻²⁷. In einer prospektiven Studie von Anders et al. mit 200 EOBC- und 200 älteren Brustkrebspatientinnen konnte gezeigt werden, dass die junge Gruppe gegenüber der älteren ein deutlich kürzeres rezidivfreies Überleben hatte. Das niedrigste rezidivfreie Überleben zeigte die jüngste Patientengruppe²⁷.

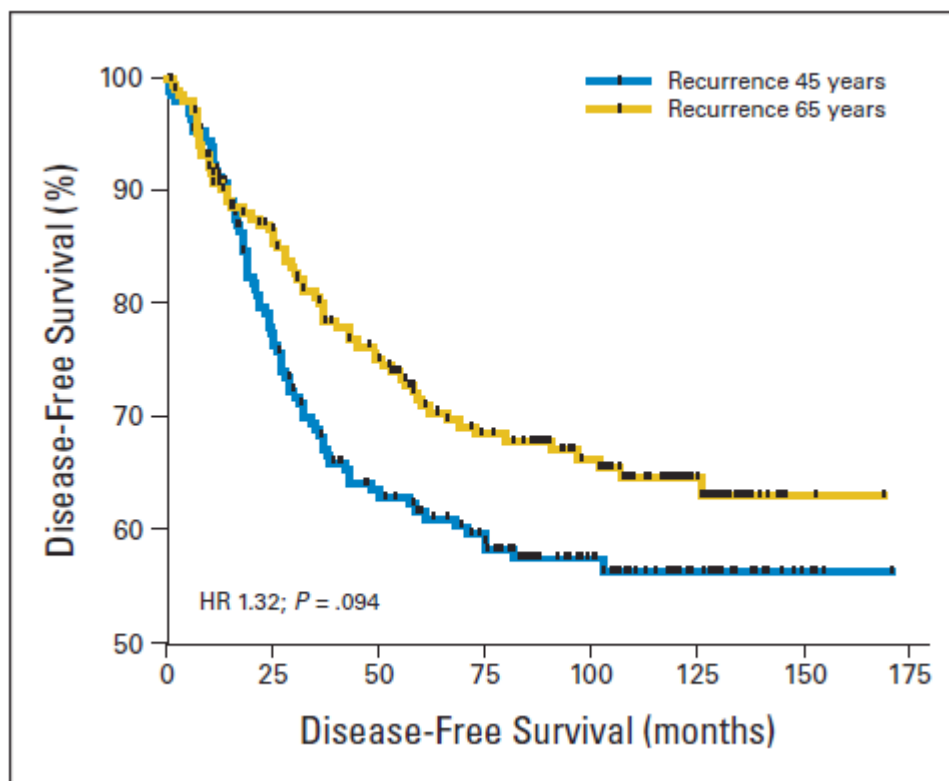


Abbildung 1: Rezidivfreies Überleben nach Alter. Kaplan-Meier-Kurve zum rezidivfreien Überleben (Disease-Free Survival) in Monaten, aufgeschlüsselt nach Altersgruppen (≤ 45 J. versus ≥ 65 J.) bei Frauen mit Brustkrebs²⁷

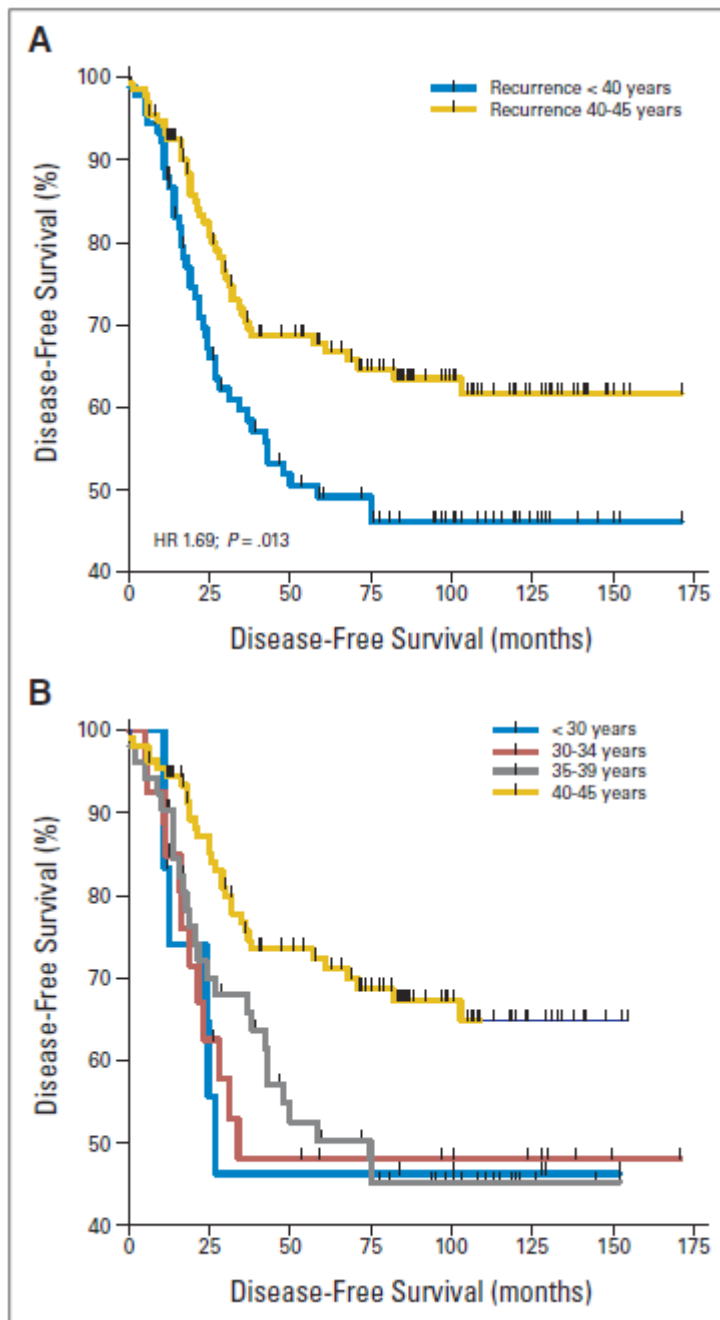


Abbildung 2: Rezidivfreies Überleben (Disease-Free Survival) nach Alter: (A) Kaplan-Meier-Kurve zum rezidivfreien Überleben in Monaten, aufgeschlüsselt nach Altersgruppen (< 40J. versus 40 - 45J.) bei Frauen mit Brustkrebs. (B) Kaplan-Meier-Kurve zum rezidivfreien Überleben in Monaten, aufgeschlüsselt nach Altersgruppen unter 40 Jahren in 5 Jahres Intervallen versus der Altersgruppe 40 - 45J. bei Frauen mit Brustkrebs²⁵

Bekannt ist auch ein erhöhtes Risiko für eine kontralaterale Brustkrebsmanifestation¹⁸. Das Outcome junger Brustkrebspatientinnen ist insgesamt schlechter und in vielen Studien ist das Alter der Patientin ein Risikofaktor für eine erhöhte Mortalität²⁵. Nach Daten von Johnson et al. zeigt sich bei EOBC-Patientinnen in den USA das Verhältnis von Alter zu Mortalität sogar umgekehrt proportional, folglich haben die jüngsten Patientinnen die höchsten Mortalitätsraten³.

3.2.5. Risikogene

Etwa 30 % der Brustkrebspatientinnen zeigen eine einschlägige positive Familienanamnese (nach Tabelle 3). Es gibt eine Reihe von Genen, die mit einem erhöhten Risiko Brustkrebs zu entwickeln assoziiert sind. Die bekanntesten Mutationen betreffen die DNA-Reparaturgene BRCA1 und BRCA2. Diese betreffen ca. 25 % der Patientinnen mit einschlägiger positiver Familienanamnese⁵. Sie zeigen eine hohe Penetranz zur Entwicklung von Brust- oder Eierstockkrebs. Das Risiko, bis zum 71. Lebensjahr einen Brustkrebs zu entwickeln, liegt mit einer der beiden Mutationen bei 45-65 %²¹. Neben diesen beiden Genen sind weitere bekannt, die ebenfalls als hoch penetrant eingestuft werden. Mutationen in den Genen TP53, STK11 oder PALB2 führen zu einer Risikoerhöhung um den Faktor 5 – 20. Weitere Genmutationen, die das Risiko für Brustkrebs moderat oder geringfügig erhöhen sind z.B. CHEK2, CDH1, ATM²⁸. Während die Mutationen in den Proteinen BRCA1 und BRCA2 mit einem sehr hohen Brustkrebsrisiko einhergehen, aber nur selten in Brustkrebspatientinnen nachweisbar sind, gibt es andere Gene mit niedrigerem Risiko aber häufigerer Inzidenz²⁹. In vielen Fällen kann trotz einschlägiger positiver Familienanamnese keine Mutation in den bekannten Risikogenen nachgewiesen werden³⁰. Zu dem Risikopotential bei mehreren Mutationen im Niedrigrisikobereich ist die Datenlage noch sehr gering.

3.3. Besondere Subgruppe: Hirnmetastasierte Brustkrebspatientinnen

3.3.1. Überblick zur Hirnmetastasierung

Die globale Prävalenz von Hirnmetastasen liegt bei Krebspatienten bei etwa 8,5 – 9,6 %³¹. Von allen Brustkrebspatientinnen, bei denen eine Metastasierung vorliegt, entwickeln ca. 15-30% auch Hirnmetastasen im Verlauf ihrer Erkrankung³². Besonders diese Metastasierungsform ist mit einer sehr

schlechten Prognose verbunden und „reduziert die Lebensqualität der Betroffenen erheblich durch kognitive Einschränkungen, motorische Dysfunktionen aber auch Krampfgeschehen und Schmerzen“³³. Eckpfeiler der Therapie bestehen aus chirurgischer Therapie, Ganzhirnbestrahlung, stereotaktischer Radiochirurgie und Chemotherapie. All diese Therapieoptionen gelten als lebenszeitverlängernd, sind aber in den seltensten Fällen kurativ³⁴. Die chirurgische Therapie führt zu einem mittleren Überleben von 10-16 Monaten, kann jedoch bei multiplen oder großen Hirnmetastasen nicht durchgeführt werden, ebenso wie bei vorangeschrittener Grunderkrankung. Das Ausmaß der Strahlentherapie ist durch die Schädigung des umliegenden Gewebes und damit verbunden durch ein erhöhtes Maß an kognitiver Beeinträchtigung limitiert^{35,36}. Chemotherapeutika wirken wiederum unzureichend, da die Bluthirnschranke den Übertritt der Medikamente in das Gehirn erschwert³⁷.

3.3.2. Epidemiologie

Als Risikofaktoren für die Entwicklung von Hirnmetastasen zählen beim Mammakarzinom das junge Manifestationsalter, ein fortgeschrittenes Tumorstadium, sowie vier oder mehr positive Lymphknoten oder eine bereits vorliegende Fernmetastasierung an zwei Orten, sowie histologische Tumoreigenschaften wie High-Grade Tumoren oder HER-2 positive und Triple negative Tumoren¹⁵. Letztere haben die mit Abstand schlechteste Prognose mit einem mittleren Überleben (medianen overall survival (OS)) von 4,9 Monaten. Aber auch insgesamt zeigen Patientinnen mit Tumoren mit positivem Hormonrezeptorstatus selten ein längeres OS als 1 Jahr³². Damit stellt die Hirnmetastasierung oft den limitierenden Faktor im Überleben der an einem Brustkrebs Erkrankten dar. Umso wichtiger ist es, den Pathomechanismus besser zu verstehen, um hier gezielte Therapieansätze zu entwickeln. Epidemiologisch zeigt die Hirnmetastasierung ähnliche Risikofaktoren wie die EOBC Patientinnen. Es besteht folglich ein Interesse daran, zu untersuchen, welche Gemeinsamkeiten im Pathomechanismus bestehen könnten. Bevor wir uns aber dieser Frage zuwenden können, ist es unverzichtbar, zunächst die Besonderheit der Hirnmetastasierung an sich herauszustellen.

3.3.3. Blut-Hirn-Schranke

Interessanterweise metastasiert nicht jeder maligne Tumor zufällig in alle verschiedenen Gewebe, obwohl das über die Blutzirkulation denkbar wäre. Viel mehr existieren tumorspezifische Metastasierungsmuster. Nur wenige Tumoren metastasieren regelhaft in das Gehirn, am häufigsten sind

hier Lungenkrebs, Brustkrebs und das maligne Melanom zu nennen³⁸. Die steigende Tendenz von Brustkrebs zerebral zu metastasieren, ist zum einen auf die verbesserte Diagnostik, insbesondere mittels Magnetresonanztomografie zurückzuführen, aber auch darauf, dass die neueren Therapieansätze eine zunehmende Kontrolle der systemischen Erkrankung bedingen. Unter Zunahme des OS, kommt es schließlich meist nach bereits stattgehabter Metastasierung in andere Organe wie Lunge oder Leber zur Manifestation von Hirnmetastasen^{32,39}. Das Gehirn ist weniger anfällig für Fernmetastasierung aufgrund der Blut-Hirn-Schranke. Definiert ist sie als Diffusionsbarriere, die sich aus Endothelzellen der Hirnkapillaren, Perizyten in Kontakt mit der vaskulären Basalmembran und den astrozytären Endfüßen zusammensetzt³⁸. Sie reguliert den Stoffaustausch zwischen dem Blut und dem Gehirn, indem potentiell schädliche Stoffe am Durchtritt durch die Kapillarwand gehindert werden, wichtige hydrophile Stoffe, auf deren Zufuhr das ZNS angewiesen ist, werden jedoch mithilfe spezifischer Transportmechanismen durch die Schranke geschleust⁴⁰. Anatomisch zeichnet sie sich dadurch aus, dass in den Endothelzellen der Kapillargefäße keine Fenestrierungen, sondern sogenannte „tight junctions“, umgeben und gestützt von „adherens junctions“, vorhanden sind. Sie regulieren die parazelluläre Endothelpermeabilität⁴¹. So hindert die Blut-Hirn-Schranke vermutlich zirkulierende Tumorzellen an der Einschleusung in das ZNS, genauso wie primäre ZNS-Tumoren nur selten in die Peripherie metastasieren⁴². Im Zuge der Hirnmetastasierung können die endothelialen junctions in ihrer Funktion gestört werden und das Übertreten von Tumorzellen vor allem parazellulär über die endothelialen junctions ermöglichen³⁸.

3.3.4. Remodeling der Hirnmetastatischen Nische

Es scheint ein molekulares Zwiegespräch zwischen Tumor und Metastasierungsort zu geben, das ermöglicht, dass Brustkrebszellen das Hirngewebe erreichen. Die These, dass analog eines speziellen Samens, der nur auf einem entsprechenden Boden wächst („Seed and Soil theory“) die Metastasierungsprozesse ablaufen, wurde bereits um 1889 von Steven Paget begründet⁴³. Es bleibt Untersuchungsgegenstand der aktuellen Forschung, wie genau die Krebszellen die Hirnzellen auf ihre Invasion vorbereiten und mithilfe welcher Faktoren sie in dem fremden Gewebe wachsen und überleben können¹⁵. Bemerkenswerterweise haben die verschiedenen molekularen Subtypen von Brustkrebs unterschiedliche Tendenzen, zerebral zu metastasieren⁴⁴. HER-2 positive und Triple negative Tumore haben ein deutlich erhöhtes Metastasierungsrisiko und zeigen entsprechend das schlechteste hirn-

metastasenfreie Überleben⁴⁵. Es liegt die These nahe, dass Krebszellen spezifische molekulare Programme in sich tragen, die ihnen Vorteile verschaffen, in fremdem Gewebe zu überleben. Nach Carvalho et al. ist davon auszugehen, dass sogenannte Sekretome der Tumoren die Zielmetastasierungsorte so modifizieren, dass die Aussaat von Tumorzellen in dem Gewebe erfolgreich verlaufen kann. Die Tumoren bereiten ihre metastatische Nische über parakrine Kommunikation bereits lange vor ihrer Filialisierung vor. Hauptsächlich geschieht das, indem sie lösliche Faktoren und extrazelluläre Vesikel sezernieren. Diese wiederum wirken so vorbereitend auf die dort vorherrschenden Zellen, dass eine Ansiedlung der fremden Tumorzellen ermöglicht wird^{15,46}. Eine wegweisende Arbeit ist auch die von Woditschka et al.. Er untersuchte in 23 resezierten Hirnmetastasen und den entsprechenden primären Mammatumoren jeweils 502 krebsspezifische Gene mittels cDNA-mediated annealing, selection extension, and ligation (DASL). Die Ergebnisse zeigten, dass bei der Hirnmetastasierung von Mammakarzinomen ein wesentliches Gewicht auf DNA Reparaturgenen liegt. So waren von 42 getesteten DNA Reparaturgenen 23 signifikant häufiger exprimiert⁴⁷.

3.4. Homologe Rekombination (HR)

3.4.1. Funktion der HR

Auffällig häufig kodieren diese DNA Reparaturgene für Proteine, die an der Reparatur von DNA-Schäden mittels homologer Rekombination beteiligt sind. Dabei handelt es sich um einen DNA-Reparaturmechanismus, der bei Doppelstrangbrüchen Anwendung findet, aber auch an der DNA-Damage Repair und am Replikationsgabelschutz beteiligt ist. Doppelstrangbrüche tragen durch ionisierende Strahlung, genotoxische Agenzien, oder Keimbahnmutationen in den HR-Genen über die Verletzung der genomischen Integrität schließlich zur Tumorgenese bei⁴⁸.

3.4.2. Vereinfachter Ablauf der HR

Liegt ein DNA Doppelstrangbruch vor, werden zunächst die Doppelstrangbruchenden exzidiert, sodass zwei DNA-Einzelstränge mit geeigneten Priming-Regionen vorliegen. RAD51 fungiert als Einzelstrangaustauschprotein und nähert einen Einzelstrang an den entsprechenden Bereich der intakten Schwesterchromatide an. Am 3' Ende wird ein Primer erstellt, der die präzise DNA-Synthese des

fehlenden Abschnitts am Einzelstrang initiiert. Der vervollständigte Einzelstrang löst sich wieder von der Schwesterchromatide und wird an das 5' Ende des ursprünglichen DNA Abschnitts angebunden. Hier kann nun auch der paarige Einzelstrang über Replikation synthetisiert werden und der Doppelstrangbruch ist repariert⁴⁸. Daran beteiligt sind zahlreiche Proteine. Für den Einzelstrangtausch ist RAD51 das wichtigste Effektorprotein, doch es funktioniert erst im Zusammenspiel mit einer Reihe anderer Proteine. Der BRCA1-PALB2-BRCA2 Komplex ist hierfür wesentlich und wird durch Sensorproteine initiiert.⁴⁹ Auffällig ist, dass viele der involvierten Proteine bei Mutation der entsprechenden Gene zu einem erhöhten Brustkrebsrisiko führen.

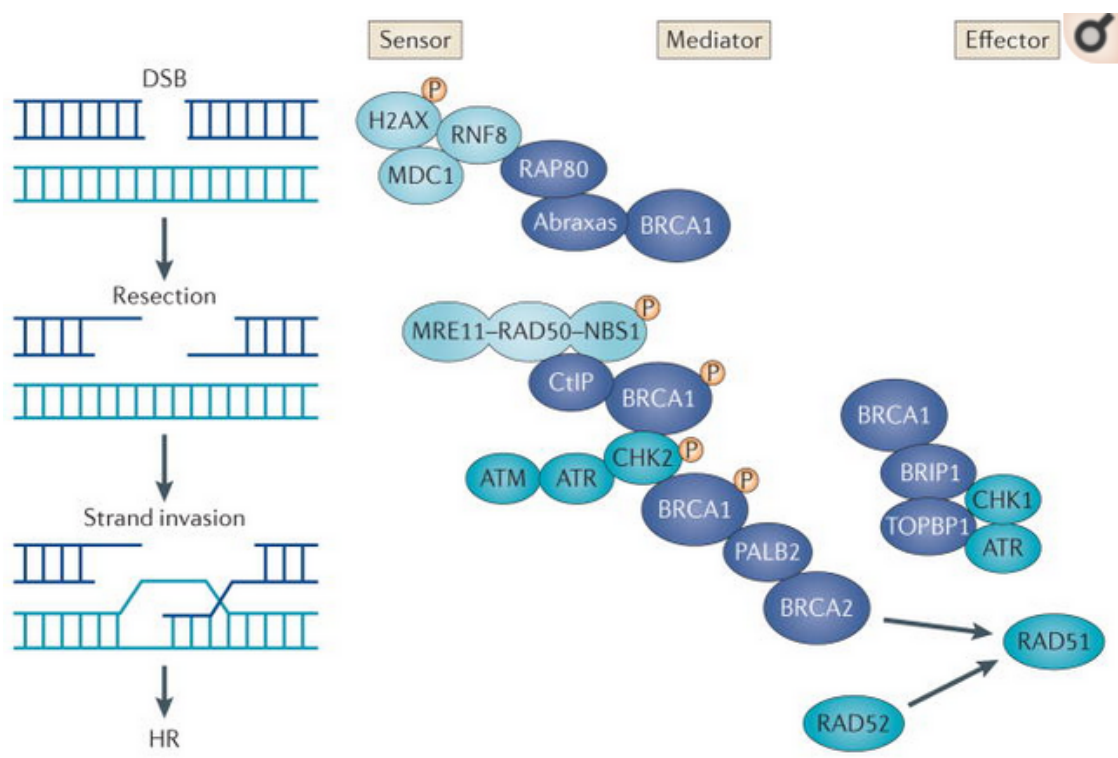


Abbildung 3: Vereinfachte, schematische Darstellung der Reparatur von DSB durch HR und daran beteiligte Proteine. Modifiziert nach Roy et al., 2011⁴⁹.

3.5. Ziel der Arbeit

Sowohl für die Entwicklung eines EOBC als auch von Hirnmetastasen bei Brustkrebs scheint durch eine defekte DNA-Replikation eine erhöhte genomische Instabilität ursächlich zu sein. Ziel der Dis-

sertation ist es, einen möglichen Marker zur Risikoabschätzung 1. zur Entwicklung eines EOBC und 2. zur Entwicklung von Hirnmetastasen zu untersuchen. Da sich für die Entwicklung von einem EOBC und Hirnmetastasen vor allem Gene der Replikations-assoziierten DNA Reparatur als wegweisend zeigten, sollte dies quantitativ über den DNA Fiber Assay abzubilden sein. Daraus ergeben sich die beiden Fragestellungen, ob eine verstärkte Initiierung der DNA Replikation bei Patientinnen mit EOBC, und bei Brustkrebspatientinnen mit Hirnmetastasen zu beobachten ist.

Die Erkenntnisse könnten dazu beitragen, verstärkt junge Frauen mit hohem Risiko zu identifizieren und Marker, die das Risiko der Entwicklung von Hirnmetastasen abschätzen lassen, zu entwickeln.

4. Material und Methoden

4.1. Material

4.1.1. Verwendete Zellen

Verwendet wurden Lymphozyten aus frischen, peripheren Blutproben, die

1. von 100 jungen Patientinnen (<45 Jahren)
2. von 100 älteren Brustkrebspatientinnen (>60 Jahren)
3. von 22 Patientinnen mit zerebraler Metastasierung bei Brustkrebs vor, während und nach der Radiotherapie gewonnen wurden.

Die Blutproben wurden in heparinisierte Monovetten abgenommen und mit einer anonymisierten Probennummer versehen. Die Lymphozyten wurden nach ein bis sieben Tagen isoliert und in die Synthesephase versetzt, Proteine und DNA der Proben isoliert.

4.1.2. 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 4: Primäre 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

Tabelle 5: Sekundäre Antikörper

4.1.3. 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

Tabelle 6: Zellmedien und Reagenzien

4.1.4. 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 IdU 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
Kit zur Lymphozytenisolierung	Peqlab Blood DNA –Mini Kit Plus #12-3484-02

Tabelle 7: Puffer und Lösungen

4.1.5. 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 (Frickhausen, Deutschland) bezogen, 12-Well-Zellkulturplatten von Becton Dickinson (Heidelberg, Deutschland). Deckgläser und Objektträger wurden von Paul Marienfeld (Lauda-Königshofen, Deutschland) bezogen, Plastik Coverslips von Appligene-Oncor (Illkirch-Graben, Frank-

reich) und das Vectorshield Mounting Medium von Vector Laboratories (Burlingame, USA). Die S-Monovetten mit 4,9 ml LH Gel wurden von Sarstedt bezogen (Nümbrecht, Deutschland).

4.1.6. Geräte

Kennzeichnung	Hersteller
Autoklav (Evo [®] 45)	Mediatech, Norderstedt, Deutschland
Brutschrank (BB 16 CU)	Heraeus [®] , Hanau, Deutschland
Zellzahlzähler (Coulter Counter Z1 [™])	BeckmanCoulter [™] , 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

Tabelle 8: Geräte

4.1.7. Software

Software	Hersteller/Entwickler
AxioVision Rel 4.7	Carl Zeiss, Jena, Deutschland
ImageJ	National Institutes of Health, Laboratory for Optical and Computational Instrumentation (University of Wisconsin)
GraphPad PRISM Version 8.4.3	Graphpad Software, Inc, USA
Zotero 5.0	Projekt des Stipendiums für digitale Kooperation (Corporation for Digital Scholarship), George Mason University, Virginia, USA
https://www.deepl.com/translator	DeepL GmbH, Köln, Deutschland

Tabelle 9: Software

4.2. Methoden

4.2.1. Lymphozytenisolierung

Verwendet wurden Lymphozyten aus frischen, peripheren Blutproben, die

1. von 100 jungen Patientinnen (<45 Jahre)
2. von 100 älteren Brustkrebspatientinnen (>60 Jahre)
3. von 22 Patientinnen mit zerebraler Metastasierung bei Brustkrebs vor, während und nach der Radiotherapie gewonnen wurden.

Die Blutproben wurden in heparinisierte Monovetten abgenommen und mit einer anonymisierten Probennummer versehen. Jeder Probe wurden 100 µl Vollblut zur späteren DNA-Isolierung abgenommen. Die Lymphozyten wurden nach Protokoll nach ein bis sieben Tagen isoliert.

Hierfür wurden 6 ml Heparin-Blut in ein Falcon pipettiert und mit NaCl 0,9 % im Verhältnis 1:1 verdünnt. Die erhaltenen 12 ml Suspension wurden mit jeweils 4 ml auf drei Gefäßansätze aufgeteilt, indem diese sehr vorsichtig auf 4 ml luftblasenfreies und auf 20-37 °C vorgeheiztes Ficoll Paque geschichtet werden. Die Ansätze wurden bei Raumtemperatur für 30 min bei 1.500 U/min ohne Bremse zentrifugiert. Es entstand eine optische Dreischichtung von Erythrozyten und Ficoll, die sich als rote Schicht unten am Ansatz ansammelten, einer weißen, schmalen Schicht aus Lymphozyten

bestehend in der Mitte und einer obersten, gelblich klaren Schicht, die aus Serum bestand. Mit einer sterilen Pasteur Pipette wurden nun möglichst vollständig die Lymphozytenschichten der drei Gefäße abpipettiert und in ein einziges Falcon überführt. Hierbei wurde streng darauf geachtet, kein Ficoll Paque mit zu pipettieren. Das Gemisch wurde mittels RPMI-Medium auf 12 ml aufgefüllt und bei Raumtemperatur für 10 min mit 1.100 U/min mit Bremse zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert, das zurückbleibende Pellet wieder in 12 ml RPMI-Medium resuspendiert und bei Raumtemperatur für 10 min mit 1.100 U/min mit Bremse zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut abpipettiert, das zurückbleibende Pellet wieder in 12 ml RPMI-Medium resuspendiert und bei Raumtemperatur für 10 min mit 1.100 U/min mit Bremse zentrifugiert. Zuletzt wurde der Überstand abpipettiert und das Pellet in 6 ml RPMI Medium resuspendiert. Die Lymphozytensuspension wurde in eine T25-Flasche überführt. Die Zugabe von 125 µl Phytohämagglutinin (PhA) induzierte die Mitose in den Lymphozyten während sie im 5% CO₂ Brutschrank inkubiert gelagert wurden.

4.2.2. DNA-Isolierung

Zur Isolierung der DNA aus humanem Blut wurden zunächst 25 µl Proteinkinase K von -20°C aufgetaut und der Elution-Buffer im Wasserbad auf 60 °C erhitzt. Nun wurden 100 µl Vollblut in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß überführt und 100 µl PBS, sowie 25 µl der Proteinkinase K und 200 µl DNA Lyse Buffer BL aus dem Kit hinzugegeben. Anschließend wurde die Suspension für 10 Sekunden auf dem Vortexer durchmischt und für 10 min bei 60 °C im Wasserbad inkubiert. Es wurden 350 µl Binding Solution BL aus dem Kit dazugegeben und mit der Pipette vermischt. Der gesamte Ansatz wurde auf eine Säule eines Eppendorfgefäßes geladen und bei Raumtemperatur für 1 min bei 11.000 U/min zentrifugiert. Im Anschluss daran wurde der Ansatz einmal gewaschen. Das heißt, die Flüssigkeit aus dem collection tube entsorgt und 400 µl DNA Wash Buffer 1 aus dem Kit auf die Säulen geladen und erneut bei Zimmertemperatur für 1 min bei 11.000 U/min zentrifugiert. Der Ansatz wurde nach obigem Prinzip mit 600 µl DNA Wash Buffer 2 aus dem Kit gewaschen und erneut bei Raumtemperatur für 1 min bei 11.000 U/min zentrifugiert. Der letzte Waschschrift wurde nochmals wiederholt, bevor das collection tube entleert und die Säule bei Raumtemperatur für 3min bei 11.000 U/min trocken zentrifugiert wurde. Schließlich wird die Säule auf ein neues Eppendorfgefäß gesetzt und mit 200 µl auf 60 °C vorgewärmten Elution Buffer aus dem Kit aufgeladen, für 2min inkubiert und dann bei Zimmertemperatur für 1 min bei 6000 U/min zentrifugiert. Die entstandene Suspension mit der isolierten DNA wird mit der Probennummer beschriftet und schließlich bei -20 °C aufbewahrt.

4.2.3. DNA-Fiber Assay

Mithilfe des DNA Fiber Assays lässt sich der räumliche und zeitliche Verlauf einzelner DNA-Replikationsgabeln visualisieren und verfolgen. Er liefert Informationen über den DNA-Replikationsfortschritt und seine Regulation unter normalen Bedingungen, sowie über den Replikationsstress, der durch genotoxische Umwelteinflüsse wie Bestrahlung oder Chemotherapeutika induziert wird⁵⁰. Hierzu werden replizierende Zellen zunächst 25 min mit einem Überangebot vom antigenmarkierten, halogenierten Thymidinanalogon 5-Chlor-2'-Deoxyuridin (CldU) zusammengebracht, sodass diese anstelle der Base Thymin zur Elongation der DNA verwendet werden. Die replizierenden Zellen werden dann 25 min mit einem Überangebot vom antigenmarkierten, halogenierten Thymidinanalogon 5-Iod-2'-Deoxyuridin (IdU) zusammengebracht, sodass nun diese zur weiteren Elongation verwendet werden. Im Anschluss werden mittels fluoreszierenden Antikörpern die replizierten DNA Stränge visualisiert, dabei erscheinen Abschnitte mit CldU und IdU markierter DNA farblich unterschiedlich. So lässt sich der Replikationsprozess vor allem über die Elongationsgeschwindigkeit und die Origin Firings als Marker für den Replikationsstress direkt visualisieren und quantifizieren. Pro Patient wurden ca. 5 ml Lymphozyten isoliert. Die Proben wurden vor Durchführung des Fiber Assays mit 1 ml Nährmedium aufgefüllt.

4.2.3.1 Markierung unbehandelter Lymphozyten mit CldU und IdU

Die isolierten und zur Teilung angeregten Lymphozyten von maximal 4 verschiedenen Patienten wurden jeweils in das erste Well einer 12-Well-Platte gegeben und für 25 min mit 0,025 mM CldU-haltigem Medium im 5% CO₂ Brutschrank inkubiert. Es folgte die 5 minütige Zentrifugation mit 1200 U/min bei Raumtemperatur nach Überführung der Proben in Mikroreaktionsgefäße. Das CldU-haltige Medium wurde abgesaugt und die zellhaltigen Suspensionen anschließend für 25 min mit 0,25 mM IdU-haltigem Medium jeweils in das zweite Well der 12-Well-Platte gegeben und erneut im 5% CO₂ Brutschrank für 25 min 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 Proben stets auf Eis bearbeitet. Das IdU-haltige Medium wurde abgesaugt und die Zellen mit 1ml zuvor eisgekühltem PBS einmal resuspendiert und bei 4 °C für 5 min mit 1200 U/min zentrifugiert. Der Überstand wird abgenommen und das Zellpellet je nach Größe in 300-600 µl eiskaltem PBS resuspendiert. Die Konzentration der Suspension wurde mittels Coulter Counter zwischen 2×10^5 und 1×10^6 /ml eingestellt.

Es folgte das Aufspreizen der Lymphozyten-DNA auf Objektträgern.



Abbildung 4: Schematische Abbildung des Versuchsaufbaus. Nach 25 min Labeln mit CldU (rot) wird die zu synthetisierende DNA mit IdU (grün) gelabelt.

Patient 1	Lymph. + CldU	Lymph. + IdU	
Patient 2	Lymph. + CldU	Lymph. + IdU	
Patient 3	Lymph. + CldU	Lymph. + IdU	
Patient 4	Lymph. + CldU	Lymph. + IdU	

Tabelle 10: Skizzierung des Versuchsaufbaus in der 12-Well-Platte: Jede Reihe wird durch einen Patienten belegt, in das erste Well werden die Lymphozytensuspension mit CldU markiert, im zweiten mit IdU.

4.2.3.2 Spreizen der markierten DNA auf Objektträgern

Zum Aufspreizen der DNA der Lymphozyten wurden pro Experiment 2 µl der Suspension tropfenförmig und randständig auf einen Objektträger aufgetragen. Nach 5 minütiger Trocknung wurden dem Tropfen 7 µl des Lysepuffers hinzugegeben. Der Puffer wirkte für 2 min ein, um ein Platzen der Zellen und deren Denaturierung zu bewirken. Anschließend wurde der Objektträger in einem Winkel von ca. 15 ° aufgestellt, sodass der Tropfen der Schwerkraft folgend zum anderen Ende des Objektträgers herunterlief. Direkt im Anschluss wurde der Objektträger luftgetrocknet und in einem Gemisch aus Methanol und Essigsäure (3:1) für 10 min fixiert. Die Aufbewahrung erfolgte schließlich bei -20°C bis zur Immunfärbung.

4.2.3.3 Immunfärbung der Chromatinfasern

Die Objektträger wurden nach Spülung für 5 min mit H₂O zur Denaturierung der DNA einmal für 5 min mit 2,5 M HCL äquibriert und danach für weitere 75 min mit 2,5 M HCL inkubiert. Es folgte die Spülung mittels PBS drei mal und die Blockierung mit der Waschlösung für 1 h, um unspezifische Bindungen von Antikörpern zu verhindern. Die CldU-Nukleotide wurden mittels primärem, monoklonalen anti-BrdU aus der Ratte markiert. Die Objektträger wurden mit 115 µl der Antikörper-Lösung benetzt und mit einem Deckglas abgedeckt. Die Objektträger wurden dann für 1 h bei Raumtemperatur in der feuchten Kammer inkubiert. Es folgte das kurze und anschließend dreimalige Waschen für 10 min mit der Waschlösung. Als nächstes wurde die DNA mit dem gebundenen Antikörper mit 4 % Paraformaldehyd für 10 min fixiert. Wieder folgte das kurze und anschließend dreimalige Waschen für 10 min mit der Waschlösung. Um den anti-BrdU-Antikörper zu visualisieren zu können, wurde nun ein sekundärer anti-rat AlexaFluor 555 eingesetzt. In relativer Dunkelheit wurden die Objektträger mit 115 µl der sekundären Antikörper-Lösung benetzt, mit einem Deckglas versehen und für 1,5 h bei Raumtemperatur in einer feuchten, abgedunkelten Kammer inkubiert. Wieder folgte das kurze und anschließend dreimalige Waschen für 10 min mit der Waschlösung.

Die Markierung der IdU-Nukleotide erfolgte im nächsten Schritt mittels primären monoklonalen anti-BrdU Antikörper aus der Maus (Verdünnung 1:1500 in der Waschlösung). Die Objektträger wurden mit 115 µl der primären Antikörper-Lösung benetzt und für 4 h im Kühlraum in einer feuchten Kammer inkubiert. Wieder folgte das kurze und anschließend dreimalige Waschen für 10 min mit der Waschlösung. Um den anti-BrdU-Antikörper aus der Maus visualisieren zu können, wurde ein sekundärer anti-mouse AlexaFluor 488 (Verdünnung 1:500 in Waschlösung) eingesetzt. Die Objektträger wurden mit jeweils 115 µl der sekundären Antikörper-Lösung benetzt, mit einem Deckglas abgedeckt und für 1,5 h bei Raumtemperatur in einer feuchten, abgedunkelten Kammer inkubiert. Wieder folgte das kurze und anschließend dreimalige Waschen für 10 min mit der Waschlösung. Die Objektträger wurden nun mit Vectashield mounting medium bedeckt, mit Glas bedeckt und die Ränder mit Nagellack versiegelt. Die Lagerung erfolgte stets bei -20°C.

4.2.3.4 Aufnahmen im Fluoreszenzmikroskop

Die Aufnahmen zur Analyse erfolgten mittels Fluoreszenzmikroskop unter Verwendung eines 63er Öl-Objektivs. Zur Detektion des sekundären Fluoreszenz-Antikörpers AlexaFluor 555 wurde der Fil-

tersatz 43 verwendet. Der sekundäre Fluoreszenz-Antikörper AlexaFluor 488 wurde mit dem Filtersatz 38 detektiert. Die Aufnahmen erfolgten mittels AxioVision.

4.2.3.5 Auswertung mit ImageJ

Pro Objektträger wurden mindestens 10 Aufnahmen der Chromatinfasern gemacht und im Anschluss mit dem Bildverarbeitungsprogramm ImageJ bearbeitet. Die verschiedenen Replikationsstrukturen (siehe Abbildung 6) wurden mit dem ImageJ Plug-In *Analyze* ausgewertet, die Länge der Chromatinfasern mit dem ImageJ Plug-In *Segmented lines bestimmt*. 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 $1 \mu\text{m} = 2,59 \text{ kb}$ verwendet⁵¹



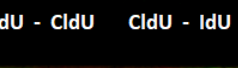
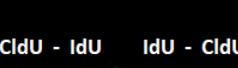
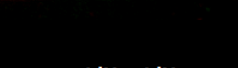
Replikationsstrukturen	Beschreibung	Bezeichnung
<p>1</p> <p>CldU - CldU</p> 	Zwei Replikationsgabeln, die aus bidirektionaler Richtung fusionieren und die Replikation während der CldU Markierungszeit terminieren	Terminierende Replikationsgabeln 1. Ordnung
<p>2</p> <p>CldU - IdU</p> 	Eine Replikationsgabel mit eingebauten CldU und IdU Nucleotiden.	Elongierende Replikationsgabel
<p>3</p> <p>IdU - CldU CldU - IdU</p> 	Zwei elongierende Replikationsgabeln, die von einem Replikationsursprung in bidirektionale Richtung laufen	Replikationsursprung 1. Ordnung
<p>4</p> <p>CldU - IdU IdU - CldU</p> 	Zwei Replikationsgabeln, die nach der CldU und IdU Markierung die Replikation terminieren	Terminierende Replikationsgabeln 2. Ordnung
<p>5</p> <p>IdU - IdU</p> 	Zwei Replikationsgabeln, die während der IdU Markierungszeit die Replikation in bidirektionale Richtung starten	Replikationsursprung 2. Ordnung

Abbildung 5: Übersicht der Replikationsstrukturen⁵⁴

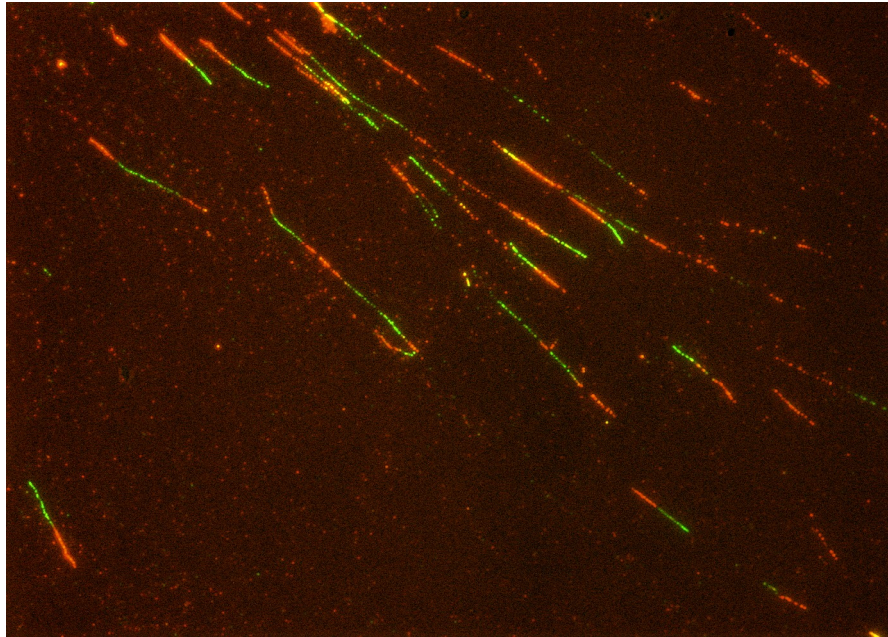


Abbildung 6: Beispiel einer fluoreszenzmikroskopischen Aufnahme unter Verwendung eines 63er Öl-Objektivs. Zu sehen sind markierte und aufgespreizte DNA-Stränge.

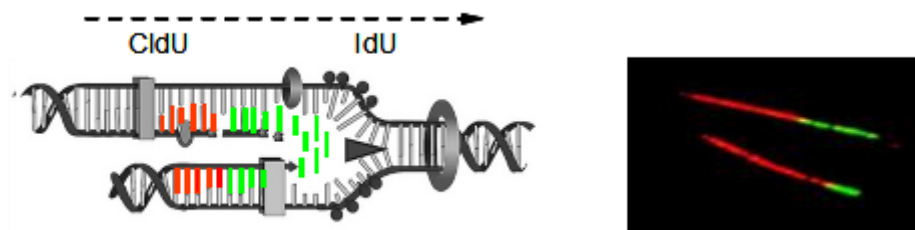


Abbildung 7: Schematische Darstellung der Elongation. Durch Ausmessen der roten und grünen Strecken lässt sich die Elongation im jeweiligen Markierungszeitraum berechnen.

4.2.3.6 Statistik

Die statistischen Auswertungen erfolgten mit dem Programm GraphPad PRISM Version 8.4.3 (Graphpad Software, Inc, USA). Bei den erhobenen Werten handelt es sich jeweils um Mittelwerte mit SEM von drei unabhängigen Experimenten. Jeder Datenpunkt entspricht drei unabhängigen Experimenten. Dargestellt sind Mittelwerte mit SEM. Unterschiede zwischen zwei Gruppen wurden durch einen zweiseitigen Students t-Test mit einem Signifikanzniveau von $\alpha=0,05$ bestimmt.

5. Ergebnisse:

Ziel dieser Arbeit war es, zu überprüfen, ob DNA Replikationsstress in primären Zellen als ein möglicher Indikator für eine erhöhte genomische Instabilität und dadurch für frühzeitiges, bzw. mit einem schwerwiegenden Verlauf behaftetes Krankheitsbild bei Brustkrebspatientinnen dienen könnte. Zu diesem Zweck wurden Blutproben von jungen und älteren Brustkrebspatientinnen, sowie Patientinnen mit vorliegenden Hirnmetastasen gesammelt, anonymisiert, verarbeitet und mittels DNA Fiber Assay (siehe 4.2.3 DNA-Fiber Assay) analysiert. Die drei Patientengruppen bildeten:

1. 100 junge Brustkrebspatientinnen (Manifestation < 45 Jahre)
2. 100 ältere Brustkrebspatientinnen (Manifestation >60 Jahre)
3. 22 hirnmetastasierte Brustkrebspatientinnen vor, nach oder während der Strahlentherapie. Lymphozyten wurden nach einheitlichem Schema (siehe 4.2.1 Lymphozytenisolierung) isoliert und zur Teilung angeregt. Anschließend wurde die DNA für jeweils 25 min mit CldU und IdU Nukleotidanaloga markiert, und die Chromatinfasern mittels Immunfärbung analysiert. Dabei sind verschiedene Parameter für die Beurteilung der genetischen Stabilität von Interesse.

5.1.1. Replikationsgeschwindigkeit in BM, jungen und älteren Brustkrebspatientinnen

Für die Replikationsprogression ist die Elongationsrate in Kilobasen pro Minute maßgeblich. Bei Mutationen in DNA Reparaturgenen ist die Elongationsrate verlangsamt. Bei heterozygoten PALB2 Mutationsträgern konnten Nikkilä et al. eine moderat reduzierte, wenn auch nicht signifikante Verminderung der Elongationsrate im Vergleich zur Kontrollgruppe zeigen⁵².

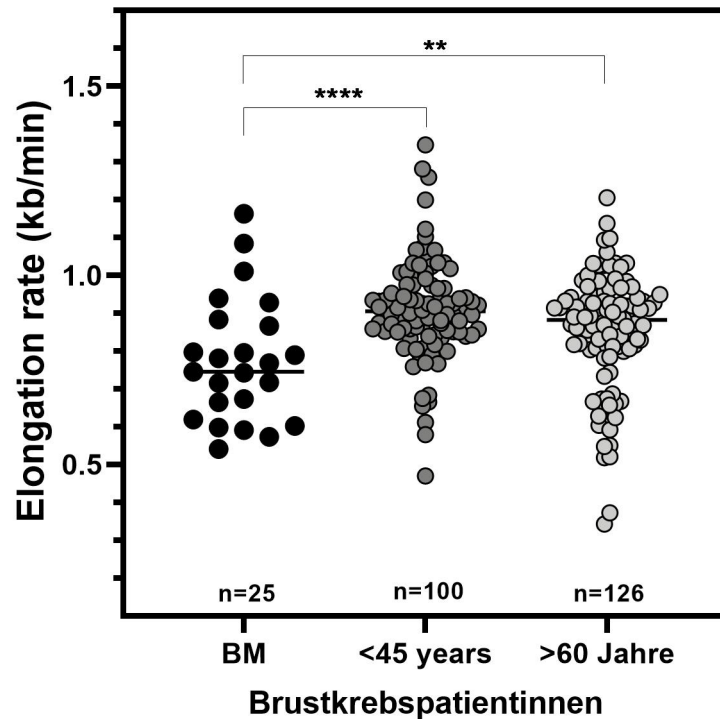


Abbildung 8: Elongationsraten in kb/min bei hirnmetastasierten, jungen und älteren Brustkrebspatientinnen im Vergleich.

Abbildung 8 zeigt die mittleren Elongationsraten der drei Patientengruppen im Vergleich. Die mittlere Elongationsrate der BM-Gruppe liegt bei 0,77 kb/min (95% KI: 0,69 kb/min - 0,84 kb/min) ($p < 0,0001$). Die der jungen Brustkrebspatientinnen beträgt 0,91 kb/min (95% KI: 0,88 kb/min – 0,93 kb/min) ($p < 0,0001$) und die mittlere Elongationsrate der älteren Brustkrebspatientinnen beträgt 0,86 kb/min (95% KI: 0,83 kb/min – 0,89 kb/min) ($p < 0,0001$). Im Vergleich liegt die mittlere Elongationsrate der BM-Gruppe um 0,14 kb/min ($SD \pm 0,03$ kb/min; $p < 0,0001$) signifikant unter der der jungen Brustkrebspatientinnen. Sie ist zudem um 0,09 kb/min ($SD \pm 0,04$ kb/min; $p < 0,0035$) signifikant niedriger als die der älteren Brustkrebspatientinnen. Lymphozyten hirnmetastasierter Brustkrebspatientinnen zeigen mehr Replikationsstress im Sinne einer verlangsamten DNA Elongation als Lymphozyten junger und älteren Brustkrebspatientinnen. Es wird deutlich eine gestörte DNA Reparatur bei verminderter Replikationsprogression gezeigt. Der Unterschied der Elongationsraten von jungen zu älteren Brustkrebspatientinnen beträgt im Mittel 0,05 kb/min $SD \pm 0,02$ kb/min (95% KI: 0,01 kb/min – 0,09 kb/min) ($p < 0,05$). Die jungen Brustkrebspatientinnen zeigen hier eine signifikant höhere Elongationsrate als die älteren Brustkrebspatientinnen. Es lässt sich anhand der Elongationsraten nicht auf einen erhöhten Replikationsstress bei jungen Brustkrebspatientinnen rückschließen.

5.1.2. I/C Rate in BM, jungen und älteren Brustkrebspatientinnen

Fraglich ist die Dynamik innerhalb der herabgesetzten Elongationsraten der BM-Gruppe. Denkbar wäre hier eine zunehmende Herabsetzung der Syntheserate im zeitlichen Verlauf, eine kontinuierlich verlangsamte Syntheserate oder eine Mischform. Aus diesem Grund werden die I/C Ratios der drei Patientengruppen betrachtet. Hierbei wird die durchschnittliche Länge der mit CldU Nukleotidanaloga synthetisierten DNA Stränge mit der durchschnittlichen Länge der mit IdU Nukleotidanaloga synthetisierten DNA-Stränge je nach 25 min verglichen. Erfolgt keinerlei Schädigung der DNA-Synthese beispielsweise mittels Chemotherapeutika oder ionisierender Bestrahlung nach dem Markieren der DNA-Synthese mit CldU und vor dem Markieren mit IdU, sollten beide synthetisierten Stränge gleich lang sein. Zu erwarten wäre ein Quotient aus den IdU- und CldU-Elongationsstrecken in Kilobasen von 1 (siehe Abbildung 9).

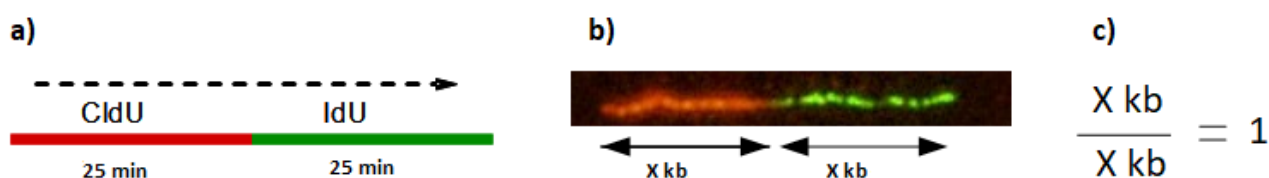


Abbildung 9:

a) Schematische Darstellung der markierten DNA-Synthese mittels DNA-Fiber Assay. Rot markierte DNA-Anteile wurden über 25 min mit CldU markiert, grün markierte anschließend für 25 min mit IdU. Erfolgt zwischen den Markierungsprozessen keine Schädigung, beispielsweise mittels Hydroxyurea oder radioaktiver Strahlung, ist von einer kontinuierlichen Elongationsrate für beide Abschnitte auszugehen.

b) Fluoreszenzmikroskopische Ansicht eines DNA-Strangs nach jeweils 25-minütiger Markierung mit CldU (hier rot fluoreszierend) und IdU (hier grün fluoreszierend) unter Verwendung eines 63er Öl-Objektivs. Die Länge des rot synthetisierten DNA-Abschnitts betrage X kb. Die Länge des grün synthetisierten DNA-Abschnitts betrage ebenfalls X kb.

c) Bei ausbleibender Schädigung der DNA-Synthese zwischen dem Markieren mit CldU und IdU ist hypothetisch ein Verhältnis der IdU-Elongationsstrecke (X kb) zur CldU-Elongationsstrecke (X kb) von 1 zu erwarten.

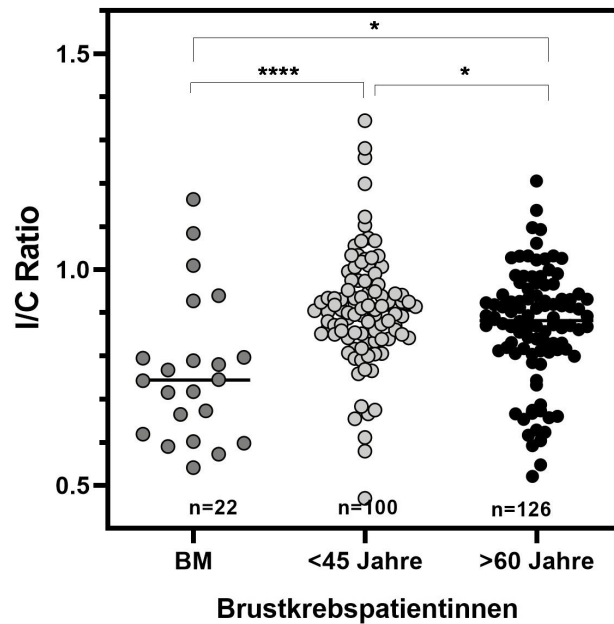


Abbildung 10: Verhältnis der Elongationsstrecken in Kilobasen während der IdU Markierungsphase zur CldU Markierungsphase (I/C Ratio) bei hirnmetastasierten, jungen und älteren Brustkrebspatientinnen im Vergleich.

In Abbildung 10 werden die I/C Raten der drei Patientengruppen miteinander verglichen. Die mittlere I/C Ratio der BM-Gruppe liegt bei 0,77 (SD \pm 0,04) (95% KI: 0,69 - 0,84) ($p < 0,0001$). Die der jungen Brustkrebspatientinnen beträgt 0,91 (SD \pm 0,01) (95% KI: 0,88 - 0,93) ($p < 0,0001$) und die mittlere I/C Ratio der älteren Brustkrebspatientinnen beträgt 0,86 (SD \pm 0,01) (95% KI: 0,83 - 0,89) ($p < 0,0001$). Die I/C Ratio der jungen Brustkrebspatientinnen nähert sich dem Quotienten von 1 am stärksten an. Das heißt, während der 50minütigen Synthesephase mit CldU Nukleotidanalogen und IdU Nukleotidanalogen bleibt die Elongationsgeschwindigkeit weitestgehend konstant, sodass von einer kontinuierlichen Synthese auszugehen ist. Die DNA-Stränge der Lymphozyten der jungen Brustkrebspatientinnen werden folglich gleichbleibend schnell synthetisiert. Um 0,05 (SD \pm 0,01) ($p < 0,05$) unter der mittleren I/C Ratio der jungen Brustkrebspatientinnen liegt die mittlere I/C Ratio der älteren Brustkrebspatientinnen. In der BM-Gruppe liegt die mittlere I/C Ratio im Vergleich um 0,09 (SD \pm 0,04) ($p < 0,05$) unter der der älteren Brustkrebspatientinnen und mit einem noch größeren Abstand von 0,14 (SD \pm 0,03) ($p < 0,0001$) unter der der jungen Brustkrebspatientinnen. Die bereits herabgesetzte Elongationsrate nimmt folglich in der BM-Gruppe im zeitlichen Verlauf weiter ab. Die I/C Ratio scheint ein eigenständiger Indikator für die genomische Instabilität bei Patientinnen mit Hirnmetastasen zu sein.

5.1.3. Replikationsursprünge in BM, jungen und älteren Brustkrebspatientinnen

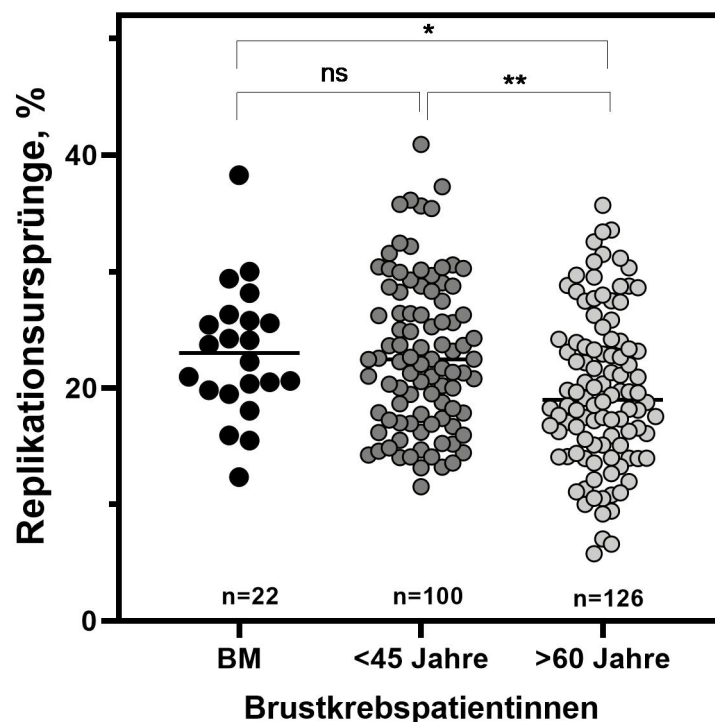


Abbildung 11: Anteil der Replikationsursprünge an allen Replikationsstrukturen in % bei hirnmetastasierten, jungen und älteren Brustkrebspatientinnen im Vergleich.

Die Untersuchung der Elongationsraten (5.1.1 Replikationsgeschwindigkeit in BM, jungen und älteren Brustkrebspatientinnen) zeigten erniedrigte Elongationsraten als Anzeichen für eine vorliegende genomische Instabilität in der BM-Gruppe. Ein weiteres Analysekriterium für die genomische Stabilität im DNA Fiber Assay ist die Quantifizierung von Replikationsursprüngen. Bei Replikationsstress werden diese vermehrt gebildet⁵². In Abbildung 11 wurden zunächst die prozentualen Anteile aller Replikationsursprünge an allen ausgewerteten Replikationsstrukturen innerhalb der drei Patientengruppen miteinander verglichen. Der Anteil an Replikationsursprüngen in der BM-Gruppe liegt bei 23,0 % (95% KI: 20,5 % - 25,6 %) ($p < 0,0001$). Der der jungen Brustkrebspatientinnen beträgt 22,0 % (95% KI: 20,6 % – 23,4 %) ($p < 0,0001$) und der Anteil an Replikationsursprüngen in der Gruppe der älteren Brustkrebspatientinnen beträgt 19,5% (95% KI: 18,3 % – 20,8 %) ($p < 0,0001$).

Die Anteile an Replikationsursprüngen der BM-Gruppe und der Gruppe der jungen Brustkrebspatientinnen unterscheiden sich nicht signifikant voneinander. Beide Gruppen zeigen jedoch signifikant

erhöhte Anteile im Vergleich zur älteren Brustkrebspatientinnengruppe. So fanden sich in der Analyse im Mittel 3,5% (SD \pm 1,5) ($p < 0,05$) mehr Replikationsursprünge in der BM-Gruppe als bei den älteren Brustkrebspatientinnen. Bei den jungen Brustkrebspatientinnen fanden sich im Mittel 2,5 % (SD \pm 1,0) ($p < 0,001$) mehr Replikationsursprünge als bei älteren Brustkrebspatientinnen. In beiden Patientengruppen, der BM-Gruppe und der der jungen Brustkrebspatientinnen kann der Anteil von Replikationsursprüngen an allen Replikationsstrukturen als Marker für einen erhöhten Replikationsstress angesehen werden.

5.1.4. Replikationsursprünge 1. Ordnung in BM, jungen und älteren und Brustkrebspatientinnen

Replikationsursprünge lassen sich unterscheiden in Replikationsursprünge erster Ordnung und Replikationsursprünge zweiter Ordnung (siehe Abbildung 6) Bei einem Replikationsursprung erster Ordnung handelt es sich um zwei elongierende Replikationsgabeln, die von einem Replikationsursprung aus in beide Richtungen laufen. Ein Replikationsursprung zweiter Ordnung bezeichnet zwei Replikationsgabeln, die in der IdU-Markierungszeit die Replikation in beide Richtungen startet. Es ist von Interesse herauszustellen, welche Gewichtung jeweils die Replikationsursprünge erster und zweiter Ordnung in den einzelnen Patientengruppen haben.

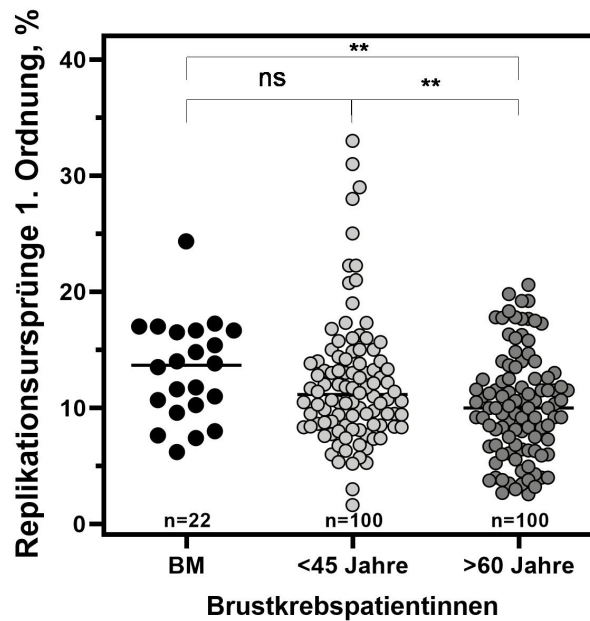


Abbildung 12: Anteil von Replikationsursprüngen 1. Ordnung an allen Replikationsstrukturen in % bei hirnmetastasierten, jungen und älteren Brustkrebspatientinnen im Vergleich.

Abbildung 12 zeigt den Anteil von Replikationsursprüngen erster Ordnung in Prozent an allen Replikationsstrukturen für die drei Patientengruppen. Der mittlere Anteil beträgt bei hirnmetastasierten Brustkrebspatientinnen 13,2 % (95% KI: 11,3 % – 15,4 %) ($p < 0,0001$), bei jungen Brustkrebspatientinnen 12,1 % (95% KI: 11,0 % – 13,2 %) ($p < 0,0001$) und bei älteren Brustkrebspatientinnen 10,2 % (95% KI: 9,3 % – 11,1 %) ($p < 0,0001$). Der Unterschied zwischen der BM-Gruppe und jungen Brustkrebspatientinnen ist nicht signifikant. Die Anteile beider Gruppen unterscheiden sich jedoch signifikant von der Gruppe der älteren Brustkrebspatientinnen. Der mittlere Anteil von Replikationsursprüngen erster Ordnung der BM-Gruppe liegt 3,0 Prozentpunkte ($SD \pm 1,1$) ($p < 0,01$) über dem der älteren Brustkrebspatientinnen. Der mittlere Anteil von Replikationsursprüngen erster Ordnung der jungen Brustkrebspatientinnen liegt 1,9 Prozentpunkte ($SD \pm 0,7$) ($p < 0,01$) über dem der älteren Brustkrebspatientinnen.

Die Gruppen der hirnmetastasierten und jungen Brustkrebspatientinnen heben sich in Bezug auf den Anteil der Replikationsursprünge erster Ordnung an allen Replikationsstrukturen auf gleiche Weise von dem der älteren Brustkrebspatientinnen ab. Zur Teilung angeregte Lymphozyten von hirnmetastasierten und jungen Brustkrebspatientinnen zeigen im DNA Fiber Assay ein erhöhtes Feuern von Replikationsursprüngen erster Ordnung als Marker für Replikationsstress.

5.1.5. Replikationsursprünge 2. Ordnung in BM, jungen und älteren Brustkrebspatientinnen

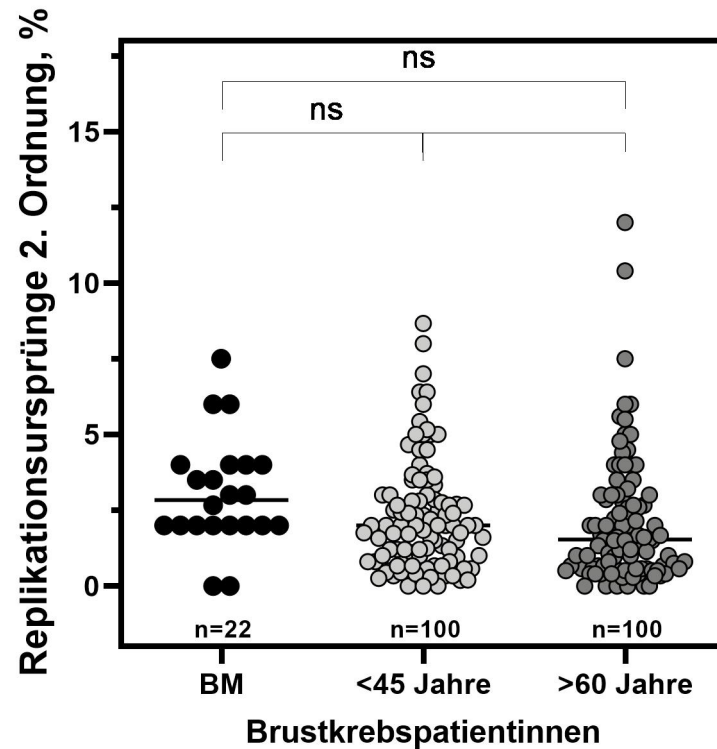


Abbildung 13: Anteil von Replikationsursprüngen 2. Ordnung an allen Replikationsstrukturen in % bei hirnmetastasierten, jungen und älteren Brustkrebspatientinnen im Vergleich.

Abbildung 13 zeigt den gemittelten Anteil von Replikationsursprüngen zweiter Ordnung in Prozent an allen Replikationsstrukturen für die drei Patientengruppen. Der mittlere Anteil beträgt bei hirnmetastasierten Brustkrebspatientinnen 3,1 % (95% KI: 2,3 % – 3,9 %) ($p < 0,0001$), bei jungen Brustkrebspatientinnen 2,3 % (95% KI: 1,9 % – 2,7 %) ($p < 0,0001$) und bei älteren Brustkrebspatientinnen 2,1 % (95% KI: 1,7 % – 2,5 %) ($p < 0,0001$). Die drei Gruppen unterscheiden sich nicht signifikant voneinander. Der Anteil der Replikationsursprünge zweiter Ordnung scheint für die Bewertung von Replikationsstress in Bezug auf die drei Patientengruppen kein hinreichend guter Marker zu sein.

6. Diskussion

Ziel dieser Arbeit war zu untersuchen, ob sich die vermutete genomische Instabilität bei hirnmetastasierten und jungen Brustkrebspatientinnen mittels DNA Fiber Assay abbilden und ggf. quantifizieren lässt.

6.1. Diskussion der Ergebnisse

6.1.1. Patientinnen mit Hirnmetastasierung zeigen erhöhten DNA Replikationsstress

Es wurden replizierende Lymphozyten für je 25 min zunächst mit dem Nukleotidanalogen CldU und anschließend mit dem Nukleotidanalogen IdU markiert. Der gewählte Zeitraum von je 25 min ist gut geeignet, um die Elongationsrate zu beurteilen. Da in eukaryoten Zellen die Replikationsursprünge in der Regel 110-150 kb voneinander entfernt liegen⁵³, sollte es in dem kurz gewählten Zeitraum nur zu wenigen Terminationsereignissen kommen, die sich fehlerhaft auf die Elongationsrate auswirken könnten⁵⁴. Nikkilä et al. untersuchte unter anderem den Effekt einer heterozygoten PALB2 Mutation lymphoblastoider Zellen auf die Elongationsrate im DNA Fiber Assay und beschrieb eine mittlere Elongationsrate von 1,02 kb/min für Mutationsträger und 1,11 kb/min für die Kontrollgruppe⁵². Der Unterschied war nicht signifikant. Parplys et al. etablierte den Fiber Assay im Rahmen ihrer Dissertation und beschrieb für unbehandelte, sich exponentiell teilende Zelllinien Elongationsraten von 0,86 kb/min (SD \pm 0,009 kb/min) für den ersten Markierungszeitraum mit CldU und Elongationsraten von 0,69 (SD \pm 0,007 kb/min) für den zweiten Markierungszeitraum mit IdU⁵⁴. Die in dieser Arbeit erhobenen Ergebnisse lassen sich in dem gleichen Bereich ansiedeln. Eine direkte Vergleichbarkeit ist jedoch nur eingeschränkt möglich, da es sich bei unserem Protokoll um zur Teilung angeregte Lymphozyten handelt und nicht um lymphoblastoide Zellreihen. Die mittleren Elongationsraten variierten je nach betrachteter Gruppe von 0,77 kb/min in der BM-Gruppe über 0,86 kb/min in der Gruppe der älteren Brustkrebspatientinnen bis 0,91 kb/min in der Gruppe der jungen Brustkrebspatientinnen. Interessanterweise zeigen die Jungen Patientinnen, bei denen eine genomische Instabilität als Ursache einer frühzeitigen Brustkrebsmanifestation angenommen wird, keinen Trend zu einer erniedrigten Elongationsrate, sondern im Gegenteil die höchste. Bei Nikkilä et al. konnte ebenfalls nur ein Trend, aber kein signifikanter Effekt der Elongationsrate bei Mutationsträgern und Kontrollgruppe gezeigt werden⁵².

Die Elongationsrate scheint weder ein geeigneter Parameter für die Quantifizierung der genomischen Instabilität bei jungen Brustkrebspatientinnen, noch bei heterozygoten PALB2 Mutationsträgern zu sein. Es handelt sich nicht um einen universellen Indikator zur Quantifizierung genomischer Integrität.

Interessanterweise ist die Elongationsrate bei hirnmetastasierten Brustkrebspatientinnen dagegen deutlich erniedrigt. Es eröffnet die Hypothese, dass weniger das Kriterium „Alter“, als mehr die Differenzierung zwischen „Primarius“ und „Hirnmetastasierung“ eine wesentliche Rolle für die Elongationsrate als Parameter der genomischen Instabilität spielen könnte. Hierzu könnten vergleichende Versuche mit hirnmetastasierten Patienten eines anderen Primarius, z.B. Lungenkrebs wegweisend sein oder aber mit andernorts fernmetastasierten Brustkrebspatientinnen. Es ist jedoch auch zu bedenken, dass die Fallzahl in der BM-Gruppe mit 22 gegenüber den 100 jungen und älteren Brustkrebspatientinnen nur bedingt geeignet ist, um repräsentative Vergleiche anzustellen. Ein Ausdehnen der BM-Gruppe auf ebenfalls 100 Patientinnen wäre hierzu erstrebenswert.

6.1.2. Unterschiedlich hohe Elongationsraten der Nukleotidanaloga CldU und IdU bei gleicher Markierungszeit.

Da zwischen den Markierungsereignissen keinerlei Schädigung der Zellen erfolgte, ist eine gleiche Einbaurrate der Nukleotidanaloga CldU und IdU zu erwarten und das Verhältnis der mit IdU synthetisierten DNA Abschnitte zu den mit CldU synthetisierten DNA Abschnitten (I/C Ratio) sollte erwartungsgemäß bei 1,0 liegen. Es liegt im Mittel jedoch stets darunter. In der BM-Gruppe beträgt die I/C Ratio 0,77; die jungen Brustkrebspatientinnen zeigen eine I/C Ratio von 0,91 und die älteren von 0,88. Dieses Phänomen lässt sich auch bei anderen Autoren feststellen^{52,54-56}. Seiler et al. führten den DNA Fiber Assay mit umgekehrten Markierungsphasen durch, also zuerst die Markierung mit IdU und anschließend die Markierung mit CldU und erhielten ebenfalls kürzere DNA Abschnitte in der zweiten Markierungszeit⁵⁶. Am ehesten scheint es sich um eine methodische Auffälligkeit zu handeln. Vorstellbar wäre, dass noch ein Überhang an CldU Nukleotidanaloga vorliegt, auf die die Polymerase zurückgreift, bevor sie die IdU Nukleotidanaloga einbaut⁵⁴.

6.1.3. Erniedrigte I/C Ratio mit weiterer Abnahme im zeitlichen Verlauf als Indikator einer herabgesetzten Replikationsprogression in der BM-Gruppe

Bei Schädigung der DNA zwischen den beiden Markierungsphasen mit einer doppelstrangbruchauslösenden Agens wie z.B. Hydroxyurea oder Camptothecin zeigt sich eine starke reduzierte Elongationsrate in der zweiten Markierungsphase. Bei anschließendem Hinzugeben eines Chk1 Inhibitors erhöht sich die Elongationsrate im zweiten Markierungsabschnitt wieder⁵⁶. Daraus lässt sich die Hypothese ableiten, dass eine niedrige I/C Ratio mit einem erhöhten Bedarf an DNA Reparaturprozessen einhergeht. Allerdings fand im Versuchsaufbau dieser Arbeit keine Schädigung zwischen den beiden Markierungsprozessen statt. Dem erhöhten Bedarf an Reparaturprozessen liegt in unseren Fällen am ehesten eine genomische Instabilität zugrunde und eine verkürzte I/C Ratio ist als Indikator für eine verminderte Replikationsprogression im zeitlichen Verlauf zu verstehen. Vorstellbar wären folgende Szenarien:

1. Die Replikationsprogression verläuft konstant aber verlangsamt ab, die I/C Ratio liegt annäherungsweise bei 1,0, die Elongationsrate zeigt sich dennoch verlangsamt. In diesem Fall wären roter und grüner Anteil gleich lang, aber beide kürzer als eine gesunde Vergleichsgruppe.
2. Die Replikationsprogression nimmt im zeitlichen Verlauf ab, das heißt, sie startet schneller und baut mit zunehmender Markierungszeit immer langsamer die Nukleotidanaloga ein. In diesem Fall wäre der rot markierte Bereich bereits verkürzt, der grüne nochmals deutlich stärker verkürzt. Es wäre mit einer herabgesetzten Elongationsrate zu rechnen.

In der BM-Gruppe ist die I/C Ratio stark herabgesetzt und die Elongationsrate ist vermindert. Das spricht für eine gestörte Replikationsprogression, die im zeitlichen Verlauf noch weiter zunimmt. Es wäre von weiterem Interesse, die Elongationsraten nur der ersten Markierungsphase weiter zu vergleichen, um diese Hypothese zu bestärken. Zu erwarten wären verkürzte CldU markierte DNA Fiber. Eine Wiederholung des DNA Fiber Assays mit unterschiedlich langen CldU und IdU Markierungszeiten würde ebenfalls ermöglichen, die Ergebnisse weiter zu präzisieren und die schrittweise Abnahme der Replikationsprogression genauer abzubilden. Das Muster der gestörten Replikationsprogression in der BM-Gruppe unterscheidet sich damit maximal von dem der jungen Brustkrebspatientinnen. Für beide Patientengruppen vermuteten wir ähnliche Muster in Bezug auf die genomische Instabilität, da sich beide in Hinblick auf Epidemiologie, Tumorbiologie und Prognose erheblich vom sporadischen Brustkrebs der älteren Patientinnen unterscheiden. Interessanterweise nähert sich die genomisch instabil vermutete Gruppe der jungen Brustkrebspatientinnen am stärksten ei-

ner Ratio von 1,0 und die Elongationsrate zeigte sich am höchsten. Beide Parameter erscheinen im Versuchsaufbau dieser Arbeit kontraintuitiv und nicht geeignet zu sein, eine genomische Instabilität bei jungen Brustkrebspatientinnen zu quantifizieren. Es ist daher davon auszugehen, dass die I/C Ratio kein allgemeingültiger Marker für genomische Instabilität ist. Umso wichtiger scheint sie für die weitere Betrachtung von Patienten mit Hirnmetastasierung zu sein. Es wäre interessant, im gesamten Patientenkollektiv im Rahmen einer Longitudinalstudie weiter zu untersuchen, wer von den bislang nicht metastasierten Brustkrebspatientinnen im weiteren zeitlichen Verlauf Hirnmetastasen entwickelt, und ob es sich dabei eben um jene Patientinnen handelt, die bereits bei nur Vorliegen des Primarius eine erniedrigte I/C Ratio zeigten. Auch hier gilt wieder zu bedenken, dass eine größere Patientengruppe von hirnmetastasierten Brustkrebspatientinnen noch aussagekräftigere Daten erbringen könnte.

6.1.4. Zunahme der Replikationsursprünge als Marker für Replikationsstress

Verschiedene Studien konnten zeigen, dass eine chemische Behandlung mit doppelstrangbruchinduzierenden Agenzien vermehrt zum Anhalten der Replikationsgabeln führt^{54,56}. Eukaryoten haben verschiedene Strategien entwickelt, die Replikationsgabeln wieder zu starten, sind bei starker Schädigung jedoch nicht immer erfolgreich. Zur Schadensbegrenzung kann eine kompensatorische Aktivierung benachbarter, ruhender Replikationsursprünge hilfreich sein⁵⁷, um letztlich schwerwiegende Fehler in der Mitose zu vermeiden⁵⁸. DNA Schädigungen (durch genetische Veränderungen, chemisch und physikalisch) können den Reparaturprozess systematisch stören, was die chromosomale Instabilität signifikant erhöht⁵⁷. Bei heterozygoten PALB2 Mutationsträgern wurden im Gegensatz zum Wildtyp fast doppelt so viele Replikationsinitiationen beobachtet⁵². Aus diesem Grund wird in dieser Arbeit der Anteil von Replikationsursprüngen an allen ausgewerteten Replikationsstrukturen der drei Untersuchungsgruppen im Vergleich betrachtet (siehe 5.1.3 Replikationsursprünge in BM, jungen und älteren Brustkrebspatientinnen). Hierbei wird zunächst nicht unterschieden, ob die Replikationsinitiationen in der ersten oder zweiten Markierungsphase erfolgten.

Es zeigt sich deutlich, dass die BM-Gruppe, sowie die Gruppe der jungen Brustkrebspatientinnen signifikant mehr neue Replikationsgabeln öffnen als die Gruppe der älteren Brustkrebspatientinnen. Im Gegensatz zu der Arbeit von Nikkilä et al.⁵² ist hier kein doppelt so hoher Anteil zu erwarten, da es sich bei den älteren Brustkrebspatientinnen nicht um eine gesunde Kontrollgruppe handelt und

auch bei den älteren Patientinnen ein erhöhter Replikationsstress vorliegen kann. Zudem liegt die Markierungszeit bei Nikkilä et al. bei jeweils 40 min. Mit zunehmender Markierungszeit ist auch mit einer Zunahme an Replikationsursprüngen zu rechnen, da diese in der Regel soweit auseinander liegen, dass sie im Rahmen einer kurzen Markierungszeit ggf. nicht ausreichend erfasst werden⁵⁴. Um so spannender ist, dass in dem hier vorliegenden Versuch bereits bei einer kurzen Markierungszeit eine sehr signifikante Erhöhung des Anteils von Replikationsursprüngen zu Tage traten. Die hier vorliegenden Daten stehen in Einklang mit der Hypothese, dass eine erhöhte Rate an Replikationsursprüngen initiiert wird, wenn Replikationsstress vorliegt und zeigen deutlich die Anfälligkeit in der DNA Replikation bei jungen und hirnmetastasierten Brustkrebspatientinnen.

6.1.5. Zunahme der Replikationsursprünge 1. Ordnung als Marker für Replikationsstress

Es bleibt zu unterscheiden, ob neue Replikationsgabeln in der ersten oder zweiten Markierungsphase initiiert werden. Entsprechend handelt es sich um Replikationsursprünge erster oder zweiter Ordnung (siehe Abbildung 6). Betrachtet man in Fehler: Verweis nicht gefunden den Anteil der Replikationsursprünge 1. Ordnung in den drei Patientengruppen finden sich noch aussagekräftigere Ergebnisse als bei der Betrachtung der gesamten Replikationsursprünge in Abbildung 11. Zwischen den beiden Gruppen, in denen wir von einer verminderten DNA Reparaturleistung ausgehen, zeigte sich kein signifikanter Unterschied. Beide Gruppen, die BM-Gruppe und die der jungen Brustkrebspatientinnen zeigten hingegen jeweils sehr signifikant erhöhte Anteile an Replikationsursprüngen 1. Ordnung im Vergleich zu den älteren Brustkrebspatientinnen. Die Ergebnisse hier waren bezogen auf das Signifikanzniveau im t-Test noch aussagekräftiger als bei der Betrachtung der gesamten Replikationsursprünge, sodass sich schlussfolgern lässt, dass insbesondere die Analyse der Replikationsursprünge 1. Ordnung wesentlich für die Quantifizierung des Replikationsstress im DNA Fiber Assay ist. Eine Wiederholung des Versuchs mit erhöhter Fallzahl in der BM-Gruppe wäre hilfreich, um diese Aussage noch zu bestätigen, denn theoretisch wäre die erhöhte Signifikanz auch aufgrund der kleinen Stichprobe und damit einhergehender höherer Ungenauigkeit möglich.

6.1.6. Keine Zunahme der Replikationsursprünge 2. Ordnung

In der BM-Gruppe ließ sich in dieser Arbeit eine herabgesetzte Elongationsrate mit erniedrigter I/C Ratio feststellen, was dafür spricht, dass der Replikationsstress mit der Zeit zunimmt. Analog wäre eine Zunahme der Replikationsursprünge in der 2. Markierungsphase zu erwarten, also anteilig mehr Replikationsursprünge 2. Ordnung als 1. Ordnung. Tatsächlich zeigt sich der Effekt nicht und sogar das Gegenteil ist der Fall. In Abbildung 13 liegt der Anteil der Replikationsursprünge 2. Ordnung bei 3,1 % und damit drastisch unter dem Anteil von 13,2 % der Replikationsursprünge 1. Ordnung in Fehler: Verweis nicht gefunden. In allen drei Gruppen liegt die anteilige Häufigkeit der Replikationsursprünge 2. Ordnung deutlich unter der anteiligen Häufigkeit der Replikationsursprünge 1. Ordnung. Diese widersprüchlich erscheinenden Resultate ließen sich auch in Voruntersuchungen unseres Labors zur Etablierung des DNA Fiber Assays finden. Die anteilige Häufigkeit von Replikationsursprüngen 2. Ordnung betrug in jenen Versuchen mit Lymphoblastoiden und einer Markierungszeit von je 20 min 8,4 %⁵⁴.

Ein Erklärungsansatz wäre, dass es bei zu großem Replikationsstress zu einer Art Ceiling Effekt bei der Initiierung von Replikationsursprüngen kommt. In diesem Fall wäre in einer Kontrollgruppe ein erhöhter Anteil an Replikationsursprüngen 2. Ordnung zu erwarten. Da wir keine dezidierte Kontrollgruppe untersucht haben, lässt sich diese These nur schwer überprüfen. Es lässt sich zusammenfassend feststellen, dass in der Fachliteratur die Replikationsursprünge 2. Ordnung größtenteils keine Erwähnung finden. Außerdem unterscheiden sich unsere Ergebnisse in allen drei Patientengruppen nicht signifikant voneinander und befinden sich auf einem paradox niedrig erscheinenden Niveau. In Anbetracht dieser Tatsachen ist fest davon auszugehen, dass der Anteil von Replikationsursprüngen 2. Ordnung kein geeigneter Parameter in der Analyse der DNA Replikationsprogression ist. Vermutlich würden erst weitere Untersuchungen zu spezifischen Enzymen im Replikationsprozess Aufschluss über die Ergebnisse wider unseres logischen Verständnisses geben. Um welche Experimente es sich dabei genau handeln könnte, bedürfte weiterer Recherche. Damit würde zwar das Interesse befriedigt werden, den Sachverhalt gänzlich zu verstehen, für das Ziel dieser Dissertation wäre es jedoch aufgrund der fehlenden Konsequenz eher von nachrangiger Bedeutung.

6.2. Diskussion der methodischen Herangehensweise

6.2.1. Definition der Patientengruppen: Kontrollgruppe

In der Diskussion wird wiederholt auf eine fehlende Kontrollgruppe verwiesen. Bewusst fiel die Entscheidung gegen eine Kontrollgruppe. Ein Grund hierfür liegt in der Schwierigkeit begründet, eine Kontrollgruppe zu definieren. Bis zum Lebensende kann jede Frau einen Brustkrebs entwickeln und wäre damit eine Patientin der älteren Brustkrebspatientinnengruppe. Man hätte als Kompromiss die Kontrollgruppe als gesunde Patientinnen mit negativer Familienanamnese für einen Brust- oder Eierstockkrebs nach Tabelle 3 und einem Alter über 85 Jahren definieren können. Es wäre möglicherweise interessant gewesen, Unterschiede zwischen der Kontrollgruppe und den älteren Brustkrebspatientinnen zu betrachten, die in der vorliegenden Arbeit weitestgehend als Vergleichsgruppe ohne genetisches Risiko eingeschätzt werden. Es war uns jedoch auch ein Anliegen, den DNA Fiber Assay als eigenständige Methode zur Quantifizierung des Replikationsstress zu verwenden. Gegebenenfalls wäre die Durchführung des DNA Fiber Assays an 100 gesunden älteren Frauen ohne Brustkrebs ein erstrebenswertes Ziel einer sich anschließenden Arbeit. So könnten sich die hier vorgestellten Ergebnisse eventuell noch stärker von einer Kontrollgruppe abheben, als von älteren Brustkrebspatientinnen.

6.2.2. Definition der Patientengruppen: Systematik innerhalb der Patientengruppen

In der Patientenakquise der einzelnen Gruppen wurde nicht zwischen einzelnen Therapiezeitpunkten unterschieden. Die Patientinnen befanden sich teils vor oder nach (neo)adjuvanter Chemotherapie, teils vor oder nach Operation und oder Bestrahlung. Insbesondere erscheinen eine weitere Differenzierung bezüglich Bestrahlung und Chemotherapie sinnvoll, da hier nennenswerte Einflüsse auf die genomische Stabilität denkbar sind. Zudem wurde nicht unterschieden, ob es sich bei der Brustkrebserkrankung um einen Primarius oder Rezidiv handelte. Diese Unterscheidung wäre ebenso interessant, da beim Rezidiv eine erhöhte genomische Instabilität angenommen werden könnte. Eine weitere Differenzierung und erneute Gegenüberstellung wären weitere Schritte, um die hier erhobenen Ergebnisse noch zu präzisieren.

6.2.3. Verwendung von primären Lymphozyten statt lymphoblastoider Zellkulturen

Ein weitestgehend neuer und gelungener Ansatz des hier vorgestellten Versuchsaufbaus ist die Verwendung von zur Teilung angeregter primärer Lymphozyten aus Patientenblut anstelle von lymphoblastoider Zellkulturen. Es ermöglicht, eine Vielzahl an Patientendaten mit den gewonnenen Ergebnissen abzugleichen. Beispielsweise wäre für Folgeuntersuchungen von großem Interesse, was die als genomisch instabil klassifizierten einzelnen Patientinnen an spezifischen Gen-Mutationen und Mutationskombinationen zeigen. Man könnte untersuchen, wie das Ansprechen auf eine folgende Strahlentherapie in Hinblick auf die Morbidität und Rezidivfreiheit ist, und wie die Daten aus dem DNA Fiber Assay mit dem Langzeitüberleben korrelieren. Der Phantasie zu zukünftigen Fragestellungen scheinen hier keine Grenzen gesetzt zu sein. Ermöglicht wird dieser Datenschatz durch Verwendung von heparinisiertem Vollblut. Eine Vergleichbarkeit der DNA Fiber Assay Ergebnisse in Bezug auf Elongation und der Ausbildung von Replikationsursprüngen ist im Vergleich zu anderen Arbeiten mit lymphoblastoider Zellkulturen gegeben. Nikkilä et al. beschrieb eine mittlere Elongationsrate von 1,02 kb/min für heterozygote PALB2 Mutationsträger und 1,11 kb/min für die Kontrollgruppe⁵², Parpys et al. etablierte den Fiber Assay im Rahmen ihrer Dissertation und beschrieb für unbehandelte, sich exponentiell teilende Zelllinien Elongationsraten von 0,86 kb/min (SD ± 0,009 kb/min) für den ersten Markierungszeitraum mit CldU und Elongationsraten von 0,69 (SD ± 0,007 kb/min) für den zweiten Markierungszeitraum mit IdU⁵⁴. Die hier vorgestellten Elongationsraten lagen zwischen 0,77 kb/min und 0,91 kb/min und sind damit (soweit möglich) vergleichbar mit den Elongationsraten lymphoblastoider Zellkulturen. Die Replikationsursprünge lagen bei Nikkilä et al. im Mittel anteilig zwischen 11,8 % in der Kontrollgruppe und 21,7% bei heterozygoten PALB2 Mutationsträgern⁵². Unsere Ergebnisse liegen zwischen 19,5% und 23,0% und lassen sich in näherungsweise mit denen von Nikkilä et al. vergleichen. Zumindest in Bezug auf Vergleichbarkeit der Elongationsraten und Replikationsursprünge erscheinen sich zum Teilen angeregte Lymphozyten im DNA Fiber Assay mit lymphoblastoiden Zellkulturen vergleichbar, bieten aber den Vorteil, noch weitere patientenbezogene Daten akquirieren zu können.

6.2.4. Intraobserver Variabilität und Interobserver Variabilität

Die Intraobserver Variabilität bezeichnet die Spektrumweite von Ergebnissen des gleichen Untersuchers zu verschiedenen Zeitpunkten im selben Versuch. In dieser Arbeit wurde dieser Effekt stich-

probenartig untersucht und es konnten keine große Variabilität festgestellt werden. Die Ergebnisse in der Wiederholungsuntersuchung ähnelten den Vorergebnissen, des gleichen Untersuchers.

Die Interobserver Variabilität bezeichnet die Spektrumweite von Ergebnissen von mehreren verschiedenen Untersuchern im selben Versuchsaufbau. Wir verglichen stichprobenartig die Ergebnisse zu Elongationsraten und Replikationsstrukturen der gleichen Probanden durch verschiedene Untersucher. Die Ergebnisse variierten zumindest in den Stichproben so stark, dass wir uns entschieden, die mikroskopisch erfassten Bilder nur durch einen Untersucher auswerten zu lassen. Sicherlich wäre hier eine systematische Analyse zur Quantifizierung der Interobserver Variabilität im Rahmen weiterer Studien anzustreben, um potentielle Fehlerquellen in der Auswertung aufzudecken und einen einheitlichen Standard zu erarbeiten.

7. Abkürzungsverzeichnis

ATM	Ataxia-telangiectasia mutated
BARD1	BRCA1 Associated RING Domain 1 Protein
BLM	Bloom syndrome protein
BM-Gruppe	Brain metastasis Gruppe: Brustkrebspatientinnen mit gesicherter Hirnmetastasierung
BRCA1	Breast cancer susceptibility gene 1
BRCA2	Breast cancer susceptibility gene 2
BRIP1	BRCA1 Interacting Protein C-Terminal Helicase 1
bzw.	Beziehungsweise
CDH1	Cadherin 1
CDK1	Cyclin-dependent kinase 1
CDK2	Cyclin-dependent kinase 2
CHEK2	Checkpoint kinase 2
CldU	Chlordesoxyuridin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNA-PKcs	DNA-Dependent Protein Kinase Catalytic Subunit
DSB	DNA-Doppelstrangbruch
et al.	Und andere
FAM175A	ABRAXAS (central organizer of a large BRCA1 holoenzyme complex)
FANCC/-M	Fanconi Anaemia Complementation Group C /M
ggf.	Gegebenenfalls
H ₂ O	Wasser
Her2	Human epidermal growth receptor-2
HR	Homologe Rekombination
HU	Hydroxyurea
IdU	Iododesoxyuridin
kb/m	Kilobasen pro Minute
Ki-67	Nukleäres Protein und Proliferationsmarker Ki-67
LumA	Luminal-A
LumB	Luminal-B
min	Minuten
MRT	Magnetresonanztomographie
NHEJ	Non-homologous end joining
NF1	Neurofibromatose Typ 1
mRNA	Messenger RNA (ribonucleic acid)
PALB2	Partner and localizer of BRCA2
PARP	Poly ADP ribose polymerase
PIKK	PI3-kinase-related protein kinase

PMS2	PMS1 Homolog 2, Mismatch Repair System Component
Rad50	DNA repair protein RAD50
RAD51	Gen, welches das DNA-Reparaturprotein Rad51 kodiert
ssDNA	Single strand DNA, DNA-Einzelstrang
SEM	Standard error of the mean, Standardfehler des Mittelwerts
STK11	Serine/ Threonine Kinase 11
TP53	Tumorprotein p53
PTEN	Phosphatase and Tensin homolog
UICC	Union internationale contre le cancer
ZNS	Zentrales Nervensystem
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
°C	Grad Celsius
%	Prozent

8. Literaturverzeichnis

1. Simbrich A, Wellmann I, Heidrich J, Heidinger O, Hense H-W. Trends in advanced breast cancer incidence rates after implementation of a mammography screening program in a German population. *Cancer Epidemiol.* 2016;44:44-51. doi:10.1016/j.canep.2016.07.006
2.Robert-Koch-Institut, Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland, eds. *Krebs in Deutschland 2011/2012.* 10. Ausg.; 2015.
3.Johnson RH, Anders CK, Litton JK, Ruddy KJ, Bleyer A. Breast cancer in adolescents and young adults. *Pediatr Blood Cancer.* 2018;65(12):e27397. doi:10.1002/pbc.27397
4. ...Autier P, Boniol M. Mammography screening: A major issue in medicine. *Eur J Cancer Oxf Engl* 1990. 2018;90:34-62. doi:10.1016/j.ejca.2017.11.002
5.S3-Leitlinie Mammakarzinom. Published online 2020:453.
6. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2018;68(6):394-424. doi:10.3322/caac.21492
7. .Kohler BA, Sherman RL, Howlader N, et al. Annual Report to the Nation on the Status of Cancer, 1975-2011, Featuring Incidence of Breast Cancer Subtypes by Race/Ethnicity, Poverty, and State. *JNCI J Natl Cancer Inst.* 2015;107(6). doi:10.1093/jnci/djv048
8. Guo F, Kuo Y-F, Shih YCT, Giordano SH, Berenson AB. Trends in breast cancer mortality by stage at diagnosis among young women in the United States. *Cancer.* 2018;124(17):3500-3509. doi:10.1002/cncr.31638
9. Wörmann B, Höffken K, Possinger K. *Kompendium internistische Onkologie: Standards in Diagnostik und Therapie. Teil 1. Teil 1.* Springer Medizin; 2018. Accessed June 11, 2020. <http://public.eb-lib.com/choice/publicfullrecord.aspx?p=511300>
10. ...Elston CW, Ellis IO. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology.* 1991;19(5):403-410. doi:10.1111/j.1365-2559.1991.tb00229.x
11.National Collaborating Centre for Cancer (UK). *Advanced Breast Cancer: Diagnosis and Treatment.* National Collaborating Centre for Cancer (UK); 2009. Accessed May 27, 2020. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK61870/>
12. Slamon D, Eiermann W, Robert N, et al. Adjuvant Trastuzumab in HER2-Positive Breast Cancer. *N Engl J Med.* 2011;365(14):1273-1283. doi:10.1056/NEJMoa0910383
13.Petrelli F, Viale G, Cabiddu M, Barni S. Prognostic value of different cut-off levels of Ki-67 in breast cancer: a systematic review and meta-analysis of 64,196 patients. *Breast Cancer Res Treat.* 2015;153(3):477-491. doi:10.1007/s10549-015-3559-0

14.Perou CM, Sørlie T, Eisen MB, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 2000;406(6797):747-752. doi:10.1038/35021093
15. . Carvalho R, Paredes J, Ribeiro AS. Impact of breast cancer cells' secretome on the brain metastatic niche remodeling. *Semin Cancer Biol*. 2020;60:294-301. doi:10.1016/j.semcancer.2019.10.011
16. Ito A, Kondo S, Tada K, Kitano S. Clinical Development of Immune Checkpoint Inhibitors. *BioMed Res Int*. 2015;2015. doi:10.1155/2015/605478
17. ...Anders CK, Johnson R, Litton J, Phillips M, Bleyer A. Breast cancer before age 40 years. *Semin Oncol*. 2009;36(3):237-249. doi:10.1053/j.seminoncol.2009.03.001
18. . Narod SA. Breast cancer in young women. *Nat Rev Clin Oncol*. 2012;9(8):460-470. doi:10.1038/nrclinonc.2012.102
19. Leclère B, Molinié F, Trétarre B, et al. Trends in incidence of breast cancer among women under 40 in seven European countries: a GRELL cooperative study. *Cancer Epidemiol*. 2013;37(5):544-549. doi:10.1016/j.canep.2013.05.001
20.Suba Z. Circulatory estrogen level protects against breast cancer in obese women. *Recent Patents Anticancer Drug Discov*. 2013;8(2):154-167. doi:10.2174/1574892811308020004
21. . Ricks-Santi L, McDonald JT, Gold B, et al. Next Generation Sequencing Reveals High Prevalence of BRCA1 and BRCA2 Variants of Unknown Significance in Early-Onset Breast Cancer in African American Women. *Ethn Dis*. 2017;27(2):169-178. doi:10.18865/ed.27.2.169
22. Andersson TM-L, Johansson ALV, Hsieh C-C, Cnattingius S, Lambe M. Increasing incidence of pregnancy-associated breast cancer in Sweden. *Obstet Gynecol*. 2009;114(3):568-572. doi:10.1097/AOG.0b013e3181b19154
23. ...Rossing M, Sørensen CS, Ejlersen B, Nielsen FC. Whole genome sequencing of breast cancer. *Apmis*. 2019;127(5):303-315. doi:10.1111/apm.12920
24. Johnson RH, Chien FL, Bleyer A. Incidence of breast cancer with distant involvement among women in the United States, 1976 to 2009. *JAMA*. 2013;309(8):800-805. doi:10.1001/jama.2013.776
25. Azim HA, Michiels S, Bedard PL, et al. Elucidating prognosis and biology of breast cancer arising in young women using gene expression profiling. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2012;18(5):1341-1351. doi:10.1158/1078-0432.CCR-11-2599
26. Parker JS, Mullins M, Cheang MCU, et al. Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2009;27(8):1160-1167. doi:10.1200/JCO.2008.18.1370
27. Anders CK, Hsu DS, Broadwater G, et al. Young age at diagnosis correlates with worse prognosis and defines a subset of breast cancers with shared patterns of gene expression. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2008;26(20):3324-3330. doi:10.1200/JCO.2007.14.2471
28.Seitz S, Ortmann O. Hereditäre Krebserkrankungen in der Gynäkologie. *Gynäkol*. 2020;53(5):321-330. doi:10.1007/s00129-020-04592-5

29. Borgmann K, Köcher S, Kriegs M, et al. DNA Repair. *Recent Results Cancer Res Fortschritte Krebsforsch Progres Dans Rech Sur Cancer*. 2016;198:1-24. doi:10.1007/978-3-662-49651-0_1
30. Kast K, Rhiem K, Wappenschmidt B, et al. Prevalence of BRCA1/2 germline mutations in 21 401 families with breast and ovarian cancer. *J Med Genet*. 2016;53(7):465-471. doi:10.1136/jmedgenet-2015-103672
31. .Barnholtz-Sloan JS, Sloan AE, Davis FG, Vignea FD, Lai P, Sawaya RE. Incidence proportions of brain metastases in patients diagnosed (1973 to 2001) in the Metropolitan Detroit Cancer Surveillance System. *J Clin Oncol*. 2004;22(14):2865–2872.
32. Witzel I, Oliveira-Ferrer L, Pantel K, Müller V, Wikman H. Breast cancer brain metastases: biology and new clinical perspectives. *Breast Cancer Res*. 2016;18(1):8. doi:10.1186/s13058-015-0665-1
33. .Bendell JC, Domchek SM, Burstein HJ, et al. Central nervous system metastases in women who receive trastuzumab-based therapy for metastatic breast carcinoma. *Cancer*. 2003;97(12):2972-2977. doi:10.1002/cncr.11436
34. Eichler AF, Chung E, Kodack DP, Loeffler JS, Fukumura D, Jain RK. The biology of brain metastases —translation to new therapies. *Nat Rev Clin Oncol*. 2011;8(6):344-356. doi:10.1038/nrclinonc.2011.58
35. ...Lee YW, Cho HJ, Lee WH, Sonntag WE. Whole Brain Radiation-Induced Cognitive Impairment: Pathophysiological Mechanisms and Therapeutic Targets. *Biomol Ther*. 2012;20(4):357-370. doi:10.4062/biomolther.2012.20.4.357
36. McTyre E, Scott J, Chinnaiyan P. Whole brain radiotherapy for brain metastasis. *Surg Neurol Int*. 2013;4(Suppl 4):S236.
37. Arslan C, Dizdar O, Altundag K. Chemotherapy and biological treatment options in breast cancer patients with brain metastasis: an update. *Expert Opin Pharmacother*. 2014;15(12):1643–1658.
38.Fazakas C, Nagyoszi P, Farkas AE, et al. Transmigration of melanoma cells through the blood-brain barrier: role of endothelial tight junctions and melanoma-released serine proteases. *PLoS One*. 2011;6(6):e20758. doi:10.1371/journal.pone.0020758
39.Owonikoko TK, Arbiser J, Zelnak A, et al. Current approaches to the treatment of metastatic brain tumours. *Nat Rev Clin Oncol*. 2014;11(4):203-222. doi:10.1038/nrclinonc.2014.25
40. Schünke M, Schulte E, Schumacher U, Voll M, eds. *Kopf, Hals und Neuroanatomie: 115 Tabellen*. 2., überarb. und erw. Aufl. Thieme; 2009.
41. Bauer HC, Traweger A, Zweimueller-Mayer J, et al. New aspects of the molecular constituents of tissue barriers. *J Neural Transm Vienna Austria 1996*. 2011;118(1):7-21. doi:10.1007/s00702-010-0484-6
42. .Bettegowda C, Sausen M, Leary RJ, et al. Detection of circulating tumor DNA in early- and late-stage human malignancies. *Sci Transl Med*. 2014;6(224):224ra24. doi:10.1126/scitranslmed.3007094

43. Stephen Paget's paper reproduced from The Lancet, 1889. *Cancer Metastasis Rev.* 1989;8(2):98-101. doi:10.1007/BF00176898
44. Smid M, Wang Y, Zhang Y, et al. Subtypes of breast cancer show preferential site of relapse. *Cancer Res.* 2008;68(9):3108-3114. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-5644
45. Anders CK, Deal AM, Miller CR, et al. The prognostic contribution of clinical breast cancer subtype, age, and race among patients with breast cancer brain metastases. *Cancer.* 2011;117(8):1602-1611. doi:10.1002/cncr.25746
46. Peinado H, Zhang H, Matei IR, et al. Pre-metastatic niches: organ-specific homes for metastases. *Nat Rev Cancer.* 2017;17(5):302-317. doi:10.1038/nrc.2017.6
47. Woditschka S, Evans L, Duchnowska R, et al. DNA double-strand break repair genes and oxidative damage in brain metastasis of breast cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2014;106(7). doi:10.1093/jnci/dju145
48. Prakash R, Zhang Y, Feng W, Jasin M. Homologous recombination and human health: the roles of BRCA1, BRCA2, and associated proteins. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2015;7(4):a016600. doi:10.1101/cshperspect.a016600
49. . .Roy R, Chun J, Powell SN. BRCA1 and BRCA2: different roles in a common pathway of genome protection. *Nat Rev Cancer.* 2011;12(1):68-78. doi:10.1038/nrc3181
50. Nikolova T, Göder A, Parplys A, Borgmann K. DNA Fiber Spreading Assay to Test HDACi Effects on DNA and Its Replication. *Methods Mol Biol Clifton NJ.* 2017;1510:103-113. doi:10.1007/978-1-4939-6527-4_8
51. Jackson DA, Pombo A. 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. *J Cell Biol.* 1998;140(6):1285-1295. doi:10.1083/jcb.140.6.1285
52. Nikkilä J, Parplys AC, Pylkäs K, et al. Heterozygous mutations in PALB2 cause DNA replication and damage response defects. *Nat Commun.* 2013;4:2578. doi:10.1038/ncomms3578
53.Edenberg HJ, Huberman JA. Eukaryotic Chromosome Replication. *Annu Rev Genet.* 1975;9(1):245-284. doi:10.1146/annurev.ge.09.120175.001333
54. ..Parplys AC. Bedeutung von Rad51 für die Reparatur Replikations- assoziierter DNA-Schäden in humanen Tumorzellen. Published online August 2011.
55. Petermann E, Maya-Mendoza A, Zachos G, Gillespie DAF, Jackson DA, Caldecott KW. Chk1 Requirement for High Global Rates of Replication Fork Progression during Normal Vertebrate S Phase. *Mol Cell Biol.* 2006;26(8):3319-3326. doi:10.1128/MCB.26.8.3319-3326.2006
56.Seiler JA, Conti C, Syed A, Aladjem MI, Pommier Y. The intra-S-phase checkpoint affects both DNA replication initiation and elongation: single-cell and -DNA fiber analyses. *Mol Cell Biol.* 2007;27(16):5806-5818. doi:10.1128/MCB.02278-06
57. Liptay M, Barbosa JS, Rottenberg S. Replication Fork Remodeling and Therapy Escape in DNA Damage Response-Deficient Cancers. *Front Oncol.* 2020;10. doi:10.3389/fonc.2020.00670

58. Ait Saada A, Lambert SAE, Carr AM. Preserving replication fork integrity and competence via the homologous recombination pathway. *DNA Repair*. 2018;71:135-147. doi:10.1016/j.dnarep.2018.08.017

9. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen beteiligten Personen danken, die mich bei der Anfertigung meiner Doktorarbeit unterstützt haben.

Besonders danken möchte ich Prof. Dr. Kerstin Borgmann, für die herzliche und gewissenhafte Betreuung bei der Durchführung der gesamten Arbeit und für das entgegengebrachte Vertrauen. Ihre positive Grundeinstellung und Begeisterung hat sich auf mich und diese Arbeit übertragen und ich freue mich über den Einblick in Wissenschaft und Forschung, den ich in meiner Zeit im Labor und während des regen Austauschs mit ihr erhascht habe.

Prof. Dr. Kai Rothkamm möchte ich für die Möglichkeit danken, an diesem Projekt in seinem Labor arbeiten zu dürfen. Dr. Ann Parplys danke ich für die Einarbeitung in die gesamte Methodik.

Danken möchte ich auch Britta Riepen und Alexandra Zielinsky für die tatkräftige Unterstützung und Hilfsbereitschaft zu jeder Zeit. 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.

Ich danke meiner Familie, die immer an mich glaubt.

Ein spezieller Dank gilt dem kleinen Monster in meinem Bauch, dass mich während der Corona-Pandemie zur Überzeugung brachte, die Doktorarbeit fertig zu stellen und schließlich danke ich meinem Antoine, der mich mit Geduld und Zuspruch immer wieder ermutigte durchzuhalten und mich auf dem Weg mit seiner Liebe begleitete.

10. Lebenslauf

Entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen.

11. 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:

Katinka-Aileen Matthes