

# **UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF**

Labor für Strahlenbiologie und experimentelle Radioonkologie

Leitung: Prof. Dr. rer.nat. Kai Rothkamm

## **Fehlerhafte DNA-Replikationsprozesse als Ursache des Early-onset Brustkrebses**

### **Dissertation**

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

vorgelegt von:

Helene M. Dikomey  
aus Hamburg

Hamburg 2021

**Angenommen von der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am:  
25.01.2021**

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

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

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

## Inhaltsverzeichnis

<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>5</b>
<b>Summary</b> .....	<b>7</b>
<b>1. Einleitung</b> .....	<b>9</b>
1.1 Brustkrebs.....	9
1.1.1 <i>Epidemiologie</i> .....	9
1.1.2 <i>Anatomische Stadieneinteilung</i> .....	10
1.1.3 <i>Biomarker</i> .....	11
1.1.4 <i>Brustkrebs bei jungen Frauen</i> .....	13
1.1.5 <i>Therapie</i> .....	14
1.1.6 <i>Heilungsschancen</i> .....	15
1.2 Entstehung von Brustkrebs.....	16
1.3 Genomische Instabilität.....	17
1.3.1 <i>DNA-Doppelstrangbruchreparatur</i> .....	17
1.3.2 <i>Regulation der DSB-Reparatur</i> .....	19
1.3.3 <i>Zellzykluskontrolle</i> .....	20
1.3.4 <i>DNA-Replikation</i> .....	21
1.3.5 <i>Nachweis der DNA-Replikation mit Fiber Assay</i> .....	22
1.3.6 <i>Replikationsstress</i> .....	23
1.3.7 <i>Genetisch bestimmter Brustkrebs</i> .....	24
1.4 Ziel der Untersuchung.....	26
<b>2. Material und Methoden</b> .....	<b>28</b>
2.1 Patientinnen .....	28
2.2 Blutentnahme.....	28
2.3 DNA-Fiber Assay .....	28
2.3.1 <i>Stimulation der Lymphozyten</i> .....	29
2.3.2 <i>Markierung der replizierten DNA mit CldU und IdU</i> .....	29
2.3.3 <i>Ausbreiten der DNA</i> .....	29
2.3.4 <i>Immunfärbung der Chromatinfasern</i> .....	29
2.3.5 <i>Detektion der markierten DNA mittels Fluoreszenzmikroskopie</i> .....	31
2.3.6 <i>Auswertung mittels ImageJ</i> .....	31
2.4 Statistik .....	31
2.5 Agentien, Firmen, Software .....	32
<b>3. Ergebnisse</b> .....	<b>34</b>
3.1 Detektion von Replikationsstrukturen mittels DNA-Fiberassay.....	34
3.2 Verteilung der Einzelwerte .....	35
3.3 Elongationsraten für jüngere und ältere Brustkrebspatientinnen .....	36
3.4 Replikationsursprünge 1. und 2. Ordnung .....	38
3.5 Beziehung zwischen Elongation und Replikationsstart.....	40
<b>4. Diskussion</b> .....	<b>43</b>
4.1 Early-onset Brustkrebs.....	43
4.2 DNA-Fiber Assay .....	44
4.3 Hamburg Studie .....	45
4.3.1 <i>Elongationsrate</i> .....	45
4.3.2 <i>Aktivierung von ruhenden Replikationsursprüngen</i> .....	48
4.3.3 <i>Beziehung zwischen Elongation und Replikationsstart</i> .....	49
4.4 Ausblick.....	51

---

<b>5. Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>52</b>
<b>6. Literaturverzeichnis.....</b>	<b>54</b>
<b>7. Danksagung .....</b>	<b>59</b>
<b>8. Lebenslauf .....</b>	<b>60</b>
<b>9. Eidesstattliche Versicherung.....</b>	<b>61</b>

## ZUSAMMENFASSUNG

Brustkrebs ist weltweit die häufigste Krebserkrankung der Frau. Das Risiko an Brustkrebs zu erkranken, nimmt mit dem Alter deutlich zu. Aber auch für Frauen jünger als 40 besteht bereits ein nennenswertes Risiko. Das Risiko für diesen frühen Brustkrebs (early-onset breast cancer, *EOBC*) hat in den letzten Jahren kontinuierlich zugenommen. In vielen Ländern ist für die jungen Frauen der Brustkrebs sogar die häufigste Krebstodesursache.

Die molekularen Ursachen für den *EOBC* sind bisher nur zum Teil bekannt. Etwa 20% des *EOBC* werden auf Keimbahnmutationen zurückgeführt, wobei Mutationen in den Genen *BRCA1* und *BRCA2* die wichtigsten sind. Insgesamt kann bisher nur etwa die Hälfte des genetisch bedingten Brustkrebsrisikos erklärt werden.

Um langfristig weitere Gene zu identifizieren, die für den *EOBC* verantwortlich sind, wurden in dieser Studie junge (<45 Jahre) und ältere (>60 Jahre) Brustkrebspatientinnen hinsichtlich des Replikationsverhalten und des möglichen Replikationsstress ihrer Lymphozyten miteinander verglichen. Dieser Stress wird im Wesentlichen bestimmt durch das individuelle Zusammenspiel aus Replikation, der Schadenserkennung der Zelle, der Zellzykluskontrolle, sowie der DSB-Reparatur mittels Homologer Rekombination. Defekte in einem dieser Prozesse führt zu einem Replikationsstress und damit zu einer genomischen Instabilität, die eine Voraussetzung für die Entstehung von Krebs ist.

Für die Studie wurden insgesamt Blutproben von 104 jungen sowie 101 älteren Brustkrebspatientinnen gesammelt. Nach Stimulation mit PHA wurde in den proliferierenden Lymphozyten das Replikationsverhalten mittels des DNA-Fiber Assays bestimmt. Als Parameter wurden die Elongationsrate sowie die Häufigkeit für den Start einer Replikationsgabel gemessen. Insgesamt wurden folgende Ergebnisse erzielt:

- Die Elongationsraten in den Lymphozyten von jungen und älteren Brustkrebspatientinnen unterscheiden sich nicht signifikant. Bei Auftrennung der Daten in Quartile zeigte sich jedoch in der oberen Gruppe für die jungen Patientinnen eine signifikant geringere Elongationsrate als bei den älteren Patientinnen.
- Die Lymphozyten von jungen und älteren Brustkrebspatientinnen unterscheiden sich deutlich hinsichtlich der Aktivierung der Replikationsursprünge. Dies zeigt sich insbesondere, wenn die Häufigkeiten für die Replikationsursprünge 1. und 2. Ordnung zusammengefasst werden. Insgesamt wird für die Lymphozyten von jungen Patientinnen eine stärkere Aktivierung von Replikationsursprüngen beobachtet. Dies wird besonders deutlich, wenn bei den Daten jeweils die oberen Quartile miteinander verglichen werden.
- Für beide Patientinnengruppen wird eine schwache, dennoch hoch-signifikante positive

Korrelation zwischen der Elongationsrate und der Häufigkeit der Replikationsursprünge beobachtet. Bei Vergleich der jeweiligen Quartile wird deutlich, dass in den Lymphozyten von jungen Patientinnen, die sich durch eine hohe Elongationsrate auszeichnen, wesentlich häufiger neue Replikationsgabel gestartet werden als bei den älteren Patientinnen.

- Dieser Phänotyp, dass eine hohe Elongationsrate besonders häufig das Starten von neuen Replikationsgabeln bewirkt, ist ein Hinweis darauf, dass bei jungen Brustkrebspatientinnen deutlich mehr Keimbahnmutationen in den Genen der Homologen Rekombination bzw. der Zellzykluskontrolle vorliegen als bei den älteren Patientinnen.

Die mittels des DNA-Fiber Assays erhobenen Daten hinsichtlich des Replikationsstresses in Lymphozyten von jungen und älteren Brustkrebspatientinnen bieten langfristig eine ideale Basis, um weitere Gene zu identifizieren, die für das Entstehen von Brustkrebs bei jungen Frauen verantwortlich sind.

## SUMMARY

Breast cancer is the most common cancer in women worldwide. The risk to develop breast cancer clearly increases with age. But even for women younger than 40 there is already a substantial risk. In the last decades the risk of early-onset breast cancer (*EOBC*) increases continuously. In many countries *EOBC* is already the most common cause of cancer death for women.

The molecular mechanisms leading to *EOBC* are only partly known. About 20% of *EOBC* are attributed to germline mutations, among which mutations in *BRCA1* and *BRCA2* are the most relevant. So far, the mechanisms for only half of the genetically determined risk of breast cancer are known.

To identify new genes relevant for *EOBC*, lymphocytes from young (<45 years) and older (>60 years) breast cancer patients were collected and analysed for DNA replication and replication stress. This replication stress is determined by the individual interaction of DNA replication, DNA damage control, cell cycle control as well as DSB repair by homologous recombination. Defects in one of these processes may lead to replication stress and thereby causing genomic instability finally resulting in cancer.

For this study blood samples were collected from 104 younger and 101 elder breast cancer patients. After stimulation with PHA, replication was analysed in the proliferating lymphocytes using the DNA fiber assay. The parameters determined are the rate of elongation as well as the frequency of origin firing. The following results were obtained:

- In respect of elongation rate, there is no significant difference between younger and elder breast cancer patients. However, when data were splitted into quartiles, a significant difference was seen for the upper quartiles with a lower elongation rate for younger patients.
- For younger and elder breast cancer patients there was a clear difference in origin firing. This was especially present when analysing the frequency of origin firing for both 1<sup>st</sup> and 2<sup>nd</sup> order. Overall, lymphocytes of younger patients exhibited a stronger origin firing than measured for elder patients. This was especially obvious, when focussing on the upper quartiles of the data.
- For both cohorts there was a weak, but highly significant positive association between elongation rate and frequency of origin firing. A detailed analyses of these data revealed that in lymphocytes of younger patients a high elongation rate was often found to be associated with a high frequency of origin firing.

- The observed phenotype of that a fast DNA elongation is accompanied with an increase in origin firing, indicates that in younger breast cancer patients the number of germline mutations associated with homologous recombination or cell cycle control is much higher than in elder breast cancer patients.

These data obtained for the DNA replication and replication stress in lymphocytes taken from younger and elder breast cancer patients may provide an excellent tool to identify more genes being involved in the development of *EOBC*.

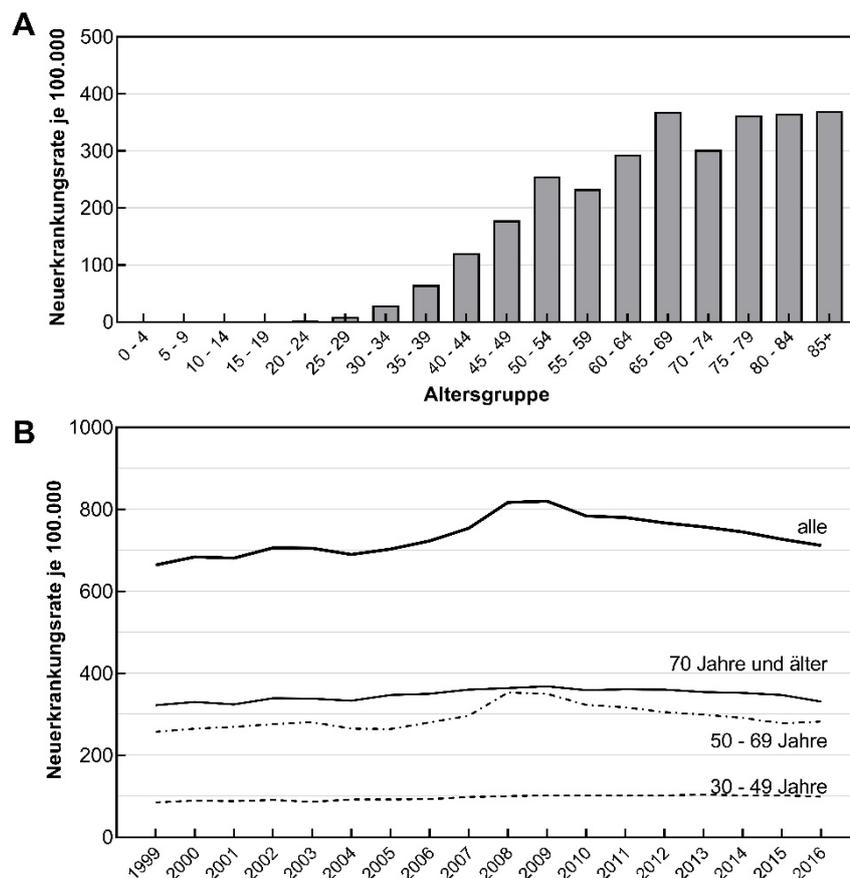
# 1. EINLEITUNG

## 1.1 Brustkrebs

### 1.1.1 Epidemiologie

In Deutschland erkranken aktuell etwa 70.000 Frauen jährlich an Brustkrebs (RKI 2019). Damit ist dies die häufigste Krebserkrankung bei Frauen und tritt im Laufe des Lebens im Mittel bei jeder achten Frau auf. Wie bei nahezu allen Krebserkrankungen hängt die Neuerkrankungsrate vom Alter ab und nimmt mit steigendem Alter deutlich zu (Abb. 1A). Ab der Menopause (50 – 54 Jahre) flacht dieser Anstieg deutlich ab und erreicht ab 75 Jahren einen weitgehend konstanten Wert von im Mittel 360 Neuerkrankungen je 100.000 Frauen pro Altersgruppe. Allerdings besteht auch für junge Frauen im Alter 35 – 39 Jahren bereits ein erkennbares Risiko von 65 Neuerkrankungen je 100.000 Frauen. In den USA ist für diese Altersgruppe Brustkrebs die häufigste Krebstodesursache (ACS 2013).

Die altersstandardisierte Neuerkrankungsrate für Brustkrebs ist seit dem Jahr 1999 nur



**Abb. 1: Altersstandardisierte Neuerkrankungsrate für Brustkrebs.**

Altersstandardisierte Neuerkrankungsrate in Deutschland für Brustkrebs je 100.000 Frauen für den Zeitraum 1999 bis 2016. A) Neuerkrankungsrate in Abhängigkeit von der Altersgruppe (RKI 2020). B) Zunahme der Neuerkrankungsrate für die Altersgruppen: 30 – 49 Jahre, 50 – 69 Jahre, 70 Jahre und älter, sowie alle (RKI 2019).

geringfügig gestiegen (Abb.1A). Das Zwischenhoch, welches sich für die Jahre 2006 – 2012 zeigte, kann auf die vermehrte Erfassung von Neuerkrankungen durch Mammographie in der Altersgruppe 50 – 60 Jahre zurückgeführt werden. Bei Auftrennung nach dem Alter der Patientinnen ist zu erkennen, dass für die Zahl der Brustkrebspatientinnen pro 100.000 Frauen sich ab 2008 eine deutliche Abnahme von 820 auf 710 Erkrankungen im Jahr 2016 zeigt. Dies entspricht für diesen kurzen Zeitraum von nur 8 Jahren eine Abnahme um 13%.

Im Gegensatz dazu wurde für die Altersgruppe von 30 – 49 Jahre ein kontinuierlicher Anstieg der Neuerkrankungsrate von 85 pro 100.000 im Jahr 1999 auf 99 im Jahr 2016 beobachtet. Der Anstieg dieses frühen Brustkrebses, welcher generell als *early-onset-Brustkrebs (EOBC)* bezeichnet wird, zeigt sich auch weltweit (Fidler et al. 2017, Huang et al. 2021, Leclère et al. 2013). Der Anteil des *EOBC* an allen Brustkrebserkrankungen wird auf 6-10% geschätzt, kann aber in westlichen Ländern sogar 20% erreichen (Anders et al. 2009, Gómez-Flores-Ramos et al. 2017).

### 1.1.2 Anatomische Stadieneinteilung

Die anatomische Stadieneinteilung beim Brustkrebs erfolgt mittels der TNM-Klassifikation anhand dreier Parameter: Ausdehnung des Primärtumors (T-Stadium), Lymphknotenbefall (N-Stadium) und Vorhandensein von Fernmetastasen (M-Stadium).

**T-Stadium:** Die Ausdehnung des Primärtumors wird bestimmt mittels Bildgebung sowie durch klinische und histologische Untersuchung. Die Diagnostik kann Mammographie, sonographische Untersuchungen der Brüste und Axillae, sowie bei auffälligem Befund auch Stanz- oder Vakuumbiopsie beinhalten.

**L-Stadium:** Der Lymphknotenbefall wird in der Regel mittels der Sentinel-Lymphknotenbiopsie bestimmt. Es kann aber auch erforderlich sein, auf der Tumorseite die Lymphknoten aus der Achselhöhle herauszunehmen und anschließend vom Pathologen untersuchen zu lassen.

**M-Stadium:** Brustkrebs kann in verschiedene Organe wie Skelett, die Leber, die Lunge, sowie das zentrale Nervensystem metastasieren. Je nach Organ werden verschiedene Nachweisverfahren eingesetzt. Um Metastasen im Skelett zu erkennen, wird die Skelettszintigraphie eingesetzt, für Lebermetastasen die Computertomographie (CT) und der Ultraschall, für Lungenmetastasen ebenfalls CT, sowie beim zentralen Nervensystem die Magnetresonanztomographie (MRT).

Basierend auf der TNM-Klassifikation wird die Brustkrebserkrankung nach Vorgaben der internationalen Vereinigung UICC (Union Internationale Contre le Cancer) in vier Stadien eingeteilt (Tab. 1). Diese Stadien dienen als Orientierung bei der Behandlung des Tumors.

**Tab. 1:** Anatomische Stadieneinteilung beim Brustkrebs nach UICC.

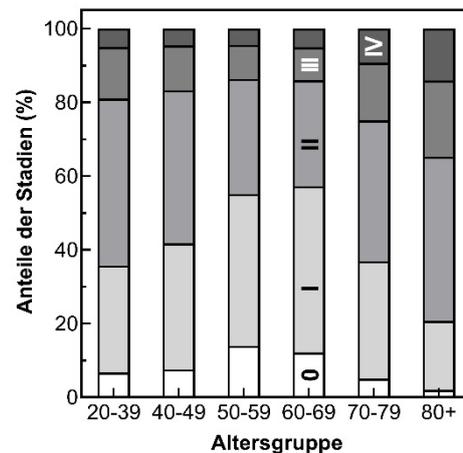
Primärtumor	Lymphknotenbefall	Fernmetastasierung	Stadium
Tis*	N0 (keine)	M0	0
T1mic**	N0	M0	I
T1a (1 – 5 mm)	N0	M0	
T1b (6 – 10 mm)	N0	M0	
T1c (11 – 20 mm)	N0	M0	
T0, T1mic, T1	N1 (1-3 LK in der Axilla und/oder der ipsilateralen Mammaria-Interna-Region)	M0	IIA
T2 (21- 50 mm)	N0	M0	
T2	N1	M0	IIB
T3 (≥51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

\*Tis: Tumor in situ, noch nicht ins umliegende Gewebe eingedrungen; \*\*T1mic: Tumor mit Mikroinvasion von 0,1cm oder weniger;

Der Anteil der Stadien variiert etwas mit dem Alter der Frauen (Abb. 2). Der Anteil der Stadien 0 und I ist in den Altersgruppen 50-59 und 60-69 Jahre mit ca. 12-13 bzw. 55-57% am höchsten. Bei sehr jungen Frauen (20-39 Jahre) und bei Frauen im hohen Alter (70-79, 80+) wird im Vergleich zu den Frauen im mittleren Alter (50-59, 60-69) deutlich häufiger ein Stadium II und III diagnostiziert (Katalinic et al. 2020).

### 1.1.3 Biomarker

Für Brustkrebs gibt es eine Reihe von sogenannten Biomarkern, die eine weitere Differenzierung der Erkrankung erlauben. Viele dieser Marker haben eine prädiktive bzw. prognostische Aussagekraft. Dabei ermöglicht ein prädiktiver Marker eine Aussage über die Wahrscheinlichkeit, mit der eine bestimmte Therapie bei einer Patientin wirksam ist, während prognostische Marker Hinweise liefern auf den zu erwartenden individuellen Verlauf der Erkrankung.



**Abb. 2: UICC-Stadien beim Brustkrebs.**

Verteilung der UICC-Stadien in Europa für Brustkrebs bei Frauen in Abhängigkeit vom Alter für die Jahre 2013/14. Daten nach (Katalinic et al. 2020).

**Histologischer Grad:** Der histologische Grad des Tumors wird anhand von morphologischen Eigenschaften bestimmt. Hierbei wird die tubuläre Differenzierung, die Zellkernpolymorphie sowie die Mitoseanzahl bewertet. Sie gibt Hinweise auf die Wachstumsgeschwindigkeit und die Aggressivität des Tumors. Beim Grad 1 (gut differenziert) unterscheiden sich die Tumorzellen nur wenig von den normalen Brustzellen. Sie wachsen langsam und sind weiterhin regelmäßig angeordnet. Beim Grad 2 (mäßig differenziert) weichen die Tumorzellen in ihrem Erscheinungsbild erkennbar von den normalen Zellen ab und haben eine leicht erhöhte Teilungsaktivität. Beim Grad 3 (schlecht differenziert) unterscheiden sich die Tumorzellen deutlich von den normalen Zellen. Sie wachsen schnell und in unstrukturierter Weise. Je höher der Grad des Tumors desto schlechter ist die Prognose (Bagaria et al. 2014).

**Hormonrezeptoren:** Brustkrebszellen entstehen in der Regel aus Brustdrüsenzellen. Sie verfügen daher wie diese Rezeptoren für die weiblichen Hormone Östrogen (engl. estrogene) und Progesteron, über die ihr Wachstum gesteuert wird. Allerdings kann ihre Expression deutlich reduziert sein. Der Nachweis erfolgt mittels Immunhistochemie. Zeigen mindestens 10% der Tumorzellen eine erkennbare Färbung, so gilt der Tumor als ER bzw. PR-positiv. Dies ist bezgl. ER bei etwa 70-80 und für PR bei 50-60% aller Brustkrebspatientinnen der Fall (Althuis et al. 2004). Für diese Tumore ist im Mittel die Prognose deutlich besser als für Tumore mit einem ER bzw. PR-negativen Status (Dunnwald et al. 2007).

**Her2-Rezeptor:** Der Rezeptor für den humanen epidermalen Wachstumsfaktor Her2 (*human epidermal growth factor receptor-2*) stimuliert über den Ras-MAP-Kinase-Signalweg die Proliferation. Bei etwa 20% der Brustkrebspatientinnen liegt eine erhöhte Expression dieses Rezeptors vor, was mit einer schlechten Prognose einhergeht (Tovey et al. 2009).

**Triple-negativ:** Bei einem triple-negativen Brustkrebs (TNBC) liegt ein negativer Status

sowohl für ER und PR vor als auch für Her2. Die Prognose für diese Patientinnen ist sehr schlecht (Bagaria et al. 2014).

**Ki-67:** Ki-67 ist ein nukleäres Protein, welches mit der Proliferation assoziiert ist. Es dient als Proliferationsmarker, wobei eine hohe Expression von Ki-67 mit einer schlechten Prognose einhergeht (Yerushalmi et al. 2010).

**Molekulare Subtypen:** Mittels einer molekulargenetischen Analyse ist für den Brustkrebs eine Aufteilung in weitere Subtypen möglich. Da diese Untersuchung sehr aufwändig ist, erfolgt in der Regel eine alternative Klassifikation mittels des HER2-Status, des ER und PR-Status sowie des Proliferationsmarkers KI-67 (Wörmann et al. 2018).

**Tab. 2:** Molekulare Subtypen beim Brustkrebs

Molekularer Subtyp	Subgruppe	Definition/Surrogatmarker
Luminal-A		ER und PR positiv Her2 negativ Ki67 negativ
Luminal-B	Her2 negativ	ER positiv und PR negativ oder Ki-67 positiv
	Her2 positiv	ER positiv Her2 überexprimiert/amplifiziert Ki-67 niedrig oder hoch
Her2-enriched		Her2 überexprimiert/amplifiziert ER und PR negativ
Basal-like *		ER und PR negativ Her2 negativ

\* entspricht weitgehend dem *triple* negativen Brustkrebs (TNBC);

Die Prognose von *Luminal-A* Brustkrebs ist sehr gut. *Luminal-B* Tumoren sind weniger differenziert, haben eine erhöhte Proliferationsrate als *Luminal-A* Tumoren und eine etwas schlechtere Prognose; Tumoren des *Her2-enriched* Subtypes sind in der Regel sehr aggressiv mit einer sehr schlechten Prognose (Llombart-Cussac et al. 2017). *Basal-like* Brusttumore sind wenig differenziert, aggressiv und haben die schlechteste Prognose (Fulford et al. 2007).

#### 1.1.4 Brustkrebs bei jungen Frauen

Bezüglich der Marker zeigt sich ein deutlicher Unterschied zwischen dem Brustkrebs bei jungen Frauen < 40 Jahre und dem der älteren. Bei dem *EOBC* wird in Deutschland bis zu 15 bzw. 5% häufiger das Stadium II und III diagnostiziert als für den späten Brustkrebs (RKI 2019). Ähnliche Unterschiede zeigen sich auch für die USA (Johnson et al. 2018). Beim *EOBC* ist der Anteil mit einem negativen Status für ER und PR etwa 5 bzw. 10% höher als bei älteren Patientinnen (Anders et al. 2008, Azim et al. 2012, Erić et al. 2018). Der Anteil der Her2-positiven Tumore ist beim *EOBC* doppelt so hoch wie bei den älteren Patientinnen (Anders et al. 2008). Auch der Anteil der TNBC ist beim *EOBC* mit 18-32% 2-3mal höher als bei den

älteren Frauen mit nur 9-10% (Acheampong et al. 2020, Erić et al. 2018). Bei sehr jungen Frauen < 35 Jahren ist dieser Anteil wahrscheinlich noch höher (Lund et al. 2009). Diese Unterschiede haben insgesamt zur Folge, dass die Prognose für den *EOBC* wesentlich schlechter ist als bei den älteren Patientinnen (Laurberg et al. 2016, Tao et al. 2019).

### 1.1.5 Therapie

Bei der Therapie von Brustkrebs werden sowohl die Chirurgie, sowie die Strahlentherapie als auch verschiedene systemische Therapien eingesetzt bzw. miteinander kombiniert. Die konkrete Therapie richtet sich jeweils nach dem anatomischen Stadium der Erkrankung sowie den molekularen Markern des Tumors. In einer kurativen Situation erfolgt beim Brustkrebs in der Regel eine Operation. Bei fortgeschrittenen Tumoren kommt sehr häufig die Strahlentherapie zum Einsatz. Systemische Therapien wie Chemotherapie, Antihormontherapie und zielgerichtete Therapien kommen zum Einsatz, wenn auch im Körper verstreute Tumorzellen sowie Metastasen vermutet werden. Die Wahl der Therapie für den jeweiligen Tumor wird durch die sogenannte S3-Richtlinie der Deutschen Krebsgesellschaft festgelegt.

**Chirurgie:** Bei der chirurgischen Therapie ist zwischen der vollständigen Entfernung der Brust (Mastektomie) und einer brusterhaltenden Therapie (BET) zu unterscheiden. Bei der BET werden das Tumorgewebe sowie eventuell befallene Lymphknoten entfernt. Hierbei wird zur Sicherheit mehr Gewebe entnommen als nur den Tumor, damit keine vereinzelt Tumorzellen zurückbleiben. Eine Mastektomie wird nur bei Vorlage bestimmter Kriterien durchgeführt. Dies ist u.a. der Fall, wenn der Tumor sehr groß und sogar die äußere Haut betroffen ist, mehrere Tumorherde vorliegen, Tumorreste einer vorhergehenden Operation entdeckt werden und bei Wunsch der Patientin.

**Strahlentherapie:** Bei der Strahlentherapie erfolgt die Abtötung der Tumorzellen durch den zielgerichteten Einsatz von Photonenstrahlen. Durch die ionisierenden Strahlen wird die DNA der Tumorzellen geschädigt. Insbesondere durch die Erzeugung von DNA-Doppelstrangbrüchen (DSB) kann es zur Bildung von letalen Schäden wie Chromosomenaberrationen kommen, durch die die Zelle letztendlich ihr Teilungsvermögen verliert und danach nekrotisch und z.T. auch apoptotisch abgebaut wird (Dikomey et al. 2012). Durch besondere und z.T. hoch komplexe Anordnungen wird erreicht, dass vor allem Tumorzellen und nur wenig Normalzellen bestrahlt werden (Ghiam et al. 2014).

Die Strahlentherapie wird vor allem als adjuvante Behandlung nach BET eingesetzt. Durch diese Kombination kann die Zahl der Rezidive halbiert und die Mortalität um etwa ein Sechstel reduziert werden (Darby et al. 2011). Durch eine hypofraktionierte Bestrahlung, bei der höhere Einzeldosen gegeben werden als bei der klassischen Fraktionierung, können die Nebenwirkungen der Strahlentherapie weiter reduziert werden (Officersen et al. 2020). Neben

der konventionellen Strahlentherapie kann auch eine Brachytherapie (Hepel et al. 2021) oder die intraoperative Strahlentherapie (Feng et al. 2020) bei der adjuvanten Behandlung von Brustkrebs eingesetzt werden.

**Systemische Therapie:** Die systemische Therapie kommt beim Brustkrebs immer dann zum Einsatz, wenn davon ausgegangen werden muss, dass neben dem Primärtumor auch versprengte Tumorzellen oder Metastasen vorliegen.

Bei der klassischen Chemotherapie erhalten die Patienten einen jeweils abgestimmten Mix aus bis zu 20 Zytostatika wie u.a. Epirubin, Mitoxantron, Adriamycin, Cyclophosphamid, Methotrexat, 5-Fluoracil, Taxol und Cisplatin. Hierdurch kann die Rezidivrate bis zu 30% reduziert werden, was aber mit z.T. beachtliche Nebenwirkungen einhergeht (Matuschek et al. 2012, Peto et al. 2012). Nur bei Patientinnen mit frühem Brustkrebs kann auf diese Therapie verzichtet werden. In allen anderen Fällen soll durch eine neoadjuvante Systemtherapie die Tumormasse reduziert werden bzw. die verstreuten Tumorzellen abgetötet werden. Im späten Stadium der Erkrankung mit Fernmetastasen wird die systemische Therapie als Teil eines palliativen Behandlungskonzept eingesetzt.

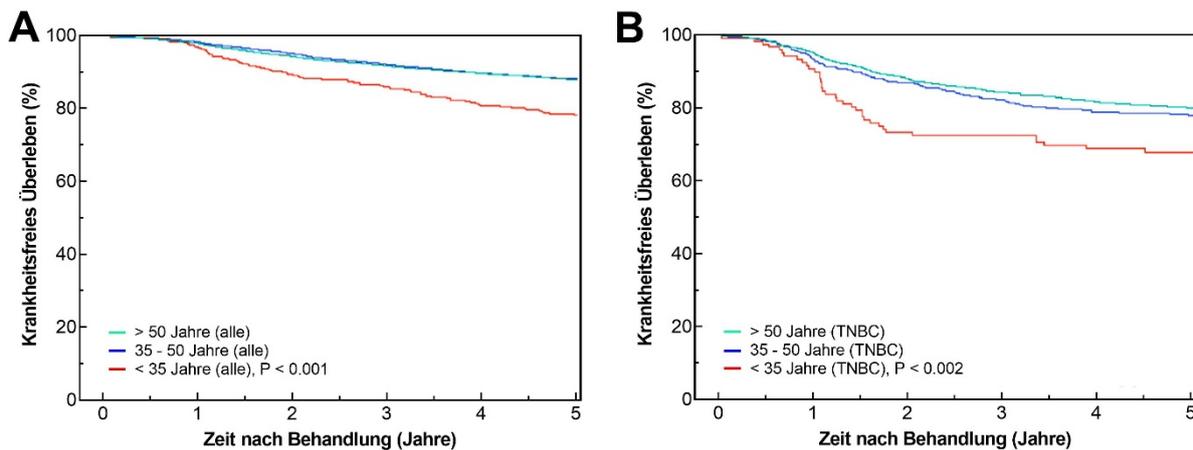
Anhand der zur Verfügung stehenden molekularen Biomarker stehen weitere Therapien zur Verfügung. Patientinnen mit ER- und/oder PR-positiven Tumoren können sehr effektiv mittels Hormontherapien behandelt werden (Darby et al. 2011, Puhalla et al. 2012). Bei postmenopausalen Patientinnen können durch Östrogenrezeptormodulatoren und Aromatasehemmer die Rezidivrate reduziert werden (Ruhstaller et al. 2019).

Patientinnen mit einem Her2-positiven Tumor können durch eine gezielte Therapie (*targeted therapy*) mit dem monoklonalen anti-Her2-Antikörper Trastuzumab behandelt werden mit einer deutlichen Reduktion in der Rezidivrate (Paracha et al. 2020, Peto et al. 2012). Für Patientinnen mit einem triple-negativen Brusttumor, bzw. mit dem *basal-like* Subtyp, gibt es bislang wegen des Fehlens von Hormonrezeptoren sowie der großen Heterogenität dieser Tumore keinen gezielten Therapieansatz. Die Behandlung dieser Tumore erfolgt daher mittels Chirurgie und Strahlentherapie sowie einer adjuvanten oder primären Chemotherapie mit Anthrazyklinen, Taxanen oder einem plantinhaltigen Zytostatikum mit allerdings bisher sehr begrenztem Erfolg (Isakoff 2010, Li et al. 2021).

#### 1.1.6 Heilungsschancen

Die Heilungsschancen für Brustkrebs haben sich in den letzten Jahrzehnten aufgrund der Weiterentwicklung in allen Therapiebereichen kontinuierlich verbessert. Aktuell liegt die 5-Jahresüberlebensrate für alle Frauen bei 88 und der Wert für die 10-Jahresüberlebensrate bei 82% (RKI 2019). Diese Rate hängt stark vom Stadium der Brustkrebserkrankung ab. Während beim Stadium I die 5-Jahres-Überlebensrate den Wert von 100% erreicht, nimmt sie mit

höheren Stadien deutlich ab und liegt beim Stadium IV bei nur 29%. Im Mittel nimmt in Deutschland die altersstandardisierte Mortalitätsrate in den letzten 20 Jahren kontinuierlich ab. Lag sie 1999 noch bei 28,3 pro 100.000 Frauen, so betrug sie 2016 nur noch 25,4, was einer Abnahme um 10% in diesem kurzen Zeitraum entspricht (RKI 2019). Trotz dieser beeindruckenden Entwicklung sterben jährlich immer noch ca. 18.500 Frauen an Brustkrebs. Brustkrebs ist damit nach Lungenkrebs die zweithäufigste Krebstodesursache.



**Abb. 3: Altersabhängige Prognose von Brustkrebs-Patientinnen.**

Krankheitsfreies Überleben von Brustkrebspatientinnen in Japan in Abhängigkeit vom Alter für den Behandlungszeitraum 2004–2006. Aufteilung in die drei Altersgruppen < 35 Jahre (n=736), 35-50 Jahre (n=6.905), und >50 Jahre (n=17.661). A) jeweils alle Brustkrebspatientinnen; B) nur die Brustkrebspatientinnen mit TNBC. Daten aus (Kataoka et al. 2016).

Im Vergleich zu älteren Frauen wird für Frauen mit einem frühen Brustkrebs ein etwas geringeres Überleben beobachtet, wie insbesondere durch eine große japanische Studie gezeigt (Kataoka et al. 2016). In dieser Studie lag die 5-Jahres-Überlebensrate für Frauen im mittleren (35-50 Jahre) und höheren Alter (>50 Jahre) bei 90,8 bzw. bei 88,5%, während sich für jüngere (<35 Jahre) Frauen ein Wert von 79,4% ergab (Abb. 3A). Auch für Deutschland zeigt sich dieser Unterschied (RKI 2019). In der japanischen Studie wurde außerdem die sehr wichtige Beobachtung gemacht, dass das geringere Überleben der jüngeren Frauen nicht allein darauf zurückzuführen werden kann, dass sich in dieser Gruppe vermehrt Patientinnen mit schlechten prognostischen Markern befinden. Auch bei getrennter Betrachtung allein der TNBC-Patientinnen ergab sich für die jüngeren Patientinnen ein signifikant schlechteres Überleben mit einer 5-Jahresüberlebensrate von 68% im Vergleich zu 78 und 89% (Abb. 3B). Dies bedeutet, dass der *EOBC* sich durch eine größere Therapieresistenz auszeichnet, wofür die molekularen Ursachen bisher noch unbekannt sind.

## 1.2 Entstehung von Brustkrebs

Wie bei allen Krebserkrankungen erfolgt auch die Entstehung von Brustkrebs in einem Multistep-Prozess (Hanahan und Weinberg 2000). In der ersten Phase (Initiation) kommt es

durch verschiedene Faktoren zu einer Störung bei der Zellteilung. Ursache dafür sind Veränderungen in der DNA, die eine genomische Instabilität bewirken mit insbesondere Folgen für das Zellwachstum und die Zellproliferation. Es entsteht eine mutierte Zelle, die in der zweiten Phase (Promotion) die Fähigkeit für ein unkontrolliertes Wachstum gewinnt. In der dritten Phase (Progression) sind diese Zellen in der Lage, sich stetig zu teilen und das umliegende gesunde Gewebe zu verdrängen und einen Tumor zu bilden.

Als epidemiologisch gesichert für die Entstehung des Mammakarzinoms gelten Risikofaktoren wie das Alter, frühe Menarche bzw. späte Menopause, Kinderlosigkeit bzw. späte Erstgeburt, Übergewicht, gutartige und atypische Hyperplasie, Hormone, benigne Brusterkrankung sowie Malignome im Uterus, Ovar oder Darm, sowie familiäre und genetische Faktoren (Althuis et al. 2004, Lofterød et al. 2020, Momenimovahed und Salehiniya 2019, Narod 2012).

Der Anteil der genetisch bedingten Brustkrebserkrankungen wird auf 5-10% geschätzt (Slavin et al. 2017, Wendt und Margolin 2019). Bei etwa 15-20% der Frauen liegt ein familiär bedingter Brustkrebs vor, bei dem ebenfalls mehr als eine Verwandte ersten oder zweiten Grades an Brustkrebs erkrankt ist (Wendt und Margolin 2019). Es wird geschätzt, dass der familiäre Brustkrebs zu ca. 70% durch genetische Faktoren verursacht wird (Couto und Hemminki 2007).

Beim *EOBC* wird die Bedeutung der genetisch bedingten Erkrankungen mit einem Anteil von 10-20% deutlich höher eingeschätzt (Siddig et al. 2021). Liegt ein familiärer Brustkrebs bei jungen Frauen <40 Jahre vor, so wird davon ausgegangen, dass sogar zu 100% genetische Faktoren dafür verantwortlich sind (Couto und Hemminki 2007).

### **1.3 Genomische Instabilität**

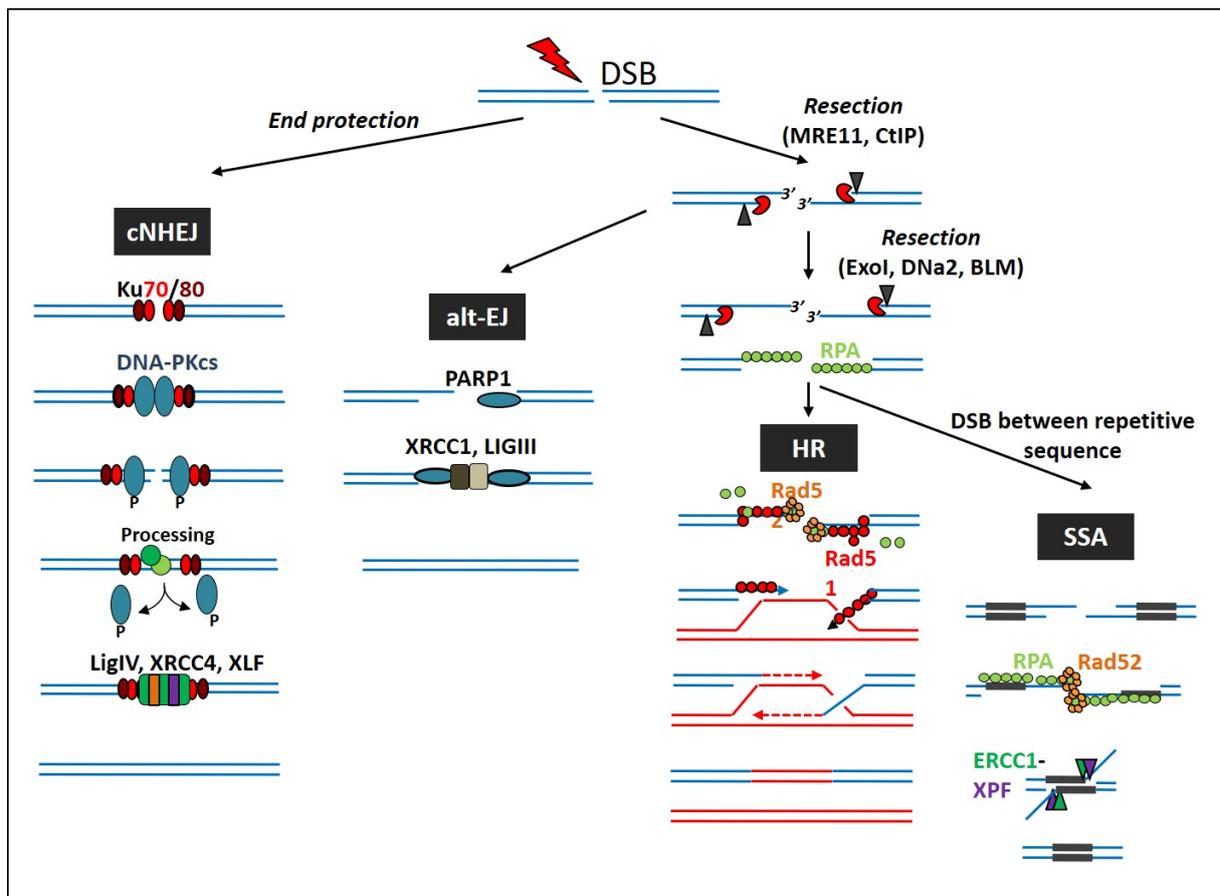
Genomische Instabilität ist eine Eigenschaft von fast allen Tumoren und beschreibt die zunehmende Akkumulation von genetischen und chromosomalen Veränderungen, die die Entstehung und die Progression des Tumors vorantreiben (Lee et al. 2016). Ursache für diese genomische Instabilität sind vor allem Defekte bei den DNA-Reparaturprozessen und da insbesondere bei der DNA-Doppelstrangbruchreparatur, Defekten bei der DNA-Replikation sowie bei der DNA-Schadensantwort und der Zellzykluskontrolle (Schoonen et al. 2018).

#### **1.3.1 DNA-Doppelstrangbruchreparatur**

Die Stabilität des Genoms wird vor allem durch das Entstehen von DNA-Doppelstrangbrüchen (DSB) gefährdet. Diese Schäden können spontan in der Zelle entstehen über metabolische Reaktionen, Topoisomerasen sowie Replikationsstress (Mehta und Haber 2014, Vilenchik und Knudson 2003). Die Zelle verfügt daher über ein komplexes System, DSB

zu erkennen und zu beseitigen. Die beiden wichtigsten Reparaturwege hierbei sind die klassische Nicht-homologe Endverknüpfung (engl. *classical non-homologous endjoining*, cNHEJ) und die homologe Rekombination (HR) (Borgmann et al. 2016, Rothkamm et al. 2003). Tumorzellen können mit der alternativen Endverknüpfung (engl. *alternative endjoining*, alt-EJ) sowie dem ‚single-strand-annealing‘ (SSA) noch zwei weitere DSB-Reparaturprozesse genutzt werden (Kötter et al. 2014, Mansour et al. 2013, Mansour et al. 2010, Mansour et al. 2008). Abb. 4 zeigt die vereinfachten Abläufe dieser Reparaturprozesse (Dikomey et al. 2016).

**cNHEJ:** Das cNHEJ ist ein sehr effektiver, aber fehlerhafter Prozess, der in allen Zellzyklusphase aktiv ist und für die Reparatur des DSB kein Template benötigt. Die Stabilisierung der DSB-Enden erfolgt über das Heterodimer Ku70/80. Es rekrutiert die DNA-PKcs, welche durch Autophosphorylierung den aktiven DNA-PK-Komplex bildet. Dieser Komplex wiederum stimuliert die Nuklease Artemis, die für die Verarbeitung der DSB-Enden verantwortlich ist, wodurch es zum Verlust von Nukleotiden kommen kann. Die anschließende Ligation des DSB wird durch den Komplex bestehend aus XRCC4, DNA-Ligase IV und XLF



**Abb. 4: Hauptwege der DNA-Doppelstrangbruchreparatur in Säugerzellen**

Schematische Darstellung der Reparatur der DSB mittels klassischem nicht-homologen End-joining (cNHEJ) oder mittels homologer Rekombination (HR). Abb. aus (Dikomey et al. 2016).

geleistet. Bei diesem Reparaturprozess können sowohl Deletionen als auch Insertionen entstehen.

**alt-EJ:** Beim alt-EJ werden die DSB-Enden nach Prozessierung durch MRE-Nuklease durch die poly(ADP Ribose) Polymerase 1 (PARP1) erkannt. PARP1 rekrutiert Lig3 und seinen Ko-Faktor XRCC1. Die abschließende Endverknüpfung wird durch die Ligase III (LigIII) geleistet. Dieser Prozess ist ebenfalls sehr fehlerhaft und kann zu Deletionen sowie Insertionen führen.

**HR:** Die HR ist ein fehlerfreier Prozess. Er kann nur in der S-/G2-Phase des Zellzyklus aktiv sein, da für die Reparatur das jeweils gegenüberliegende intakte Schwesterchromatid benötigt wird (Abb. 4). Die HR wird durch Rekrutierung des MRN-Komplexes (MRE11, RAD50, NBS1) initiiert. Dieser Komplex prozessiert zusammen mit CtIP (*C-terminal binding protein*) sowie der EXO1 (Exonuclease 1) und dem BLM (Bloomsyndrom-Protein) die DNA-Enden, so dass lange, überhängende 3'-Einzelstrang-DNA (*single strand DNA*, ssDNA) entsteht. Diese ssDNA wird durch das Heterotrimer RPA (Replikationsprotein A) stabilisiert. RPA wird anschließend durch BRCA2 (Brustkrebsgen 2) entfernt, um die Anlagerung von Rad51 zu ermöglichen. Rad51 bildet Nukleoproteinfilamente und leitet die Suche der homologen Sequenz auf dem Schwesterchromatid ein. BRCA2 bewirkt mit Unterstützung von PALB2 (Partner und *localizer* von BRCA2) die Strandinvasion mit Bildung des sogenannten *D-loops*. Hieran ist auch der Komplex aus BRCA1 und BARD1 (BRCA1 assoziiertes RING-Domäne Protein) beteiligt. Beginnend vom 3'-Ende des homologen Strangs erfolgt eine Neusynthese der DNA. Die beiden DNA-Stränge zusammen mit ihren Matrizen bilden eine doppelte *Holliday junction*. Diese Struktur ist im letzten Schritt der HR aufzulösen, was in somatischen Zellen in der Regel durch das konservative SDSA geschieht (Synthese-abhängiges *strand annealing*), welches keinen Austausch von Sequenzen (non-crossover) beinhaltet. Weitere mögliche Strukturen sind das LTGC (*long-tract gene conversion*) und BIR (*break-induced replication*). Bei Defekten der HR weichen die Zellen auf das fehlerhafte cNHEJ aus, oder nutzen einen das alternative Endjoining (altEJ), welches ebenfalls sehr fehlerhaft ist (Mansour et al. 2010).

**SSA:** Das SSA wird initiiert, wenn ein DSB zwischen zwei repetitiven Sequenzen liegt. Ähnlich wie beim HR werden die Enden so prozessiert, dass lange 3'-ssDNA-Überhänge entstehen, die dann durch RPA geschützt werden. Das zentrale Protein des SSA ist RAD52. Es bildet zwei Ringstrukturen, die nach repetitiven Sequenzen suchen und sich damit verbinden. Nach dem Verbinden werden die überhängenden Enden durch die ERCC1/XPF-Endonuklease entfernt. Die finale Verknüpfung erfolgt durch eine Ligase. Dieser Reparaturprozess ist somit immer mit einem Verlust an langen DNA-Strängen verbunden.

### 1.3.2 Regulation der DSB-Reparatur

Die Doppelstrangbruchreparatur ist in den Zellen streng hierarchisch geregelt (Mansour

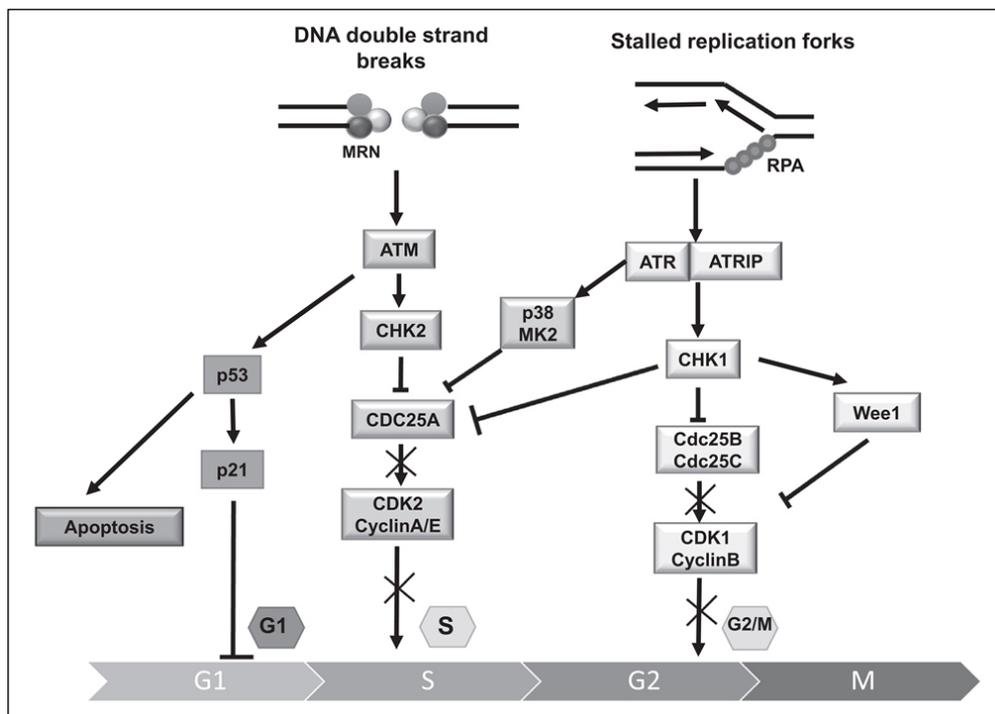
et al. 2008). Der Hauptreparaturweg ist das cNHEJ. Lediglich in der S- und der G2-Phase erfolgt auch eine Reparatur über die HR (Rothkamm et al. 2003). Dieser Reparaturweg ist vor allem für die bei der Replikation entstehenden sogenannten *one-ended*-DSB zuständig, die durch das Zusammentreffen von Einzelstrangbrüchen mit der Replikationsgabeln entstehen (Kockler et al. 2021).

Bei einem Defekt oder Inhibition der HR weichen die Zellen auf andere Reparaturwege aus. Dies kann das cNHEJ aber in Tumorzellen auch das alt-EJ oder das SSA sein (Kötter et al. 2014, Mansour et al. 2013, Mansour et al. 2010, Mansour et al. 2008). Ein Ausfall des HR bedeutet damit immer, dass andere z.T. sehr fehlerhafte DSB-Reparaturwege genutzt werden. Damit ist ein Ausfall des HR immer mit dem Risiko einer genomischen Instabilität verbunden.

### 1.3.3 Zellzykluskontrolle

Zellen verfügen über ein sehr komplexes System der Zellzykluskontrolle mit insbesondere zwei Kontrollpunkten (engl. *check point*) beim G1/S- sowie G2/M-Übergang (Kastan und Bartek 2004). Diese Kontrollpunkte bewirken, dass Zellen mit DNA-Schäden an den jeweiligen Übergängen arretiert werden. Der G1/S-Kontrollpunkt verhindert, dass Zellen in die S-Phase eintreten und der G2/M-Kontrollpunkt den Eintritt in die Mitose.

Die PI3K-ähnlichen Kinasen ATM (*Ataxia Telangiectasia Mutated*) und ATR (*Ataxia telangiectasia and Rad3 related*) sind zentrale Komponenten der DNA-Schadensantwort und



**Abb. 5: Zellzykluskontrolle mit ATM/CHK2 und ATR/CHK1**

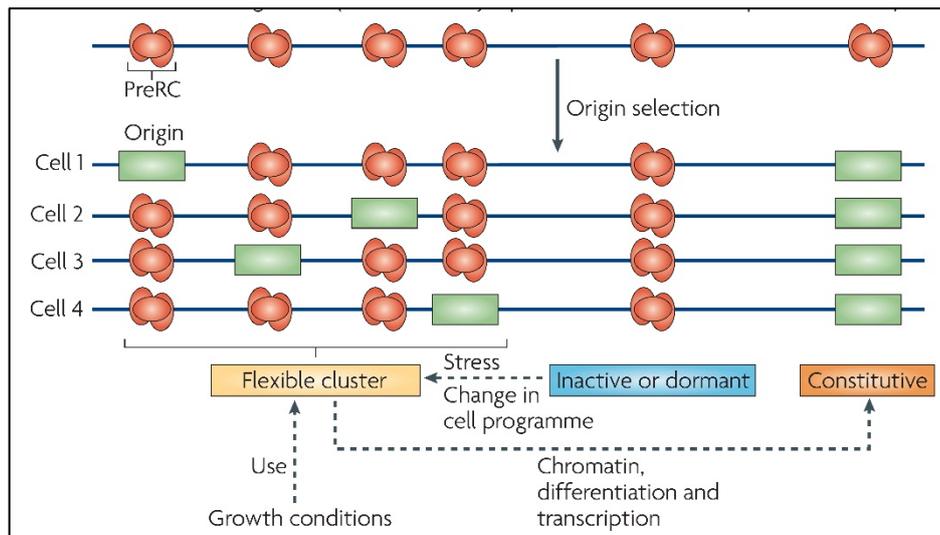
Übersicht der bei DNA-Schädigung induzierten Signalwege durch ATM/CHK2 und ATR/CHK1. Abb. aus (Qiu et al. 2018).

der Zellzykluskontrolle (Abb. 5). Sie phosphorylieren und aktivieren die Checkpoint-Kinasen CHK2 bzw. CHK1. Die aktiven Kinasen unterdrücken die CDC25 Phosphatase, welche für die Aktivierung der Cyclin-abhängigen Kinasen (CDKs) und damit für die Zellprogression benötigt wird. ATM wird durch DNA-Schäden und insbesondere durch DSB aktiviert, während die Aktivierung von ATR durch längere einzelsträngige mit RPA belegte DNA erfolgt (Kastan und Bartek 2004). Daher ist die ATM/Chk2-Aktivierung für den G1/S-Arrest verantwortlich und ATR/CHK1 für den G2/M-Arrest. Die ATM/CHK2-Aktivierung führt wiederum zu einer Aktivierung des Tumorsuppressorproteins TP53, was eine Induktion des CDK-Inhibitors p21 bewirkt. Da in sehr vielen Tumorzellen mutiertes TP53 vorliegt, sind diese Zellen auf einen intakten ATR/CHK1 vermittelten G2/M-Arrest angewiesen, um bei geschädigter DNA einen Eintritt in die Mitose zu verhindern. Längere Stränge mit ssDNA entstehen bei der Reparatur von DSB mittels HR sowie vor allem bei Störung der Replikation (Maréchal und Zou 2013). Daher ist der ATR/CHK2-Signalweg der zentrale Signalweg bei der Replikation und ganz wesentlich für die Intaktheit dieses Prozesses verantwortlich. Dies gilt insbesondere, wenn die Zellen durch Onkogene in die Proliferation und damit in die Replikation getrieben werden (Lecona und Fernández-Capetillo 2014, Qiu et al. 2018).

#### 1.3.4 DNA-Replikation

Während der Replikation in der S-Phase wird die gesamte DNA der Zelle verdoppelt. Dieser Prozess muss fehlerfrei sein, damit die genomische Stabilität der Zelle erhalten bleibt (Jackson und Pombo 1998). Um dies zu garantieren, bestehen komplexe Schutzmechanismen.

Die Replikation der DNA wird in drei Abschnitte Initiation, Progression und Termination unterteilt. Die Initiation der Replikation startet durch die Bildung des sogenannten Prä-Replikationskomplexes (preRC). Wenn dieser am Replikationsursprung zusammengefügt wurde, kann die Replikation starten, was auch als Feuern (engl. *firing*) bezeichnet wird. Dies erfordert eine komplexe Interaktion von vielen Proteinen mit der Erkennung der Replikationsursprünge, dem Entwinden der DNA und dem Start der Synthese (Primo und Teixeira 2019). Die anschließende Progression beschreibt die bidirektionale Elongation der Replikationsgabeln. Hieran sind unterschiedliche DNA-Polymerasen beteiligt, die jeweils einzelsträngige DNA (ssDNA) benötigen, um den komplementären DNA-Strang zu synthetisieren. Dabei gibt es einen kontinuierlichen Strang (engl. *leading strand*), der mit der Replikationsgabel voranschreitet, sowie den diskontinuierlichen Strang (engl. *lagging strand*) durch die Erzeugung der kurzen Okazakifragmente (Masai et al. 2010). Die Termination beschreibt die Abläufe beim Beenden der Replikation, wenn die konvergierenden Replikationsgabeln aufeinander treffen (Ait Saada et al. 2018).



### Abb. 6: Organisation der DNA-Replikationsursprünge in Säugerzellen

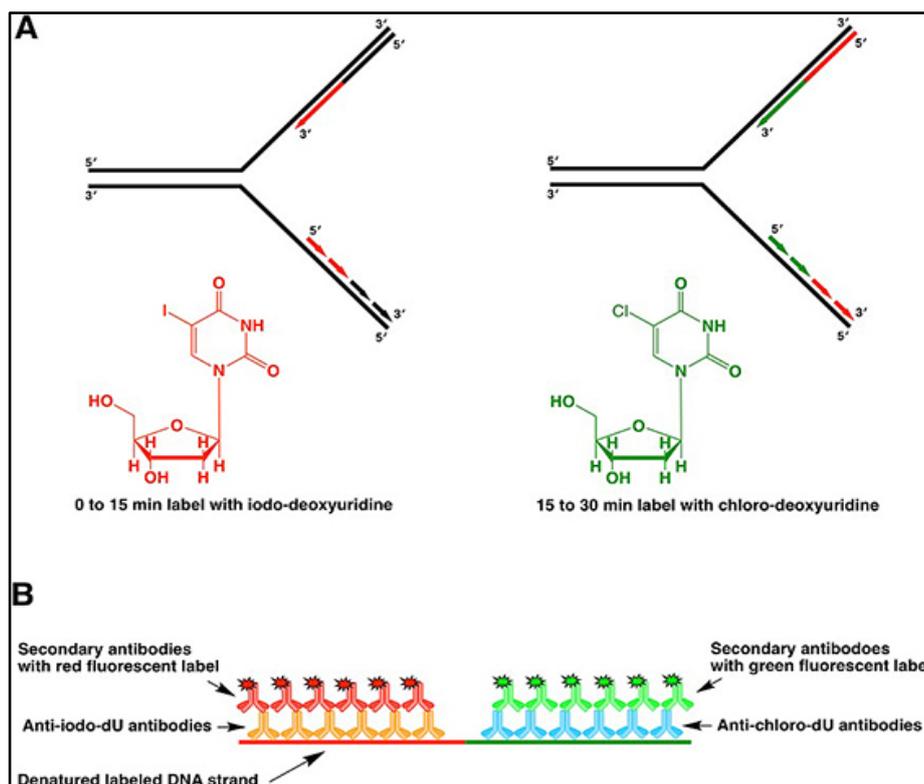
Zellen verfügen über flexible Cluster, inaktive und ruhende (engl. *dormant*) sowie konstitutive Replikationsursprünge (Méchali 2010).

Die Initiation startet an genau definierten Replikationsursprüngen, wobei die Reihenfolge räumlich und zeitlich streng reguliert ist (Técher et al. 2017). Es existieren 30.000 bis 50.000 Replikationsursprünge, wobei nur ein kleiner Anteil, etwa 10-15.000 von der Zelle genutzt wird (Méchali 2010). Es wird daher zwischen flexiblen, ruhenden und konstitutiven Replikationsursprüngen unterschieden (Abb. 6). Die Anhäufung flexibler Replikationsursprünge enthalten Origins, die in verschiedenen Zellen unterschiedlich genutzt werden. Ihre Verwendung kann je nach Wachstumsbedingung der Zelle zu- oder abnehmen. Inaktive oder ruhende Replikationsursprünge werden bei einer normal ablaufenden Replikation selten oder nie genutzt, können aber bei einer Störung aktiviert werden. Konstitutive Origins sind fest im Chromatin verankert (Méchali 2010).

Für den Erhalt der genomischen Stabilität ist eine genau abgestimmte Replikation erforderlich. Ein übermäßiges Feuern von Origins kann eine Erschöpfung der Replikationsfaktoren bewirken und damit zum Abbruch führen (Poli et al. 2012). Im Gegensatz dazu kann eine Verlangsamung der Elongation die Konsequenz haben, dass ein zusätzliches Starten von Replikationsgabeln erforderlich ist, damit ein zeitgerechter Abschluss der Genomverdopplung vor dem Eintritt der Zellen in die Mitose erreicht wird (Ait Saada et al. 2018).

#### 1.3.5 Nachweis der DNA-Replikation mit Fiber Assay

Mit dem sogenannten DNA-Fiber Assay, wie er u.a. von Jackson und Pombo (Jackson und Pombo 1998) sowie Petermann (Petermann et al. 2006) entwickelt wurde, kann die



### Abb. 7: Nachweis der DNA-Replikation mit dem DNA-Fiber Assay

Markierung der neu-synthetisierten DNA durch Einbau der Thymidinanaloga wie Iododesoxyuridin (IdU) und Chlordesoxyuridin (CldU). Nachweis der mit IdU und CldU markierten DNA erfolgt mittels Immunhistochemie durch Verwendung spezifischer erster und zweiter Antikörper. Graphik wurde bereitgestellt durch Dr. Carol A. Rouzer (Nashville, USA).

Initiation, Elongation und Termination der DNA-Replikation verfolgt werden (Abb. 7). Den Zellen werden dafür nacheinander für definierte Zeiten Thymidinanaloga wie das Chlordesoxyuridin (CldU) und Iododesoxyuridin (IdU) angeboten. Für den Nachweis der so markierten Stränge muss die DNA isoliert und dann mittels Immunfärbung unter Verwendung entsprechender Antikörper detektiert werden. Durch die Wahl farblich unterschiedlicher Fluoreszenz-Antikörper (typischer Weise rot und grün) können eindeutig verschiedene Replikations-Strukturen nachgewiesen werden. Hierbei kann neben der Richtung der Replikation auch bestimmt werden, mit welcher Einbaurrate die DNA verdoppelt wird, wie häufig und in welchen Abständen Replikationsursprünge initiiert werden und wie häufig Replikationsgabeln benachbarter Replikationsursprünge terminieren. Mit dem DNA-Fiber Assay können aber auch die unterschiedlichen Störungen der Replikation erfasst werden (Parplys et al. 2012, Parplys et al. 2015).

### 1.3.6 Replikationsstress

Störungen der DNA-Replikation, die auch als Replikationsstress bezeichnet werden, beinhalten ein hohes Risiko für eine genomische Instabilität. Diese Störungen können eine Verlangsamung oder sogar Stopp der DNA-Replikation beinhalten, was den Zusammenbruch

einer Replikationsgabel bewirken kann, mit der Entstehung von komplexen DNA-Schäden (Primo und Teixeira 2019). Der Replikationsstress ist damit ein sehr wichtiger, sogenannter „*Hallmark*“ und früher Treiber von Krebs (Hanahan und Weinberg 2011, Kotsantis et al. 2018, Macheret und Halazonetis 2015).

Um eine Störung bzw. sogar den Abbau von neu-synthetisierten DNA-Strängen zu vermeiden, existiert in den Zellen ein sogenannter Replikationsschutz. Insbesondere Proteine der HR besitzen diesbezüglich eine wichtige Funktion, die unabhängig von der DSB-Reparatur ist (Berti et al. 2020, Feng und Jasin 2017). So verhindert BRCA2 den Abbau der neu-synthetisierten DNA-Stränge (Schlacher et al. 2011). BRCA2-defiziente Zellen zeigen einen ausgeprägten Abbau der DNA-Stränge an angehaltenen Replikationsgabeln. Der Neustart der Replikationsgabeln ist dabei nicht beeinträchtigt (Schlacher et al. 2011). Auch andere HR-Proteine, wie RAD51 und BRCA1 sind für den Replikationsgabelschutz von Bedeutung (Rickman et al. 2020, Schlacher et al. 2011, Schlacher et al. 2012). Mit RADX besitzt RAD51 einen Gegenspieler (Dungrawala et al. 2017). Ist RADX inaktiviert, so bewirkt die unkontrollierte Aktivität von RAD51 eine Verlangsamung der Elongation und führt zu der Entstehung von DSB. In Übereinstimmung damit wird bei Überexpression von RAD51 ebenfalls eine Verlangsamung der Elongation gefunden (Parplys et al. 2015). In Tumorzellen mit defektem BRCA bewirkt eine Deletion von RADX die Wiederherstellung des Replikationsschutzes ohne aber HR zu reaktiveren (Dungrawala et al. 2017). Das Zellzyklusgen Chk1 scheint benötigt zu werden, um den unkontrolliert häufigen Start einer Replikation zu vermeiden (Syljuåsen et al. 2005).

Bei Stopp einer Replikationsgabel besteht die Gefahr, dass die ssDNA-Stränge durch Nukleasen wie MRE11 abgebaut werden (Schlacher et al. 2011). RAD51-Paraloge können diese ssDNA schützen und durch Initiierung von Neustarts den Zusammenbruch der Replikationsgabel verhindern (Somyajit et al. 2015). Auch PTEN ist am Schutz dieser ssDNA beteiligt (Rieckhoff et al. 2020).

Replikationsstress und damit eine genomische Instabilität kann im erheblichen Maße auch durch die Aktivierung von Onkogenen ausgelöst werden (Kotsantis et al. 2018, Primo und Teixeira 2019). Dies kann auf ganz unterschiedliche Weise erfolgen wie durch eine Behinderung der Initiation, der verminderten oder auch erhöhten Feuerung von Replikationsgabeln, der Verarmung an Nukleotiden, sowie durch eine Kollision der Replikation mit der Transkription und der Erzeugung von DSB (Primo und Teixeira 2019).

### 1.3.7 Genetisch bestimmter Brustkrebs

Keimbahnmutationen in Genen der homologen Rekombination, der Replikation und der Zellzykluskontrolle sind beim Brustkrebs die wichtigsten Ursachen für eine genetische

Prädisposition. Sie können zu einer Häufung an Mutationen in Zellzykluskontrollpunkten sowie Onkogenen führen, die dann eine erhöhte und aberrante Zellteilung möglich machen.

Für den frühen Brustkrebs wird davon ausgegangen, dass bis zu 20% der Erkrankungen auf Keimbahnmutationen zurückzuführen sind (Sundquist et al. 2002). Mutationen in den beiden Genen BRCA1 und BRCA2 sind dabei die wichtigsten Ursachen (Ellisen und Haber 1998).

Insgesamt werden die Mutationen, die zu einer Krebsentstehung beitragen, bezüglich ihrer Bedeutung aufgeteilt in hohe, mittlere und niedrige Penetranz basierend auf dem relativen Risiko für die jeweilige Krebserkrankung (Antoniou et al. 2014, Boonen et al. 2019, Siddig et al. 2021). Für die Entstehung von Brustkrebs sind Mutationen in BRCA1, BRCA2, TP53, PALB2, PTEN, STK11, und CDH1 von hoher Penetranz. Das Risiko im Laufe des Lebens an Brustkrebs zu erkranken (*lifetime breast cancer risk*) wird auf höher als 50% eingeschätzt. Sie werden für insgesamt 20% des erblichen bedingten Brustkrebserkrankungen verantwortlich gemacht. Mutationen in den Genen BRIP1, ATM, CHEK2 und RAD51C haben eine mittlere Penetranz. Hier beträgt das Lebenszeitrisiko an Brustkrebs zu erkranken zwischen 25 und 50%. Sie sind an etwa 5% der erblich bedingten Brustkrebserkrankungen beteiligt (De Silva et al. 2019). Weitere etwa 180 Mutationen verschiedener Gene werden für die Brustkrebsentstehung mit einem niedrigen Risiko eingestuft (Wendt und Margolin 2019) (Wendt und Margolin 2019). Für sie wurde ein Anteil von 18% an allen genetisch bedingten Brustkrebserkrankungen abgeschätzt. Zusammengenommen kann damit aktuell für Brustkrebs nur etwa die Hälfte des genetisch bedingten Risikos erklärt werden (Wendt und Margolin 2019).

Es besteht somit ein großer Bedarf, weitere Gene mit entsprechenden Mutationen bezüglich des Risikos für eine erblich bedingte Brustkrebserkrankung zu identifizieren. Hierfür sind insbesondere Untersuchungen an jungen Brustkrebspatientinnen geeignet, da hier der Anteil der erblich bedingten Erkrankungen deutlich höher ist. Dies gilt vor allem für den familiären Brustkrebs beim *EOBC*, der zu 100% auf genetische Faktoren zurückgeführt wird (Couto und Hemminki 2007).

Für den *EOBC* wurde bereits gezeigt, dass der Anteil an Erkrankungen mit Mutationen in den Genen BRCA1 und BRCA2 mit ca. 10% nahezu doppelt so hoch ist wie für alle Brustkrebserkrankungen (de Sanjosé et al. 2003). Auch für Mutationen in PTEN und TP53 werden für *EOBC* höhere Anteile gemessen (Midha et al. 2020, Phuah et al. 2012, Rogoża-Janiszewska et al. 2021). Für Mutationen im PALB2 wird unter den *EOBC* eine nahezu doppelt so hohe Häufigkeit gefunden wie für ältere Brustkrebspatientinnen (Antoniou et al. 2014). Wohingegen Mutationen beim RAD51C eher seltener beim *EOBC* vorzuliegen scheinen (Le Calvez-Kelm et al. 2012).

Insgesamt kann daher bisher nur bei einer eingeschränkten Zahl an jungen Frauen geklärt werden, ob bei ihnen das Risiko für eine erblich bedingte Brustkrebserkrankung besteht. Aktuell werden hierfür vor allem genetische Tests eingesetzt. Hierbei werden in der Regel mehrere Gene getestet mindestens aber die beiden Gene BRCA1 und BRCA2 (Couch et al. 2015). Aus den festgestellten Mutationen wird auf das Risiko für einen genetisch bedingten Brustkrebs geschlossen.

Solch eine genetische Untersuchung gibt allerdings keine Auskunft darüber, ob die jeweilig erkannten Mutationen allein oder zusammen mit anderen einen funktionellen Einfluss auf die entscheidenden Prozesse Homologe Rekombination, Zellzykluskontrolle und DNA-Replikation haben. Sinnvoll wäre daher langfristig eine Kombination aus genetischem und funktionellem Test.

Als funktioneller Test bietet sich vor allem die DNA-Replikation an, wie sie mit dem DNA-Fiber Assays erfasst werden kann. Mit der Bestimmung der verschiedenen Parameter wie u.a. der Elongationsrate, Häufigkeit für Replikationsursprünge, Abbau der neusynthetisierten DNA kann insgesamt ein ‚Gesamtbild‘ der Funktion verschiedener Gene erfasst wird, die sowohl an der HR, der Zellzykluskontrolle als auch an der Replikation beteiligt sind.

In einem ersten Schritt hinsichtlich dieser Perspektive sollten daher in einer Studie das Replikationsverhalten von jungen (< 45 Jahre) und älteren (> 60 Jahre) Brustkrebspatientinnen mit Hilfe des DNA-Fiber Assays miteinander verglichen werden.

#### **1.4 Ziel der Untersuchung**

Ziel dieser Arbeit war es, erstmalig im Rahmen einer großen Studie zu klären, inwieweit das Auftreten eines *EOBCs* mit einem Defekt in der DNA-Replikation assoziiert ist. Dafür wurde ein Kollektiv von ca. 100 Brustkrebspatientinnen mit einem Alter von <45 Jahre mit dem Verhalten eines Kollektivs von ca. 100 älteren Patientinnen mit einem Alter >60 Jahre verglichen. Den Patientinnen wurden für die Untersuchungen jeweils Blutproben entnommen und daraus Lymphozyten isoliert. Für diese Zelle wurde das Replikationsverhalten mit Hilfe des DNA-Fiber Assays bestimmt. Es sollten mit dieser Studie folgende konkrete Fragestellungen beantwortet werden:

1. Unterscheiden sich die Geschwindigkeit der Replikation von jungen und älteren Brustkrebspatientinnen?
2. Zeigen sich Unterschiede in der Aktivierung von Replikationsursprüngen in jungen und älteren Brustkrebspatientinnen?
3. Zeigen sich mögliche Unterschiede für das Gesamtkollektiv oder nur für die Extremgruppen mit besonders niedrigen oder hohen Werten?

4. Welche Beziehung besteht für diese beiden Kollektive jeweils die Elongationsrate und die Häufigkeit der Replikationsursprünge?

Basierend auf diesen Daten sollen neue Strategien für die Bestimmung des Brustkrebsrisikos bei jungen Frauen und der dann notwendigen Behandlungen entwickelt werden.

## **2. MATERIAL UND METHODEN**

### **2.1 Patientinnen**

Die Untersuchungen wurden an den aus den Blutproben der Brustkrebs-Patientinnen gewonnenen Lymphozyten durchgeführt. Dies waren ausschließlich Patientinnen des Brustzentrums der Universitätsklinik Hamburg-Eppendorf. Ein positives Votum für die Entnahme von Blutproben und die Analyse mittels des DNA-Fiberassays der Ethikkommission der Universität Hamburg lag vor (PV4694). Die Entnahme der Blutproben fand im Zeitraum September 2014 bis Oktober 2016 statt und wurde gemeinsam mit Dr. Levesque (Brustzentrum, UKE) durchgeführt.

### **2.2 Blutentnahme**

Jeder Patientin wurde im Rahmen der Eingangsuntersuchung 9 ml peripheres Blut entnommen. Das entnommene Blut wurde auf 15ml-Falconröhrchen aufgeteilt mit 2x4ml für den Fiberassay und 1x1ml für die DNA-Isolierung. Letzteres wurde für ein nachfolgendes Projekt benötigt.

Die Abtrennung der Lymphozyten vom Restblut erfolgte mittels eines Ficoll-Gradienten. Zur Vorbereitung wurde zunächst 4ml Ficoll in 4 Falconröhrchen gegeben. Das Vollblut wurde mit jeweils 4ml 0,9%-NaCl-Lösung vermischt und davon jeweils 4ml auf das Ficoll geschichtet. In einem Zentrifugationsschritt mit 1500 U/min für 30 Min erfolgte die Auftrennung der Blutbestandteile. Monozyten und Lymphozyten reicherten sich aufgrund der niedrigeren Dichte als die Ficoll-Lösung an der Grenzschicht (Interphase) zwischen Plasma und Ficoll an. Erythrozyten und Granulozyten sowie tote Zellen sedimentierten aufgrund ihrer höheren Dichte in tiefere Schichten. Die weiße trübe Interphase wurde mit einer Pasteur-Pipette abgesaugt und in ein neues Falconröhrchen gegeben.

Anschließend erfolgt eine Aufreinigung durch Waschen mit vorgewärmtem RPMI-Medium. Dafür wurde jeweils 10ml RPMI hinzugegeben und durch eine Zentrifugation bei 1100 U/Min für 10 Min die Zellen abgetrennt. Dieser Vorgang wurde dreimal wiederholt. Am Ende wird das Pellet, welches die Lymphozyten enthält, in 5ml RPMI aufgenommen und die Zellkonzentration bestimmt.

### **2.3 DNA-Fiber Assay**

Der DNA-Fiber Assay wurde verwendet, um die Replikationsprozesse in den Lymphozyten der jeweiligen Brustkrebspatientin darzustellen. Dazu wurde den stimulierten Lymphozyten für jeweils 25 min Chlordesoxyuridin (CldU) und danach Iododesoxyuridin (IdU) zugegeben, welches während der Replikation anstelle des Nukleotids Thymidin in die DNA

der Zellen eingebaut wurde. Der Nachweis dieser neu-synthetisierten DNA erfolgte anschließend durch eine spezifische Immunfärbung.

### 2.3.1 Stimulation der Lymphozyten

Für die Untersuchung wurden jeweils  $1 \times 10^7$  Zellen in eine Zellkulturflasche in 10 ml RPMI-Medium aufgenommen. Pro Flasche wurde 120  $\mu$ l Phytohämagglutinin (PHA) dazugegeben. Hierdurch wurde eine Stimulation der Lymphozyten erreicht. Versuche mit Blut von gesunden Spendern zeigten, dass 40 h nach Stimulation zwischen 20-25% der Zellen in der S-Phase sind, nach 50h zwischen 25-30% und nach 72h zwischen 30 und 45%. Für die Versuche mit dem Blut von Brustkrebspatientinnen wurde konstant ein Zeitintervall von 72h gewählt.

### 2.3.2 Markierung der replizierten DNA mit CldU und IdU

Den Lymphozyten wurde 72 h nach Stimulation mit PHA zunächst für 25 min mit 0,025 mM CldU-haltigem Medium im 5% CO<sub>2</sub> Brutschrank inkubiert. Um den Einbau von CldU zu stoppen, wurden die Proben in Mikroreaktionsgefäße überführt, für 5 min mit 1.200 U/min bei Raumtemperatur zentrifugiert, und das CldU-haltige Medium abgesaugt. Anschließend erfolgte die Inkubation der Lymphozyten für 25 min mit 0,25 mM IdU-haltigem Medium. Um den Einbau zu stoppen, wurde die Proben wiederum in Mikroreaktionsgefäße gegeben, gefolgt von einer Zentrifugation mit 1.200 U/min für 5 min und dem Absaugen des IdU-haltigen Mediums. Anschließend wurden die Zellen zweimal in eiskaltem PBS aufgenommen, jeweils mit 1.200 U/min für 5 min abzentrifugiert und wiederum in eiskaltem PBS aufgenommen. Abschließend wurde mittels Coulter Counter die Zellkonzentration bestimmt und auf  $5 \times 10^6$  /ml eingestellt.

### 2.3.3 Ausbreiten der DNA

Für die Darstellung der replizierten DNA ist ein Ausbreiten der Chromatinstränge auf Objektträgern erforderlich. Pro Versuch wurden 2  $\mu$ l der Zellsuspension auf einen Objektträger pipettiert. Zur besseren Haftung folgte eine Trocknung der Objektträger für 5 min. Durch eine Zugabe von 7  $\mu$ l des Lysepuffers für 2 min wurde ein Platzen der Zellen sowie eine Denaturierung der Proteine erreicht. Um ein Ausbreiten der DNA zu bewirken, wurde der Objektträger in einem Winkel von etwa 15° aufgestellt, so dass durch den herablaufenden Tropfen aus Zellen und Lysepuffer die Chromatinstränge sich längs des Objektträgers ausrichteten. Der Objektträger wurde an der Luft getrocknet und in Methanol/Essigsäure (3:1) für 10 min fixiert. Die so präparierten Objektträger konnten bei 4°C gelagert werden.

### 2.3.4 Immunfärbung der Chromatinfasern

Der Nachweis der replizierten DNA ist durch eine spezifische Immunfärbung möglich. Zur Rehydrierung wurden die Objektträger zunächst für 5 min mit H<sub>2</sub>O gespült. Um eine Bindung

der Antikörper an die eingebauten CldU- und IdU Nukleotide zu gewährleisten, erfolgte eine Denaturierung der DNA-Stränge. Zur Denaturierung der DNA wurde der Objektträger zunächst 5 min mit 2,5 M HCL äquilibriert und danach für weitere 75 min mit 2,5 M HCL inkubiert. Die Denaturierung wurde durch zweimaliges Waschen mit PBS gestoppt.

Zur Vermeidung unspezifischer Bindungen der Antikörper erfolgte eine zweimalige kurze Spülung gefolgt von einer einstündigen Inkubation in der Blockierungslösung. Die Detektion der CldU-Nukleotide erfolgte durch einen primären, monoklonalen anti-BrdU-Antikörper aus der Ratte in einer 1:1000 Verdünnung in Blockierungslösung. Dafür wurde auf den Objektträger 115 µl der primären Antikörper-Lösung gegeben, wobei durch Auflegen eines Deckglases erreicht wurde, dass sich die Lösung gleichmäßig verteilt und die Probe nicht austrocknet. Anschließend erfolgte eine Inkubation für 1 h bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer. Der Objektträger wurde anschließend dreimal für 10 min mit PBS gewaschen. Die Fixierung des gebundenen Antikörpers wurde durch eine Inkubation in 4 % Paraformaldehyd für 10 min erreicht. Anschließend wurde der Objektträger dreimal für 10 min in der Blockierungslösung inkubiert und danach getrocknet.

Für die Detektion des anti-BrdU-Antikörpers wurde ein sekundärer anti-rat AlexaFluor 555 in einer Verdünnung 1:1000 verwendet. Diese Arbeiten waren ohne direkte UV-Strahlung durchzuführen. Der Objektträger wurde mit 115 µl der sekundären Antikörper-Lösung bedeckt, mit einem Deckglas versehen und für 1,5 h bei Raumtemperatur in einer feuchten, abgedunkelten Kammer inkubiert. Im Anschluss wurden die Objektträger einmal kurz und dreimal für 10 min mit der PBS gewaschen.

Die IdU-Nukleotide wurden mit dem primären monoklonalen anti-BrdU Antikörper aus der Maus detektiert bei einer Verdünnung von 1:1500. Auf den Objektträger wurde dazu 115 µl der primären Antikörper-Lösung gegeben und dann über Nacht im Kühlraum in einer feuchten Kammer inkubiert. Anschließend wurde der Objektträger einmal kurz und dreimal für 10 min mit PBS gewaschen. Zur Detektion des anti-BrdU-Antikörpers aus der Maus wurde ein sekundärer anti-mouse AlexaFluor 488 in einer Verdünnung von 1:500 verwendet. Auf den Objektträger wurde 115 µl der sekundären Antikörper-Lösung gegeben, mit einem Deckglas abgedeckt und für 1,5 h bei Raumtemperatur in einer feuchten, abgedunkelten Kammer inkubiert. Im Anschluss erfolgte ein kurzes Spülen in PBS, zweimal für 5min in Blockierungslösung, gefolgt von einem zweimaligen Waschen in PBS gefolgt von einem einmaligen Waschen in H<sub>2</sub>O dest. Zum Abschluss wurde der Objektträger mit dem Eindeckmittel *Immunofluore* bedeckt, mit einem Deckglas versehen, die Kanten mit Nagellack versiegelt und bei 4°C gelagert.

### 2.3.5 Detektion der markierten DNA mittels Fluoreszenzmikroskopie

Die Analyse der Chromatinfasern erfolgte anhand von Bildern, die mittels eines Fluoreszenzmikroskops hergestellt wurden. Dafür wurde ein 63er Öl-Objektiv verwendet. Zur Detektion des sekundären Fluoreszenz-Antikörpers AlexaFluor 555 wurde der Filtersatz 43 verwendet. Der sekundären Fluoreszenz-Antikörper AlexaFluor 488 wurde mit dem Filtersatz 38 detektiert. Die Aufnahmen wurden mittels des Programms AxioVision erstellt. Pro Objektträger wurden mindestens 10 Aufnahmen im oberen, mittleren und unteren Bereich gemacht.

### 2.3.6 Auswertung mittels ImageJ

Die Auswertung der Bilder erfolgte mit dem ‚open source‘ Bildverarbeitungsprogramm *ImageJ*. Die jeweilige Replikationsstruktur wurden mit dem *ImageJ Plug-In Analyze* bestimmt, die Länge der Chromatinfasern mit *ImageJ Plug-In Segmented lines*. Die mit diesem Programm gemessene Länge der Chromatinfaser konnte mit einem für das Mikroskop spezifischen Umrechnungsfaktor von 9,8 in  $\mu\text{m}$  umgerechnet werden. Um daraus die Elongationsrate (Kilobasen pro Minute, kb/min) der Chromatinfaser zu ermitteln, war die entsprechende Zahl an Nukleotiden zu bestimmen. Hierfür wurde der Umrechnungsfaktor  $1 \mu\text{m} \cong 2,59 \text{ kb}$  verwendet (Jackson und Pombo 1998).

## 2.4 Statistik

Die Festlegung der zu untersuchenden Gruppengröße von  $n=100$  je Studienarm basiert auf der in (Nikkala et al. 2013) untersuchten Patientinnen-Gruppe. Für die Aktivierung von Replikationsursprüngen wurde eine Häufigkeit von 21,7% bzw. 11,8% in Mutationsträgerinnen bzw. Nicht-Trägerinnen beobachtet mit einer Standard-Abweichung von 4.4 und einer Differenz der Häufigkeit von  $d=2.25$ . Bei einer gegebenen Power von 80% und einem Signifikanzniveau von 0,01 würde sich daraus eine Fallzahl von 91 Probanden ergeben. Da davon ausgegangen wurde, dass etwa 10% der Proben nicht auswertbar sind, wurde die Fallzahl auf 100 pro Arm angehoben.

Die Poweranalyse erfolgte mit Hilfe von GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, Inc, USA). und der R-Funktion ‚*power t test*‘ aus dem R-Paket ‚*stat*‘. Als Testverfahren wurde ein zweiseitiger t-Test angewendet für eine Power von 80% (Typ II Fehler) und ein Signifikanzniveau von 0,01 (Typ I Fehler).

Die statistischen Auswertungen erfolgten mit dem Programm GraphPad PRISM Version 5.0. Pro Patienten wurden mindestens 100 Fiberstrukturen ausgewertet und daraus jeweils Mittelwerte bestimmt. Unterschiede zwischen zwei Gruppen wurden durch einen zweiseitigen Student’s t-Test mit einem Signifikanzniveau von  $\alpha=0,05$  bestimmt.

## 2.5 Agentien, Firmen, Software

**Tab. 1:** Primäre Antikörper

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

**Tab. 2:** Sekundäre Antikörper

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

**Tab. 3:** Zellmedien und Reagenzien

Kennzeichnung	Hersteller
Fötales 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

**Tab. 4:** Puffer und Lösungen

Kennzeichnung	Zusammensetzung
Blockierungslösung	1xPBS, 3 % BSA-Pulver, 0.1% Tween20
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 <sub>2</sub> O
Lysepuffer	200mM Tris-HCL (pH: 7,4), 50mM EDTA, 0,5% SDS
Waschlösung	1xPBS, 1 % BSA und 0,1 % Tween20

**Tab. 5:** Bezugsquellen

Material	Firma
Verbrauchsmaterial	- Becton Dickenson (Heidelberg, Deutschland) - B. Braun (Melsungen, Deutschland) - Corning (New York, USA) - Eppendorf (Hamburg, Deutschland) - Sarstedt (Nürnberg, Deutschland)
Zellkulturflaschen	Cellstar; Greiner Bio-One (Frickenhausen, Deutschland)
Deckgläser/Objektträger	Paul Marienfeld (Laud-Königshofen, Deutschland)
Plastik Coverslips	Appligene-Oncor (Illkirch-Graffenstaden, Frankreich)
Vectorshields Mounting Medium	Vector Laboratories (Burlingame, USA)

**Tab. 6:** Geräte

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

**Tab. 7:** Software

<b>Software/Datenbank</b>	<b>Hersteller/Entwickler</b>
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 5.0	Graphpad Software, Inc, USA
R Version 3.5.3	R Core Team

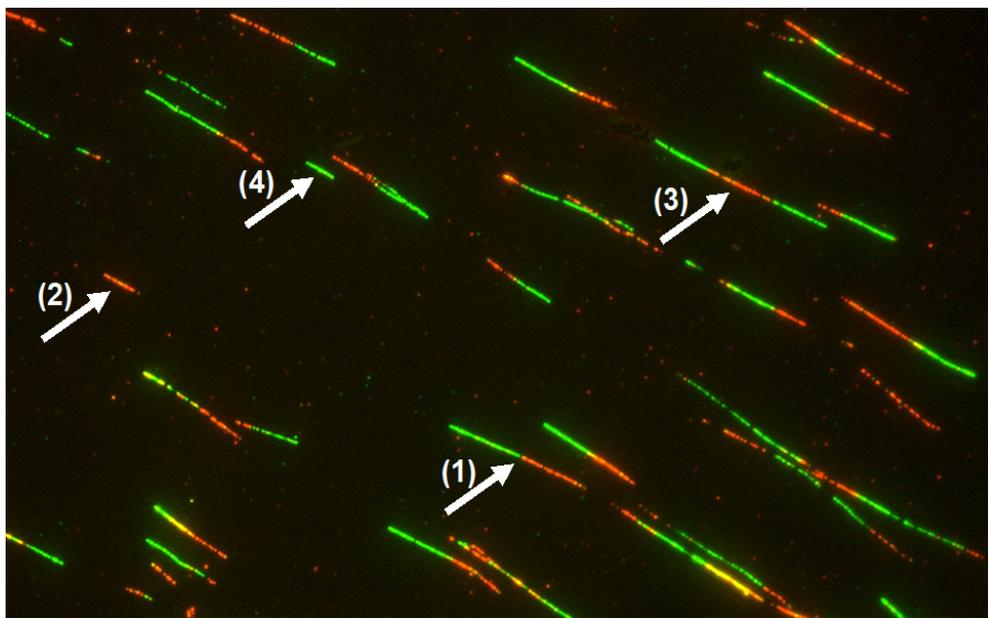
### 3. ERGEBNISSE

Ziel der Arbeit war es, für Brustkrebspatientinnen zu klären, ob jüngere Patientinnen mit einem Alter <45 Jahre im Vergleich zu älteren Patientinnen (>60 Jahre) fehlerhafte Replikationsprozesse zeigen. Dafür wurde bei Patientinnen, die jeweils einer der beiden Altersgruppen zuzuordnen waren, eine Blutprobe entnommen und anhand des DNA-Fiberassays das jeweilige Replikationsverhalten bestimmt.

#### 3.1 Detektion von Replikationsstrukturen mittels DNA-Fiberassay

Abb. 8 zeigt die Aufnahme des Chromatins von Lymphozyten einer Brustkrebspatientin bei Nachweis der Replikation mittels des DNA-Fiberassays. Es können sehr gut einzelne Chromatinstränge erkannt werden. In den DNA-Bereichen, in denen während der Replikation an Stelle von Thymidin die angebotenen Analoga Chlordesoxyuridin (CldU) bzw. Ioddesoxyuridin (IdU) eingebaut wurden, stellten sich diese Bereiche im Fluoreszenzmikroskop als rote (CldU) bzw. grüne (IdU) Stränge dar.

Insgesamt können anhand dieser Technik vier Replikationsstrukturen deutlich voneinander unterschieden werden. Aktiv fortschreitende Elongationsgabeln (Abb.8, Pfeil 1) zeichnen sich durch einen roten Strang aus, dem ohne Unterbrechung ein etwa gleichlanger grüner Strang folgt. Hier konnte während des Einbaus von CldU und IdU die Replikation



**Abb. 8: Detektion von DNA-Replikationsstrukturen mittels DNA-Fiberassay.**

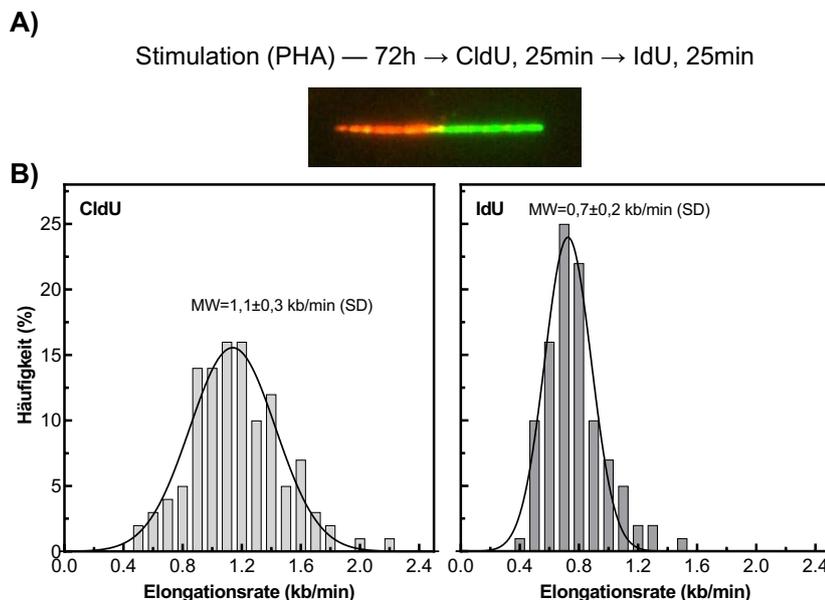
Stimulierten Lymphozyten einer Brustkrebspatientin wurde für jeweils 25 min zunächst Chlordesoxyuridin (CldU) und dann Ioddesoxyuridin (IdU) zum Einbau angeboten. Bei Nachweis der eingebauten Nukleotide mit entsprechenden Antikörpern stellen sich diese Bereiche als rote (CldU) bzw. grüne (IdU) Chromatinstränge da. Damit kann zwischen einer aktiven Replikationsgabel (1), angehaltener Replikationsgabel (2), Replikationsursprung erster (3) und zweiter Ordnung (4) unterschieden werden.

ungestört durchgeführt werden. Angehaltene Replikationsgabeln (Abb.8, Pfeil 2) stellen sich dagegen als rote Chromatinstränge dar, an denen, während der IdU-Markierung die Replikation nicht fortgeführt wurde. Bei neu gestarteter Replikation während der Einbauphase kann zwischen zwei Strukturen unterschieden werden. Zum einen gibt es den Replikationsursprung erster Ordnung (Abb.8, Pfeil 3), der während der ersten Einbauphase gestartet wurde. Da die Replikation immer bidirektional verläuft, geht der neu gestartete rote Strang an beiden Enden in einen grünen Strang über. Wird die Replikation erst während der zweiten Einbauphase gestartet, liegt ein Replikationsursprung zweiter Ordnung vor, der sich als grüner Strang darstellt (Abb.8, Pfeil 4).

Im Rahmen dieses Projektes wurden ausschließlich aktiv fortschreitenden Replikationsgabeln, sowie Replikationsursprünge 1. und 2. Ordnung ausgewertet. Die Auswertung der angehaltenen Replikationsgabeln ist Teil eines weiteren Projekts.

### 3.2 Verteilung der Einzelwerte

Abb. 9 zeigt exemplarisch für eine Brustkrebspatientin bei Auswertung der aktiven Replikationsgabeln in den stimulierten Lymphozyten die Verteilung, wie sie für die jeweiligen Marker erhalten wurde. Dafür wurden pro Probe mindestens 100 Replikationsstrukturen ausgewertet. Hierbei wurde, wie in Material und Methoden (2.3.5) beschrieben, die Länge der Chromatinfaser mit Hilfe des Softwareprogramms *ImageJ Plug-In Segmented lines* bestimmt. Der mit dem Softwareprogramm bestimmte Wert kann dann mit einem für das Mikroskop



**Abb. 9: Verteilung der Elongationsraten in den stimulierten Lymphozyten einer Patientin**

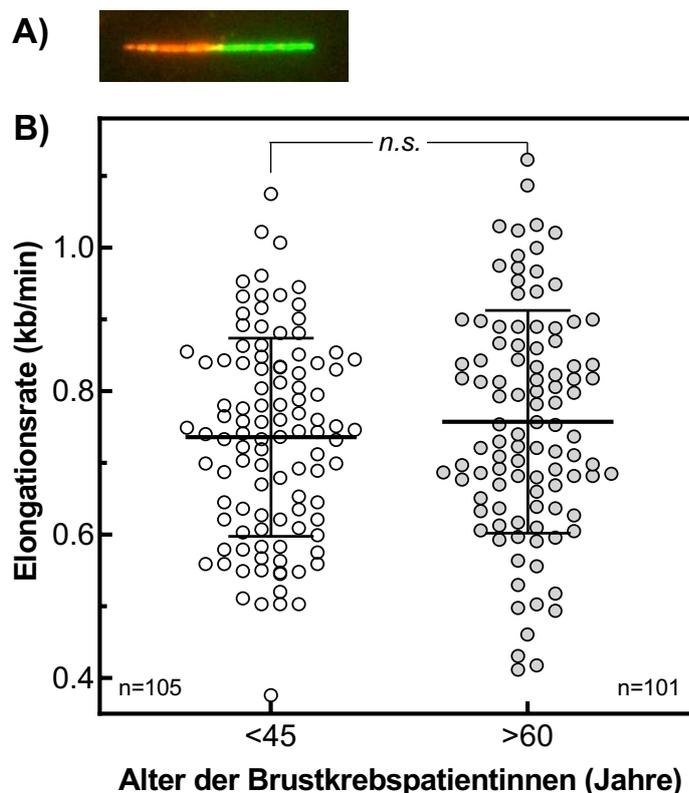
A) Stimulierten Lymphozyten einer Brustkrebspatientin wurde für jeweils 25 min Chlordesoxyuridin (CldU) gefolgt von Ioddesoxyuridin (IdU) zum Einbau angeboten. Der Nachweis des Einbaus erfolgte mittels Immunfluoreszenz. B) Variation der Elongationsrate für IdU bei Bestimmung mittels *ImageJ*. Daten wurde mittels GraphPad eine Gaussverteilung angepasst und daraus der Mittelwert bestimmt.

spezifischen Umrechnungsfaktor von 9,8 in die tatsächliche Länge mit der Maßeinheit  $\mu\text{m}$  umgerechnet werden. Mit Hilfe des Umrechnungsfaktor  $1 \mu\text{m} \cong 2,59 \text{ kb}$  ergibt sich daraus die entsprechende Elongationsrate (Jackson und Pombo 1998).

Sowohl bei Markierung mit CldU als auch mit IdU ergaben sich für die Elongationsraten jeweils breite Verteilungen, die sehr gut durch eine Gausskurve beschrieben werden können. Für die erste Markierung mit CldU reicht die Verteilung von 0,5 kb/min bis 2,2 kb/min mit einem Mittelwert von  $1,1 \pm 0,3 \text{ kb/min}$  (SD). Bei der zweiten Markierung mit IdU reicht die Verteilung von 0,4 bis 1,5 kb/min mit einem Mittelwert von  $0,7 \pm 0,2 \text{ kb/min}$  (SD). Diese Betrachtung macht deutlich, dass für eine Brustkrebspatientin die Elongationsrate der aktiven Replikation über die Anpassung mit einer Gausskurve jeweils mit sehr hoher Genauigkeit durch einen Mittelwert bestimmt werden kann.

### 3.3 Elongationsraten für jüngere und ältere Brustkrebspatientinnen

Wie exemplarisch für eine Brustkrebspatientin in Abb. 9 dargestellt, wurde für die jüngeren (<45 Jahre) sowie die älteren (>60 Jahre) Patientinnen die Verteilung der Elongationsraten



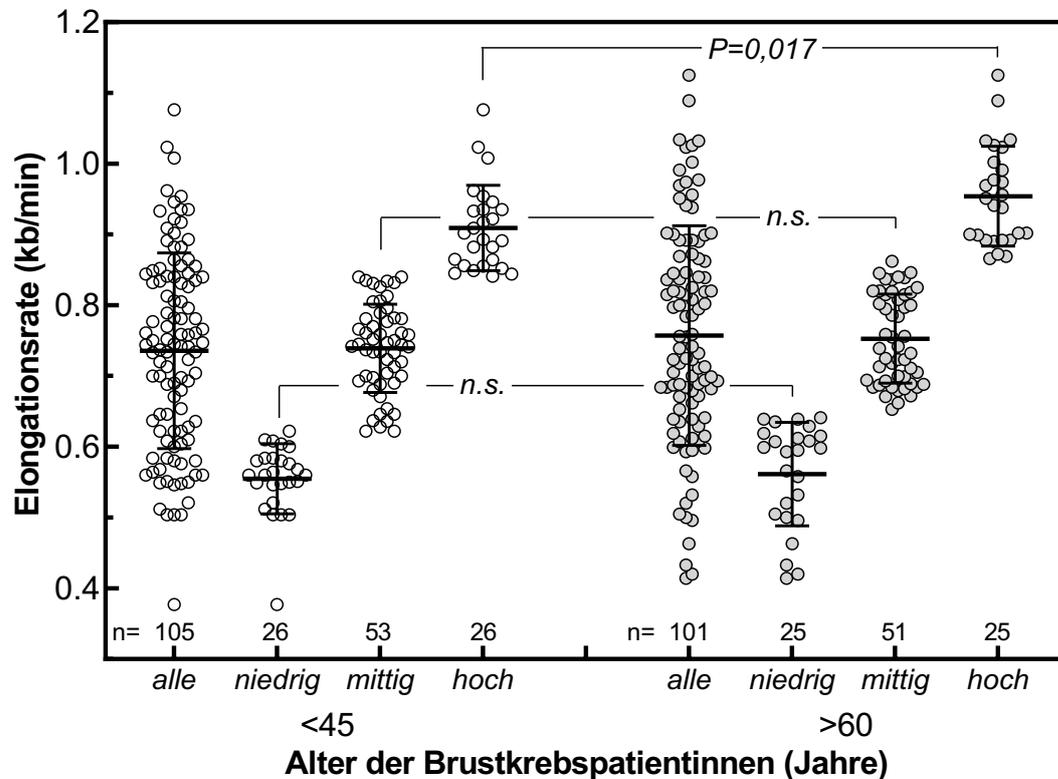
**Abb. 10: Verteilung der Elongationsraten in Lymphozyten von jungen und älteren Brustkrebspatientinnen**

A) Elongation der DNA während der Replikation in stimulierten Lymphozyten bei Markierung mit CldU und Nachweis mittels Immunfluoreszenz. B). Verteilung der Elongationsraten in den Lymphozyten der jungen (<45 Jahre, n=105) und älteren (>60 Jahre, n=101) Brustkrebspatientinnen mit MW und SD. Der Vergleich der beiden Verteilungen erfolgte mittels des zweiseitigen t-Tests.

von CldU und IdU bestimmt und daraus jeweils der Mittelwert berechnet. Allerdings wurde nicht nach CldU und IdU getrennt ausgewertet, sondern immer der ganze gefärbte Chromatinstrang ausgemessen. Abb. 10 zeigt die Verteilung der Mittelwerte für diese beiden Gruppen. Für beide Patientengruppen liegt jeweils eine breite Verteilung der Werte vor. Für junge Patientinnen reicht dies von 0,38 kb/min bis zu 1,08 kb/min. Damit wird für junge Patientinnen eine Variation der mittleren Elongationsrate von einem Faktor 2,8 gefunden mit einer mittleren Elongationsrate von  $MW_{<45}=0,74\pm 0,14$  kb/min (SD).

Für die Gruppe der älteren Patientinnen reicht die Verteilung von 0,41 kb/min bis 1,13 kb/min (SD). Dies entspricht ebenfalls einer Variation um den Faktor 2,8. Es ergibt sich für alle älteren Brustkrebspatientinnen eine mittlere Elongationsrate von  $MW_{>59}=0,75\pm 0,15$  kb/min (SD). Ein Vergleich der beiden Gruppen mittels dem zweiseitigen t-Test zeigt, dass kein signifikanter ( $P=0,294$ ) Unterschied zwischen den beiden Verteilungen besteht.

In der weiteren Datenanalyse wurde untersucht, ob sich die Verteilung der Extremwerte, d.h die niedrigsten 25% (untere Quartile) und die höchsten 25% (obere Quartile) der beiden Gruppen voneinander unterscheiden. Dazu wurden die untere, die beiden mittleren und die obere Quartile separat aufgetragen (Abb. 11). Es zeigt sich ein signifikanter Unterschied



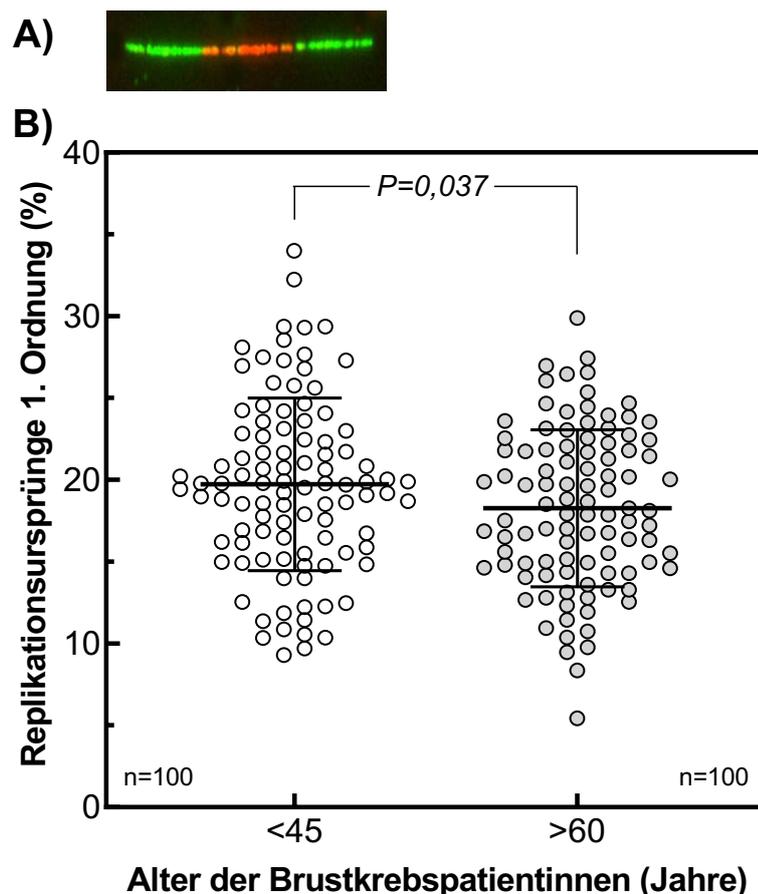
**Abb. 11: Quartile Analyse der Elongationsraten in Lymphozyten von jungen und älteren Brustkrebspatientinnen**

Elongationsraten der jungen und älteren Brustkrebspatientinnen aus Abb. 10 nach Auftrennung in Quartile. 1. Quartil = niedrig; 2.+3. Quartil = mittig; 4. Quartil = hoch mit MW und SD. Vergleich der Quartile erfolgte mittels des zweiseitigen t-Tests.

( $P=0,017$ ) zwischen den beiden oberen Quartilen. Bei den jüngeren Patientinnen wird für diese Gruppe mit dem Mittelwert von  $0,91\pm 0,06$  kb/min (SD) ein signifikant kleinere Elongationsrate gemessen als mit  $0,95\pm 0,07$  kb/min für die älteren Patientinnen. Damit wird deutlich, dass diese Gruppe bei den jüngeren Patientinnen um etwa 40bp/min langsamer replizieren als bei den älteren Patientinnen.

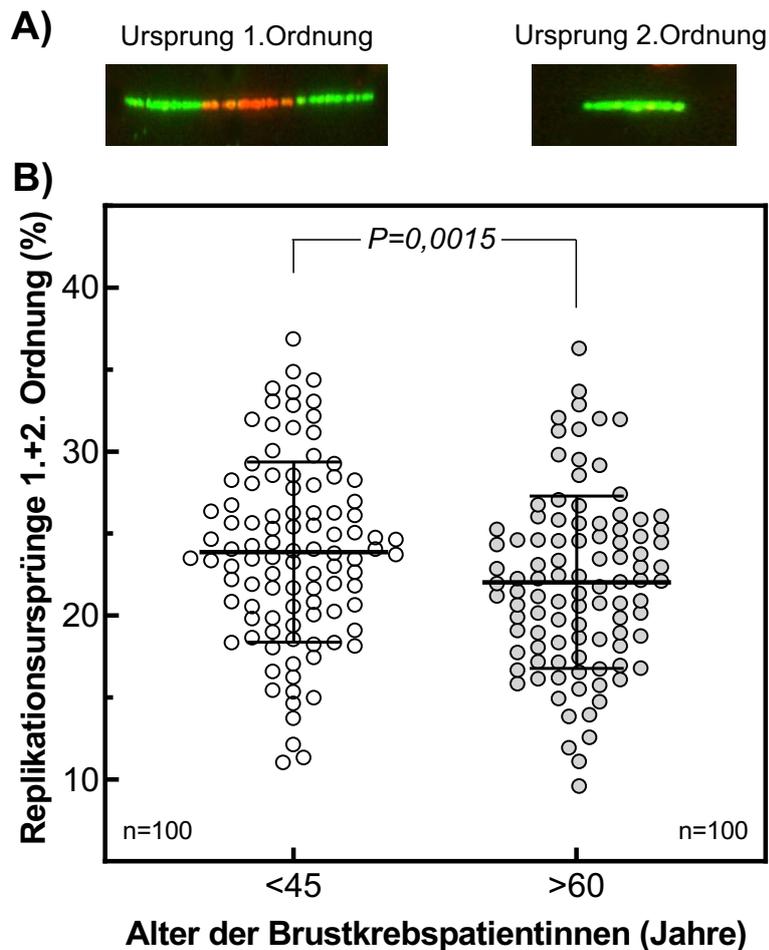
### 3.4 Replikationsursprünge 1. und 2. Ordnung

Für alle Patientinnen wurde die Häufigkeit von Replikationsursprüngen 1. Ordnung ermittelt (Abb. 12A). Abb. 12B zeigt die Verteilung dieser Werte jeweils für die jungen ( $n=100$ ) und die älteren Patientinnen ( $n=100$ ). Für beide Gruppen wird wiederum eine breite Verteilung beobachtet, mit einer Variation um den Faktor 3,6 bzw. 3,2. Die Gruppe der jungen Patientinnen zeigt mit einem  $MW=19,7\pm 5,3$  % (SD) eine signifikant höhere Häufigkeit ( $p=0,037$ ) als die älteren Patientinnen mit dem  $MW=18,3\pm 4,8$  % (SD).



**Abb. 12: Häufigkeit der Replikationsursprünge 1. Ordnung in den Lymphozyten von jungen und älteren Brustkrebspatientinnen**

A) Replikationsstruktur mit einem Ursprung 1. Ordnung. B). Variation der Häufigkeiten für Replikationsursprünge 1. Ordnung für junge (<45 Jahre,  $n=100$ ) und ältere (>60 Jahre,  $n=100$ ) Brustkrebspatientinnen mit MW und SD. Der Vergleich der beiden Verteilungen erfolgte mittels des zweiseitigen t-Tests.

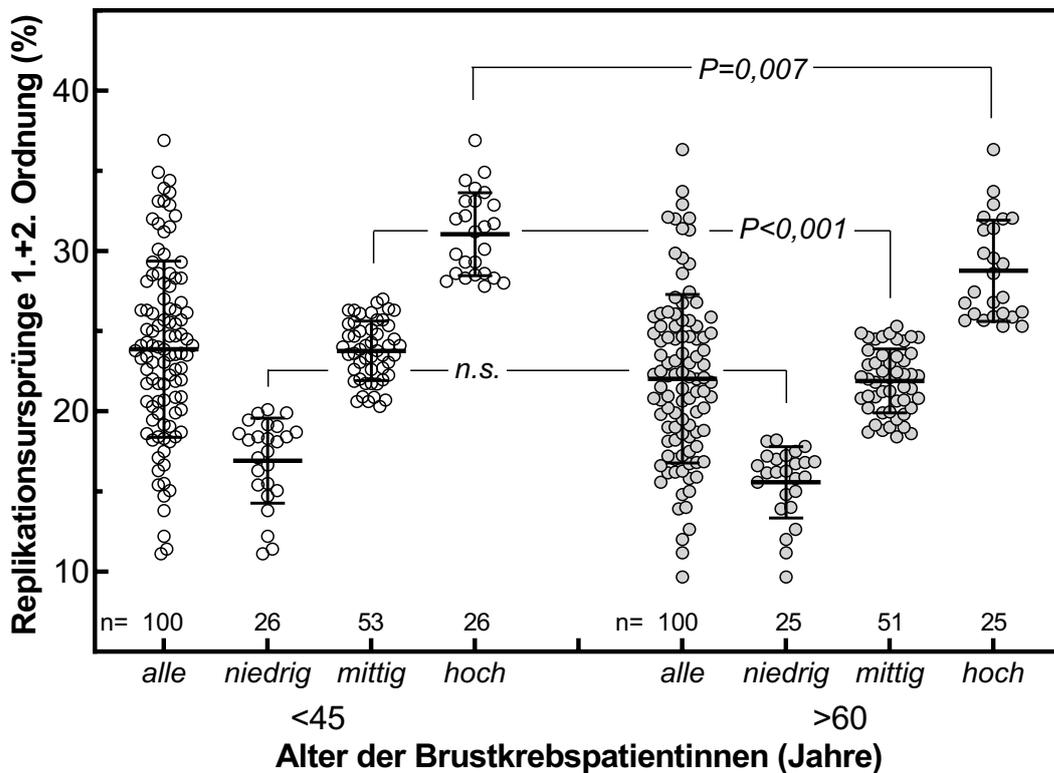


**Abb. 13: Häufigkeit der Replikationsursprünge 1. und 2. Ordnung in den Lymphozyten von jungen und älteren Brustkrebspatientinnen**

A) Replikationsstruktur mit einem Ursprung 1. oder 2. Ordnung. B). Variation der Häufigkeiten für Replikationsursprünge 1. und 2. Ordnung in Lymphozyten von jungen (<45 Jahre, n=100) und älteren (>60 Jahre, n=100) Brustkrebspatientinnen mit MW und SD. Der Vergleich der beiden Verteilungen erfolgte mittels des zweiseitigen t-Tests.

Dieser Unterschied zeigte sich noch deutlicher, wenn die Replikationsursprünge 2. Ordnung mitberücksichtigt wurden (Abb. 13A). Für jede Patientin wurde aus insgesamt 100 Replikationsstrukturen der Prozentsatz an Replikationsursprüngen 1. und 2. Ordnung bestimmt. Abb. 13B zeigt die Verteilung dieser Häufigkeiten für beide Patientengruppen. Für jüngere Patientinnen liegt im Mittel die Häufigkeit aller Replikationsursprünge bei  $MW=23,9\pm 5,5\%$  (SD) und bei den älteren Patientinnen bei  $MW=22,0\pm 5,3\%$  (SD). D.h. bei Berücksichtigung der Ursprünge 2. Ordnung steigt bei den jüngeren Patientinnen diese Häufigkeit mit einer Zunahme von 4,2% etwas stärker als mit nur 3,7% bei den älteren Patientinnen. Dies spiegelt sich auch in der höheren Signifikanz ( $P=0,0015$ ) des Unterschiedes zwischen den beiden Patientengruppen wider (Abb. 13B).

Für die Häufigkeit der Replikationsursprünge 1. und 2. Ordnung erfolgte ebenfalls eine Verteilung auf die Quartile, um eine detaillierte Analyse zu ermöglichen (Abb. 14). Bei dem



**Abb. 14: Quartile Analyse für die Häufigkeiten der Replikationsursprünge in Lymphozyten von jungen und älteren Brustkrebspatientinnen**

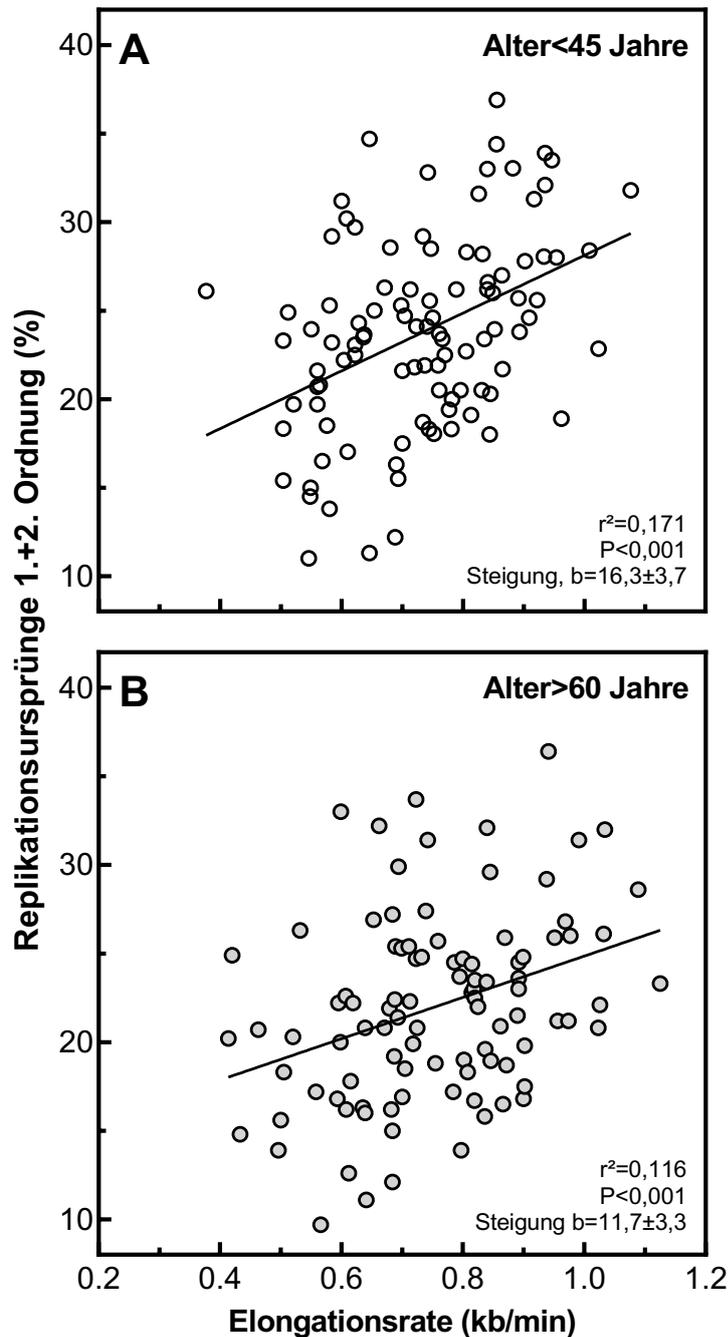
Häufigkeit der Replikationsursprünge in Lymphozyten von jungen und älteren Brustkrebspatientinnen aus Abb. 13 nach Auftrennung in Quartile. 1. Quartil = niedrig; 2.+3. Quartil = mittig; 4. Quartil = hoch mit MW und SD. Vergleich der Quartile erfolgte mittels des zweiseitigen t-Tests.

Vergleich dieser Quartile zeigt sich, dass der Unterschied zwischen den beiden Patientengruppen vor allem auf den Unterschieden in dem mittleren ( $P < 0,001$ ) und dem hohen ( $P = 0,007$ ) Quartil beruht, während für das untere Quartil kein Unterschied festzustellen ist.

Insgesamt zeigen diese Daten erstmalig, dass sich die beiden Patientengruppen bezgl. der Häufigkeit der Replikationsursprünge unterscheiden, wobei für jüngere Patientinnen etwas mehr Replikationsursprünge beobachtet werden. Dies beruht vor allem darauf, dass unter den jüngeren Patientinnen häufiger einzelne Patientinnen mit einer sehr hohen Anzahl an Replikationsursprüngen vorlagen.

### 3.5 Beziehung zwischen Elongation und Replikationsstart

Es wurde ebenfalls für die beiden Patientengruppen überprüft, ob jeweils zwischen der Elongationsrate und der jeweiligen Häufigkeit für Replikationsursprünge 1. und 2. Ordnung eine Beziehung besteht. In Abb. 15.A und B sind diese beiden Parameter deshalb gegeneinander aufgetragen. Es zeigt sich, dass insgesamt eine schwache dennoch aber



**Abb. 15: Assoziation zwischen der Elongationsrate und der Häufigkeit für einen Replikationsursprung 1. und 2. Ordnung in den Lymphozyten von jungen und älteren Brustkrebspatientinnen**

Die Elongationsraten aus Abb. 10 aufgetragen gegen die jeweilige Häufigkeit für Replikationsursprünge 1. und 2. Ordnung aus Abb. 13. A) Lymphozyten von jungen Patientinnen mit Alter <45 Jahre. B) Lymphozyten von älteren Patientinnen mit Alter >60 Jahre. Analyse der Daten mittels linearer Regression.

hoch-signifikante Beziehung zwischen der Elongationsrate und der Häufigkeit für Replikationsursprünge vorliegt mit einem etwa gleich niedrigen Regressionskoeffizienten  $r^2$  für junge ( $r^2=0,171$ ) wie für ältere ( $r^2=0,116$ ) Brustkrebspatientinnen. Im Mittel nimmt für beide

Gruppen mit ansteigender Elongationsrate auch die Häufigkeit für die Replikationssprünge zu. Dabei ist diese Zunahme für die jüngere Patientinnen mit einer Steigung von  $b=16,3\pm 3,7$  etwas stärker als bei den älteren Patientinnen mit  $b=11,7\pm 3,3$  (Abb. 15A und B). Dies zeigt, dass in beiden Gruppen mit zunehmender Elongationsrate auch die Häufigkeit für den Start eines neuen Replikationsursprunges zunimmt. Dieser Effekt ist bei den jüngeren Patientinnen etwas stärker ausgeprägt als bei den älteren Patientinnen.

## 4. DISKUSSION

Ziel dieser Untersuchung war es, in einer großen Studie das Replikationsverhalten von jungen (<45 Jahre) und älteren (>60 Jahre) Brustkrebspatientinnen anhand ihrer Lymphozyten miteinander zu vergleichen. Dazu wurde im Zeitraum September 2014 bis Oktober 2016 eine Studie am Brustzentrums des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf mit jeweils 100 Probandinnen pro Gruppe durchgeführt. Ein positives Votum der Ethikkommission der Universität Hamburg lag hierfür vor (PV4694).

### 4.1 Early-onset Brustkrebs

Die Forschung zum Brustkrebs bei Frauen jünger als 40 Jahre, der auch als *early-onset*-Brustkrebs (*EOBC*) bezeichnet wird, ist von großer nationaler Bedeutung. Das Risiko, an Brustkrebs zu erkranken, nimmt mit dem Alter deutlich zu, wie es auch generell für die meisten Tumorerkrankungen beobachtet wird (RKI 2019). Der Anteil des *EOBC* an allen Brustkrebserkrankungen wird auf 6-10% geschätzt (RKI 2019). Die Zahl der Frauen mit *EOBC* pro 100.000 Frauen hat in den letzten zwanzig Jahren kontinuierlich zugenommen mit einem Anstieg in diesem Zeitraum um 15% (RKI 2019). Im Gegensatz dazu wurde für die Gesamtzahl der Brustkrebserkrankungen in Deutschland nach dem Zwischenhoch in den Jahren 2007-2008 aufgrund der Einführung der Mammographie eine Abnahme registriert (RKI 2019).

Trotz großer Fortschritte in der Vorsorge sowie der Therapie sterben in Deutschland weiterhin jedes Jahr etwa 18.500 Frauen an Brustkrebs und davon etwa 1.500 mit *EOBC* (RKI 2019). Die Therapie beim Brustkrebs erfolgt je nach Stadium durch eine Kombination aus Chirurgie, Strahlentherapie, Chemotherapie, sowie auch einer zielgerichteten Therapie. Die zielgerichtete Therapie eines Tumors ist möglich, wenn mit Hilfe von geeigneten molekularen Marker bestimmt werden kann, welches Target in dem entsprechenden Tumor vorliegt. So können Brustkrebspatientinnen mit einem Her2-positiven Tumor sehr gezielt mit dem monoklonalen anti-Her2-Antikörper Trastuzumab behandelt werden (Paracha et al. 2020, Peto et al. 2012). Für Patientinnen mit einem triple-negativen Brusttumor (TNBC) stehen seit 2018 zielgerichtete Therapien mit verschiedenen PARP1-Inhibitoren zur Verfügung (<https://www.aacr.org/patients-caregivers/progress-against-cancer/parp-inhibitor-breast-cancer-talazoparib-talzenna/>). Vorversuche mit TNBC-Zellkulturen zeigen, dass in diesen Zellen ein Defekt in der Homologen Rekombination vorliegt und daher solche eine Therapie sehr sinnvoll sein könnte (Meyer et al. 2020).

Generell deutet sich an, dass der *EOBC* therapieresistenter ist (Kataoka et al. 2016). Wie in einer großen japanischen Studie gezeigt, kann dies nicht allein darauf zurückgeführt werden, dass bei vielen der *EOBC* biologische Marker vorliegen, die mit einer schlechten

Prognose einhergehen (Kataoka et al. 2016). Selbst wenn allein TNBC betrachtet wurden, ergab sich für jüngere Patientinnen <35 Jahre eine signifikant schlechtere 5-Jahresüberlebensrate als für Patientinnen im mittleren Alter von 35-50 Jahren oder ältere Patientinnen >60 Jahre. Dieses Ergebnis macht deutlich, dass beim *EOBC* eine erhöhte Therapieresistenz vorliegt, die unabhängig von den bisher verwendeten molekularen Markern ist.

Um die Heilungsschancen für den *EOBC* zu erhöhen, müssen neue gezielte Therapien entwickelt werden. Dies setzt voraus, dass man für den jeweiligen Tumor den Treiber und damit das entsprechende Target kennt. Aktuell werden vor allem zirkulierende Tumormarker im Serum getestet sowie auch umfangreiche genetische Analysen durchgeführt (De Silva et al. 2019). Ein gravierender Nachteil der genetischen Analysen ist allerdings, dass damit zwar die jeweilige Mutation detektiert werden nicht aber deren funktionelle Relevanz. Dies auch deshalb von Bedeutung, da für bestimmte Gene bestimmte Mutationen je nach Prozess zu ganz unterschiedlichen Konsequenzen führen können (Dungrawala et al. 2017, Pathania et al. 2014).

## 4.2 DNA-Fiber Assay

Mit dem DNA-Fiber Assay steht eine Methode zur Verfügung, die es ermöglicht, das Replikationsverhalten von Zellen umfassend zu bestimmen (Biber und Wiesmüller 2021, Quinet et al. 2017). Störungen in den verschiedenen Phasen der Replikation können dabei auch direkt oder indirekt auf Defekte in der Homologen Rekombination oder der Zellzykluskontrolle hinweisen (siehe Kap. 1.3). Damit können mit Hilfe des DNA-Fiber Assays detailliert verschiedene Ursachen der genomischen Instabilität erkannt. Dies wurde bereits für eine große Zahl unterschiedliche Zellarten wie normale Fibroblasten, MEF, lymphoblastoide Zellen und vor allem zahlreiche Tumorzelllinien demonstriert (Biber und Wiesmüller 2021, Quinet et al. 2017).

In dem Labor für Strahlenbiologie & Experimentelle Radioonkologie an der Universitätsklinik Hamburg-Eppendorf ist der DNA-Fiber Assay seit vielen Jahren etabliert und es konnten bereits zahlreiche wichtige Erkenntnisse damit erarbeitet werden. So wurde für die Osteosarkomzelllinie U2OS gemessen, dass nach DNA-Schädigung mit verschiedenen Agentien eine ausgeprägte CHK1 Phosphorylierung mit einer unterdrückten Initiation der DNA-Replikation korreliert (Parplys et al. 2012) und, dass mit zunehmender RAD51 Expression die Elongationsrate dieser Zellen abnimmt (Parplys et al. 2015). Anhand von lymphoblastoiden Zellkulturen konnte erstmalig gezeigt werden, dass ein heterozygoter PALB2-Mutationsstatus zum vermehrten Feuern von Replikationsursprüngen sowie einer verkürzten Distanz zwischen den Replikationsgabeln führt (Nikkilä et al. 2013). Diese Daten

weisen damit auf einen neuen Mechanismus, wie eine Haploinsuffizienz in einem an der Homologen Rekombination beteiligten Gen eine vermehrte genomische Instabilität bewirken kann. Für Zelllinien von TNBC wurde gefunden, dass sich dieser Status nicht auf die Elongationsrate auswirkt, wohl aber ein vermehrtes Feuern der Replikation auslöst (Rieckhoff et al. 2020) und, dass nur bei MMC-resistenten TNBC eine CHK1-Inhibition zu vermehrtem Replikationsstress führt (Meyer et al. 2020). Für Tumorlinien unterschiedlicher Entität wurde zudem gefunden, dass eine Mutation in KRAS mit einer verminderten Elongationsrate einhergeht (Al Zubaidi et al. 2021). Insgesamt verfügt damit das Labor über eine lange und kompetente Erfahrung bezüglich des DNA-Fiber Assays.

### 4.3 Hamburg Studie

Mit der Studie wurde erstmalig für junge und ältere Brustkrebspatientinnen das Replikationsverhalten anhand stimulierter Lymphozyten untersucht. Entsprechende Untersuchungen an Lymphozyten wurden bisher noch nicht am Labor durchgeführt und liegen auch ansonsten nicht vor, so dass mit dieser Studie gänzlich neue Erkenntnisse erarbeitet wurden.

Die Studie wurde insgesamt an 105 jungen (<45 Jahre) sowie 101 älteren (>60 Jahre) Brustkrebspatientinnen durchgeführt. Den Patientinnen wurde jeweils 9 ml peripheres Blut entnommen und nach Isolierung der Lymphozyten und deren Stimulation durch PHA das Replikationsverhalten mittels des DNA-Fiber Assays bestimmt.

#### 4.3.1 Elongationsrate

Für jede der Patientin wurde zur Bestimmung der Elongationsrate mindestens 100 Fiber ausgewertet und daraus der jeweilige Mittelwert berechnet. Bei Auftragung aller Werte ergibt sich für die Elongationsraten sowohl für jüngere als auch ältere Patientinnen jeweils eine breite Verteilung (Abb. 10). Diese Verteilung spiegelt die Variation der Elongation für eine einzelne Patientin wider. Im Mittel zeigte sich hierbei für die jüngeren Patientinnen mit einem  $MW=0,74\pm 0,14$  kb/min eine etwas geringere Elongationsrate als für die älteren Patientinnen mit  $MW=0,76\pm 0,16$  kb/min, was aber statistisch nicht signifikant war ( $P=0,294$ ). Eine detaillierte Betrachtung dieser Daten mit Aufteilung auf ein niedriges bzw. hohes Quartil mit jeweils 25% sowie einer mittleren Gruppe mit 50% der Werte ergibt sich jedoch ein markanter Unterschied. Hier wurde für das obere Quartil ein klarer Unterschied zwischen den beiden Gruppen gefunden (Abb. 11). Dabei wiesen die jüngeren Patientinnen mit  $0,91\pm 0,06$  kb/min eine signifikant ( $P=0,017$ ) langsamere Elongationsrate auf als die älteren Patientinnen mit  $0,95\pm 0,07$  kb/min. Diese Daten zeigen damit, dass in den Lymphozyten der älteren Patientinnen die Elongationsrate z.T. sehr hohe Werte erreichen können, was aber nur in eingeschränktem Maße bei den jüngeren Patientinnen der Fall ist. So wurde bei den jüngeren

Patientinnen nur dreimal eine Elongationsrate von mehr als 1 kb/min gemessen. Im Gegensatz dazu wurde dies für sieben der älteren Patientinnen beobachtet. Offensichtlich liegen bei den jüngeren Patientinnen Einschränkungen vor, die eine besonders schnelle und damit ungestörte Replikation behindern.

Die Elongationsraten, wie sie in dieser Studie gemessen wurden, liegen in dem Bereich von 1-3 kb/min, wie sie auch in anderen Untersuchungen mit Hilfe des DNA-Fiber Assays bestimmt wurden (Tab. 8).

**Tab. 8:** Elongationsraten bei Nachweis mittels DNA-Fiber Assay

Zellen	Ursprung	Elongationsrate kb/min $\pm$ SD/SEM*	Referenz
Lymphozyten	Brustkrebspatientinnen < 45 Jahre	0,74 $\pm$ 0,14	diese Studie
	Brustkrebspatientinnen > 60 Jahre	0,75 $\pm$ 0,15	
HeLa Zervixkarzinom	Mensch	1,7 $\pm$ 0,3	(Jackson und Pombo 1998)
DT40	Hühner	1,0 - 1,3	(Petermann et al. 2006)
"	CHK1-/-	0,5 - 0,7	
Keratinocyten	Mensch	1,46 $\pm$ 0,81	(Conti et al. 2007)
IC1 Plattenepithelkarz.		1,67 $\pm$ 0,72	
V79	Hamster	1,04 $\pm$ 0,04	(Daboussi et al. 2008)
"	BRCA2 def.	0,77 $\pm$ 0,03	
"	RAD51 def.	0,83 $\pm$ 0,02	
HeLa Zervixkarzinom	Mensch	0,79	(Ibarra et al. 2008)
"	MCM2 KO	0,80	
"	MCM3 KO	0,74	
U2OS Osteosarkom	Mensch	0,77 $\pm$ 0,01	(Parplys et al. 2012)
Lymphoblastoide Zellen	Mensch	1,11	(Nikkilä et al. 2013)
"	PALB2 mut.	1,02	
VC-8	Hamster	1,77	(Wilhelm et al. 2014)
"	BRCA2 def.	1,47	
U2OS Osteosarkom	Mensch	0,82 $\pm$ 0,01	(Parplys et al. 2015)
"	RAD51 überexpr.	0,69 $\pm$ 0,01	
HeLa Zervixkarzinom	Mensch	1,00 $\pm$ 0,36	(Köhler et al. 2016)
"	CDC45 überexpr.	0,39 $\pm$ 0,15	
Immort. Fibroblasten	Mensch	0,9 $\pm$ 0,1	(Kotsantis et al. 2016)
"	HRAS überexpr.	0,5 $\pm$ 0,1	
U2OS Osteosarkom	Mensch	1,9 $\pm$ 0,2	(Klusmann et al. 2016)
"	TP53 del.	1,6 $\pm$ 0,2	
HCT116 Kolonkarzinom	Mensch	1,3 $\pm$ 0,2	
"	MDM2 del.	1,1 $\pm$ 0,3	
TKO-Bcl2 MEF	Maus	1,66	(Benedict et al. 2018)
"	TP53 KO	1,37	
U2O2 Osteosarkom	Mensch	1,0	(Sokka et al. 2018)
"	TOPBP1 mut	0,4	
TNBC	viel PTEN	1,04	(Rieckhoff et al. 2020)
"	wenig PTEN	0,74	
div. Tumorzellen KRAS wt	Mensch	0,80 $\pm$ 0,23	(Al Zubaidi et al. 2021)
"	KRAS mut	0,47 $\pm$ 0,20	

\* MW  $\pm$ Standardabweichung (SD) oder *Standardfehler des Mittelwerts* (SEM)

Um die Elongationsrate zu ermitteln, werden die mit CldU und IdU markierten Stränge mit Hilfe eines Softwareprogrammes ausgemessen, wofür in dieser Arbeit das Programm *ImageJ Plug-In Segmented lines* verwendet wurde. Diese Werte können dann mit Hilfe eines Faktors in kb umgerechnet werden. In dieser Arbeit wurde dafür der Umrechnungsfaktor von Jackson und Pombo verwendet, wonach  $1 \mu\text{m} \triangleq 2,59 \text{ kb}$  entspricht (Jackson und Pombo 1998). Hierbei wird der jeweilige Vergrößerungsmaßstab des Mikroskops berücksichtigt. In den in Tab. 9 zusammengefassten Arbeiten wurde neben diesem Faktor auch andere Werte verwendet, bzw. sind nicht angegeben, so dass ein Teil der Variation auch auf Unterschiede im Umrechnungsfaktor zurückzuführen sein könnte.

Die Zusammenstellung der Werte in Tab. 2 macht auch deutlich, wie sich jeweils Defekte bzw. Fehlregulation bestimmter Gene, die an der HR, der Replikation oder der Zellzyklusregulation beteiligt sind, auf die Elongationsrate auswirken. Ein Knockdown oder ein Defekt in Genen wie BRCA2, RAD51, PALB2 und PTEN, die alle an der HR beteiligt sind, bewirkte im Mittel nur eine geringe Abnahme der Elongationsrate um 10 bis maximal 30% (Daboussi et al. 2008, Nikkilä et al. 2013, Parplys et al. 2015, Rieckhoff et al. 2020, Wilhelm et al. 2014).

Für HRAS und KRAS, über die Zellen ihre Proliferation regeln, wurde bei Fehlregulation jeweils eine deutliche Reduktion der Elongationsrate festgestellt (Al Zubaidi et al. 2021, Kotsantis et al. 2016), ähnlich wie für die Checkpoint-Kinase CHK1 (Petermann et al. 2006). Dagegen wurde für das ebenfalls an der Zellzykluskontrolle beteiligte TP53 bei einer Mutation oder einem Ausschalten nur eine moderate Abnahme beobachtet (Benedict et al. 2018, Klusmann et al. 2016). Ähnliches gilt für MDM2, welches ein Antagonist von TP53 ist (Klusmann et al. 2016).

Eine besonders starke Reduktion der Elongation von 60% zeigt sich bei Fehlregulation von zwei unmittelbar an der Replikation beteiligten Genen wie CDC45 und TOPBP1 (Köhler et al. 2016, Sokka et al. 2018). Dagegen wurde für die ebenfalls an der Replikation beteiligten Gene MCM2/3 bei einem Knockdown keine oder nur sehr geringe Abnahme der Elongationsrate gemessen (Ibarra et al. 2008).

Insgesamt zeigen diese Daten, dass nicht nur die unmittelbar an der Replikation beteiligten Gene sich negativ auf die je nach Gen große Unterschiede gefunden. Aufgrund dieser Daten wäre es für eine weitere Analyse sinnvoll, sowohl bei den jüngeren als auch den älteren Patientinnen vor allem diejenigen detailliert zu untersuchen, die sich jeweils in dem Quartil mit der niedrigen Elongationsrate befanden (Abb. 11, jeweils Gruppe mit niedrigen Werten). Hier sollte mittels gezielter Sequenzierungstechniken überprüft werden, welche Mutationen insgesamt in den Genen dieser Patientinnen vorliegen, die an den oben drei aufgeführten Prozessen beteiligt sind und welche Mutationen vermehrt bei den jüngeren Patientinnen auftreten.

#### 4.3.2 Aktivierung von ruhenden Replikationsursprüngen

Für die Gruppe der jungen (<45) sowie der älteren (>60) Brustkrebspatientinnen wurde anhand der stimulierten Lymphozyten ebenfalls das Aktivieren ruhender Replikationsgabeln bestimmt. Hierbei wurden sowohl Replikationsursprünge 1. als auch 2. Ordnung ausgewertet (Abb. 12 und 13). Bei der Zusammenfassung beider Datensätze ergab sich ein klarer Unterschied zwischen den untersuchten Kohorten mit einem signifikant ( $P=0,0015$ ) höheren Prozentsatz an Replikationsursprüngen in den Lymphozyten der jüngeren Patientinnen ( $23,9\pm 5,5\%$  vs.  $22,0\pm 5,3\%$ ). Bei einer detaillierten Auswertung durch Auftrennung auf Quartile ergibt sich, dass diese Signifikanz vor allem auf den Unterschieden in dem hohen Quartil und der mittleren Gruppe, in dem das 2. und 3. Quartil zusammengefasst wurden, beruhte (Abb. 14). Hier wurden jeweils für die jüngeren Patientinnen höhere Mittelwerte gefunden als für die älteren Patientinnen. Dieser Unterschied bedeutet, dass während der Markierungszeit von insgesamt 40 Minuten in den Lymphozyten der jüngeren Patientinnen häufiger eine Replikation gestartet wurde als in den Lymphozyten der älteren Patientinnen.

**Tab. 9:** Häufigkeit für Replikationsursprünge 1. und 2. Ordnung bei Nachweis mittels DNA-Fiber Assay

Zellen	Ursprung	Häufigkeit (%) für 1. und 2. Ordnung $\pm$ SD*	Referenz
Lymphozyten	Brustkrebspatientinnen < 45 Jahre	23,9 $\pm$ 5,5	diese Arbeit
	Brustkrebspatientinnen > 60 Jahre	22,0 $\pm$ 5,3	
U2OS Osteosarkom	Mensch	24,7	(Parplys et al. 2012)
Lymphoblastoide Zellen	Mensch	11,8 $\pm$ 4,1	(Nikkilä et al. 2013)
" PALB2 mut.		21,7 $\pm$ 4,7	
B-Zellen	Maus	16,0 $\pm$ 1,5	(Srinivasan et al. 2013)
" MYC überexpr.		1,5 $\pm$ 0,6	
H1299	Mensch	14	(Frum et al. 2014)
" MDM2 überrepr.		5	
U2OS Osteosarkom	Mensch	9	(Parplys et al. 2015)
" RAD51 überexpr.		17	
Lungenzellen TP53wt	Maus	1,2 – 1,2	(Singh et al. 2017)
" TP53 -/-		3,1 – 3,5	
" TP53 mut		6,6 – 8,3	
TKO-Bcl2 MEF	Maus	33 $\pm$ 3	(Benedict et al. 2018)
" TP53 KO		33 $\pm$ 5	
U2O2 Osteosarkom	Mensch	19 $\pm$ 3	(Sokka et al. 2018)
" TOPBP1 mut		30 $\pm$ 2	
TNBC viel PTEN	Mensch	19	(Rieckhoff et al. 2020)
" wenig PTEN		24	
div. Tumorzellen KRAS wt	Mensch	22 $\pm$ 2	(Al Zubaidi et al. 2021)
" KRAS mut		31 $\pm$ 3	

\* MW  $\pm$ Standardabweichung (SD) oder *Standardfehler des Mittelwerts (SEM)*

In Tab. 9 sind die Häufigkeiten für die Replikationsursprünge zusammengefasst, wie sie

bisher in der Literatur veröffentlicht wurden. Je nach Studie schwanken diese Werte erheblich. Dies kann z.T. auf der je nach Protokoll unterschiedlichen Länge der Markierungszeit begründet sein.

Die Zusammenstellung macht vor allem deutlich, wie sich bestimmte Gene jeweils auf das Feuern der Replikationsgabeln auswirken. Dabei wird beobachtet, dass sich sowohl eine Zunahme als auch eine Abnahme ergeben kann. Generell wird eine Zunahme und damit vermehrtes Aktivieren der Replikationsgabeln beobachtet, wenn Gene der Homologen Rekombination dereguliert wurden, wie für PALB2, RAD51 und PTEN gezeigt (Nikkilä et al. 2013, Parpys et al. 2015, Rieckhoff et al. 2020). Ein vermehrtes Aktivieren wurde ebenfalls gemessen, wenn mutiertes TOPBP1 vorliegt, was die Aktivierung von ATR behindert (Sokka et al. 2010), oder wenn eine Mutation in TP53 existiert (Singh et al. 2017).

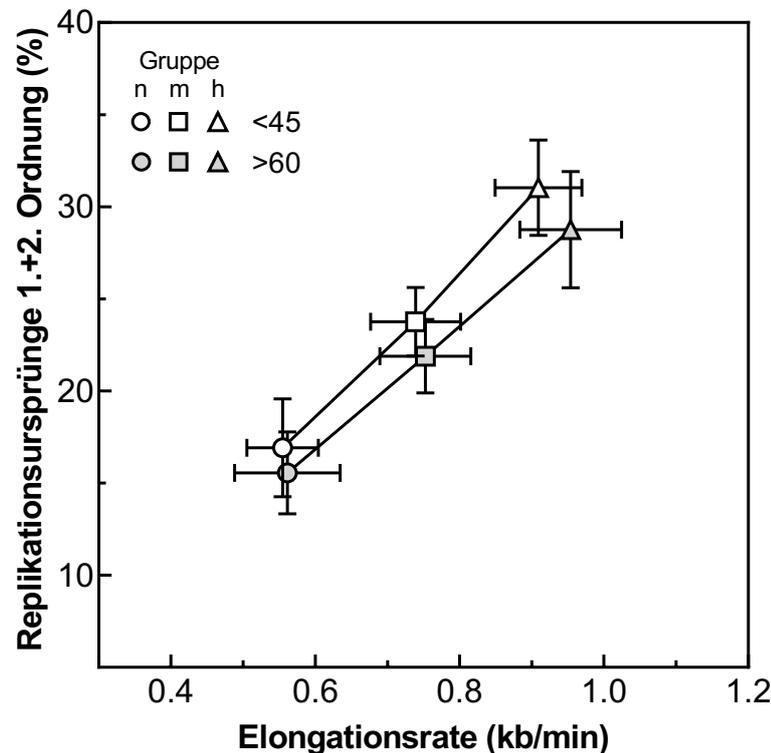
Dagegen wurde ein vermindertes Aktivieren von Replikationsgabeln festgestellt, wenn die beiden Onkogene MYC und MDM2 überexprimiert waren (Frum et al. 2014, Srinivasan et al. 2013). In Übereinstimmung damit zeigen auch mehrere Übersichtsarbeiten, dass bei Aktivierung von Onkogenen in der Regel ein vermindertes Feuern von Replikationsgabeln vorliegt (Kotsantis et al. 2018, Primo und Teixeira 2019, Qiu et al. 2018).

Diese Daten könnten damit ein Hinweis darauf sein, dass das erhöhte Aktivieren der Replikationsgabeln, wie es für die Lymphozyten von jüngeren Brustkrebspatientinnen gefunden wurde, nicht auf eine genetisch bedingte vermehrte Aktivität von Onkogenen zurückgeführt werden kann, sondern andere Ursachen haben muss.

Allerdings wurde für einige wenige Onkogene wie KRAS auch ein vermehrtes Starten von Replikationsgabeln berichtet (Al Zubaidi et al. 2021). Es wird ebenfalls darauf hingewiesen, dass für viele der 803 bisher identifizierten Onkogene noch keine Information darüber vorliegt, wie sie sich auf die Replikation auswirken (Kotsantis et al. 2018).

#### 4.3.3 Beziehung zwischen Elongation und Replikationsstart

Für die Lymphozyten der jüngeren als auch der älteren Brustkrebspatientinnen wurde jeweils eine schwache, aber dennoch hoch-signifikante Beziehung zwischen der Elongationsrate und der Häufigkeit für Replikationsursprünge gefunden (Abb. 15). Für beide Gruppen zeigt sich dabei eine positive Assoziation. D.h. mit steigender Elongationsrate nimmt im Mittel auch die Häufigkeit für einen Replikationsursprung zu. Diese Zunahme ist für die Lymphozyten der jüngeren Patienten etwas steiler als für die älteren Patientinnen. Dieser Unterschied wird noch deutlicher, wenn nicht die Gesamtzahl aller Werte betrachtet wird, sondern allein die Mittelwerte der drei gebildeten Untergruppen mit dem niedrigen und hohen Quartil sowie der mittleren Gruppe (Abb. 16). Für die untere Gruppe mit den niedrigen Elongationsraten zeigt sich für junge Patientinnen nur eine geringfügig höhere Häufigkeit der Replikation. (Kreise in Abb. 16). Für die Gruppe mit den mittleren Elongationsraten ist dieser



**Abb. 16: Assoziation zwischen der Elongationsrate und der Häufigkeit für einen Replikationsursprung 1. und 2. Ordnung in den Lymphozyten von jungen und älteren Brustkrebspatientinnen**

Die gemittelten Elongationsraten der unteren (u), mittleren (m) und hohen (h) Gruppe aus Abb. 9 aufgetragen gegen die jeweilige mittlere Häufigkeit für Replikationsursprünge 1. und 2. Ordnung aus Abb. 14. MW  $\pm$ SD.

Unterschied in der Replikationshäufigkeit bereits etwas größer (Quadrate in Abb. 16). Bei der Gruppe mit den hohen Elongationsraten zeigt sich dagegen ein klarer Unterschied mit etwa 2,5% mehr Replikationsursprüngen in den Lymphozyten der jungen Brustkrebspatientinnen als in den Lymphozyten der älteren Patientinnen (Dreieck in Abb. 16). Bei Extrapolation auf eine gleich hohe Elongationsrate würde sich sogar ein Unterschied von 5% ergeben. Damit weisen diese Darstellung der Daten noch einmal daraufhin, dass in den Lymphozyten der jungen Patientinnen bei gleicher Elongationsrate deutlich häufiger eine neue Replikationsgabel gestartet wird. In den Lymphozyten der jungen Brustkrebspatientinnen müssen somit genetische Veränderungen vorliegen, die eine geringe Verlangsamung der Elongationsrate bewirken bei gleichzeitiger Kompensation durch ein erhöhtes Feuern von Replikationsgabeln.

Dies entspricht dem Phänotyp, der generell beobachtet wird, wenn genetische Defekte in der Homologen Rekombination oder der Zellzykluskontrolle vorliegen, wie sie in den Tab. 8 und 9 aufgelistet wurden. Hier zeigte sich bei einem Defekt in PALB2, RAD51, PTEN oder TP53 einerseits eine verminderte Elongationsrate, welche die jeweiligen Zellen durch ein

vermehrtes Feuern von Replikationsgabeln versuchen zu kompensieren (Nikkilä et al. 2013, Parplys et al. 2015, Rieckhoff et al. 2020, Singh et al. 2017).

Damit könnten die Daten der Hamburger Studie erstmalig ein Hinweis darauf ergeben, dass bei den jungen Brustkrebspatientinnen genetische Veränderungen in der Homologen Rekombination oder der Zellzykluskontrolle vorliegen, die zu diesem abweichenden Verhalten der Lymphozyten führen. Mit diesem Ergebnis wird ebenfalls gezeigt, dass die umfassende Analyse des Replikationsverhaltens an Lymphozyten Hinweise über die möglichen Ursachen einer Krebserkrankung geben kann.

#### **4.4 Ausblick**

Ziel der Hamburger Studie ist es, durch Bestimmung des Replikationsverhaltens der Lymphozyten von jungen Brustkrebspatientinnen weitere Gene zu identifizieren, die an der Entstehung von Brustkrebs bei jungen Frauen beteiligt sind. Wie die hier dargestellten Daten zeigen, deutet das abweichende Replikationsverhalten in den Lymphozyten an, dass hierfür vor allem Gene in der Homologen Rekombination sowie der Zellzykluskontrolle in Frage kommen. Hier sollte die geplante Sequenzierung der entsprechenden Gene weitere Information liefern. Im Rahmen dieses Projekts wurde dafür bereits die Isolierung der DNA durchgeführt.

Aufbauend auf diesen Daten kann dann langfristig ein Analysesystem bestehend aus funktionellen Tests wie dem DNA-Fiber Assay sowie genetischen Tests entwickelt werden, welches es ermöglicht, für eine junge Frau bei einem befürchteten Risiko für Brustkrebs, das tatsächliche Risiko zu bestimmen. Gleichzeitig bietet dieser Ansatz die Möglichkeit, entsprechende Therapien individuell zu entwickeln.

## 5. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ABRAXAS1	<i>BRCA1 A complex subunit abraxas 1</i>
altNHEJ	<i>Alternatives non-homologous end joining</i>
ATM	<i>Ataxia-telangiectasia mutated</i>
BARD1	<i>BRCA1 Associated RING Domain 1 Protein</i>
BRCA1	<i>Breast cancer susceptibility gene 1</i>
BRCA2	<i>Breast cancer susceptibility gene 2</i>
BRCC36	<i>BRCA1/BRCA2-Containing Complex, Subunit 3</i>
BRCT	<i>BRCA1 C Terminus Domäne</i>
BRIP1	<i>BRCA1-interacting protein C-terminal helicase 1</i>
bzw.	Beziehungsweise
ChAM	<i>Chromatin association motif</i>
CDK1	<i>Cyclin-dependent kinase 1</i>
CDK2	<i>Cyclin-dependent kinase 2</i>
CldU	Chlordesoxyuridin
CT	Computertomographie
CtIP	<i>CtBP-interacting protein</i>
DBD	DNA-Bindungsdomäne
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNA-PKcs	<i>DNA-Dependent Protein Kinase Catalytic Subunit</i>
DSB	DNA-Doppelstrangbruch
DSS1	<i>Deleted in split-hand/split-foot syndrome</i>
et al.	Und andere
FANCM	<i>Fanconi anemia, complementation group M</i>
ggf.	Gegebenenfalls
Gy	Gray
H <sub>2</sub> O	Wasser
HCL	Chlorwasserstoff
Her2	<i>Human epidermal growth receptor-2</i>
HR	Homologe Rekombination
HU	Hydroxyurea
IdU	Iododesoxyuridin
kb/m	Kilobasen pro Minute
Ki-67	Nukleäres Protein und Proliferationsmarker Ki-67
Ku70/80	Heterodimerkomplex aus XRCC6 und XRCC5
Ku80	Proteinprodukt des XRCC5 Gens
LumA	Luminal-A
LumB	Luminal-B
MERIT40	Teil des RAP80 Komplexes (ABRAXAS1, MERIT40, BRCC45, BRCC36)
METABRIC	Molecular Taxonomy of Breast Cancer International Consortium
min	Minuten
MORF4L1	<i>Mortality Factor 4 Like 1 Gen</i>
MRE11	DNA-Doppelstrangbruch Protein MRE11
MRN	Komplex aus Mre11, Rad50 und NBS1
MRT	Magnetresonanztomographie
mut	Mutiert
NA	Nicht verfügbar
NC	Nicht klassifiziert
Nbs1	Nibrin, Proteinprodukt des NBN Gens
NHEJ	<i>Non-homologous end joining</i>
mRNA	<i>Messenger RNA (ribonucleic acid)</i>
PALB2	<i>Partner and localizer of BRCA2</i>
PARP	<i>Poly ADP ribose polymerase</i>

---

PIKK	<i>PI3-kinase-related protein kinase</i>
Rad50	<i>DNA repair protein RAD50</i>
RAD51	Gen, welches das DNA-Reparaturprotein Rad51 kodiert
RAP80	<i>Receptor-associated protein 80</i>
SCD	<i>SCD, SQ/TQ cluster domain</i>
ssDNA	<i>Single strand DNA</i> , DNA-Einzelstrang
SEM	<i>Standard error of the mean</i> , Standardfehler des Mittelwerts
S-Phase	Synthesephase des Zellzyklus
TOPBP1	<i>DNA topoisomerase 2-binding protein 1</i>
TCGA	<i>The Cancer Genome Atlas</i>
UICC	<i>Union internationale contre le cancer</i>
XLF	<i>XRCC4-like factor</i>
XRCC2	<i>X-Ray Repair Cross Complementing 2</i>
WD40	Interaktionsdomäne eukaryotischer Proteine
WT	Wildtyp
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	Mikromolar
°C	Grad Celsius
%	Prozent

## 6. LITERATURVERZEICHNIS

- Acheampong T, Kehm RD, Terry MB, Argov EL, Tehranifar P (2020) Incidence Trends of Breast Cancer Molecular Subtypes by Age and Race/Ethnicity in the US From 2010 to 2016. *JAMA Netw Open*. 3(8):e2013226.
- Ait Saada A, Lambert SAE, Carr AM (2018) Preserving replication fork integrity and competence via the homologous recombination pathway. *DNA Repair (Amst)*. 71135-147.
- Al Zubaidi T, Gehrlich OHF, Genoia MM, Liu Q, Lu S, Kung J, Xie Y, Schuermann J, Lu HM, Hata AN, et al. (2021) Targeting the DNA replication stress phenotype of KRAS mutant cancer cells. *Sci Rep*. 11(1):3656.
- Althuis MD, Fergenbaum JH, Garcia-Closas M, Brinton LA, Madigan MP, Sherman ME (2004) Etiology of hormone receptor-defined breast cancer: a systematic review of the literature. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 13(10):1558-1568.
- Anders CK, Hsu DS, Broadwater G, Acharya CR, Foekens JA, Zhang Y, Wang Y, Marcom PK, Marks JR, Febbo PG, et al. (2008) Young age at diagnosis correlates with worse prognosis and defines a subset of breast cancers with shared patterns of gene expression. *J Clin Oncol*. 26(20):3324-3330.
- Anders CK, Johnson R, Litton J, Phillips M, Bleyer A (2009) Breast cancer before age 40 years. *Semin Oncol*. 36(3):237-249.
- Antoniou AC, Foulkes WD, Tischkowitz M (2014) Breast-cancer risk in families with mutations in PALB2. *N Engl J Med*. 371(17):1651-1652.
- Azim HA, Jr., Michiels S, Bedard PL, Singhal SK, Criscitiello C, Ignatiadis M, Haibe-Kains B, Piccart MJ, Sotiriou C, Loi S (2012) Elucidating prognosis and biology of breast cancer arising in young women using gene expression profiling. *Clin Cancer Res*. 18(5):1341-1351.
- Bagaria SP, Ray PS, Sim MS, Ye X, Shamonki JM, Cui X, Giuliano AE (2014) Personalizing breast cancer staging by the inclusion of ER, PR, and HER2. *JAMA Surg*. 149(2):125-129.
- Benedict B, van Harn T, Dekker M, Hermsen S, Kucukosmanoglu A, Pieters W, Delzenne-Goette E, Dorsman JC, Petermann E, Foijer F, et al. (2018) Loss of p53 suppresses replication-stress-induced DNA breakage in G1/S checkpoint deficient cells. *Elife*. 7.
- Berti M, Cortez D, Lopes M (2020) The plasticity of DNA replication forks in response to clinically relevant genotoxic stress. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 21(10):633-651.
- Biber S, Wiesmüller L (2021) Analysis of Replication Dynamics Using the Single-Molecule DNA Fiber Spreading Assay. *Methods Mol Biol*. 226757-71.
- Boonen R, Rodrigue A, Stoepker C, Wiegant WW, Vroiling B, Sharma M, Rother MB, Celosse N, Vreeswijk MPG, Couch F, et al. (2019) Functional analysis of genetic variants in the high-risk breast cancer susceptibility gene PALB2. *Nat Commun*. 10(1):5296.
- Borgmann K, Köcher S, Kriegs M, Mansour WY, Parplys AC, Rieckmann T, Rothkamm K (2016) DNA Repair. *Recent Results Cancer Res*. 198:1-24.
- Conti C, Saccà B, Herrick J, Lalou C, Pommier Y, Bensimon A (2007) Replication fork velocities at adjacent replication origins are coordinately modified during DNA replication in human cells. *Mol Biol Cell*. 18(8):3059-3067.
- Couch FJ, Hart SN, Sharma P, Toland AE, Wang X, Miron P, Olson JE, Godwin AK, Pankratz VS, Olswold C, et al. (2015) Inherited mutations in 17 breast cancer susceptibility genes among a large triple-negative breast cancer cohort unselected for family history of breast cancer. *J Clin Oncol*. 33(4):304-311.
- Couto E, Hemminki K (2007) Estimates of heritable and environmental components of familial breast cancer using family history information. *Br J Cancer*. 96(11):1740-1742.
- Daboussi F, Courbet S, Benhamou S, Kannouche P, Zdzienicka MZ, Debatisse M, Lopez BS (2008) A homologous recombination defect affects replication-fork progression in mammalian cells. *J Cell Sci*. 121(Pt 2):162-166.
- Darby S, McGale P, Correa C, Taylor C, Arriagada R, Clarke M, Cutter D, Davies C, Ewertz M, Godwin J, et al. (2011) Effect of radiotherapy after breast-conserving surgery on 10-year recurrence and 15-year breast cancer death: meta-analysis of individual patient data for 10,801 women in 17 randomised trials. *Lancet*. 378(9804):1707-1716.
- de Sanjosé S, Léoné M, Bérez V, Izquierdo A, Font R, Brunet JM, Louat T, Vilardell L, Borrás J, Viladiu P, et al. (2003) Prevalence of BRCA1 and BRCA2 germline mutations in young breast cancer patients: a population-based study. *Int J Cancer*. 106(4):588-593.
- De Silva S, Tennekoon KH, Karunanayake EH (2019) Overview of the genetic basis toward early detection of breast cancer. *Breast Cancer (Dove Med Press)*. 11:71-80.

- Dikomey E, Borgmann K, Köcher S, Kriegs M, Mansour W, Parpys AC, Rieckmann T, Rothkamm K (2016). Chapter 11 - Radiation DNA damage and use in cancer/therapeutics-translation of radiation modifiers. In *DNA Repair in Cancer Therapy (Second Edition)*, M.R. Kelley, and M.L. Fishel, eds. (Boston: Academic Press), pp. 329-352.
- Dikomey E, Borgmann K, Kriegs M, Mansour W, Petersen C, Rieckmann T (2012). Strahlenempfindlichkeit von Tumorzellen. In *Allgemeine Tumorthherapie*, J. Zeller, and z.H. H., eds. (Heidelberg: ecomed Medizin), pp. 1-20.
- Dungrawala H, Bhat KP, Le Meur R, Chazin WJ, Ding X, Sharan SK, Wessel SR, Sathe AA, Zhao R, Cortez D (2017) RADX Promotes Genome Stability and Modulates Chemosensitivity by Regulating RAD51 at Replication Forks. *Mol Cell*. 67(3):374-386.e375.
- Dunnwald LK, Rossing MA, Li CI (2007) Hormone receptor status, tumor characteristics, and prognosis: a prospective cohort of breast cancer patients. *Breast Cancer Res*. 9(1):R6.
- Ellisen LW, Haber DA (1998) Hereditary breast cancer. *Annu Rev Med*. 49:425-436.
- Erić I, Petek Erić A, Kristek J, Koprivčić I, Babić M (2018) BREAST CANCER IN YOUNG WOMEN: PATHOLOGIC AND IMMUNOHISTOCHEMICAL FEATURES. *Acta Clin Croat*. 57(3):497-502.
- Feng K, Meng X, Liu J, Xing Z, Zhang M, Wang X, Feng Q, Wang X (2020) Update on intraoperative radiotherapy for early-stage breast cancer. *Am J Cancer Res*. 10(7):2032-2042.
- Feng W, Jasin M (2017) BRCA2 suppresses replication stress-induced mitotic and G1 abnormalities through homologous recombination. *Nat Commun*. 8(1):525.
- Fidler MM, Gupta S, Soerjomataram I, Ferlay J, Steliarova-Foucher E, Bray F (2017) Cancer incidence and mortality among young adults aged 20-39 years worldwide in 2012: a population-based study. *Lancet Oncol*. 18(12):1579-1589.
- Frum RA, Singh S, Vaughan C, Mukhopadhyay ND, Grossman SR, Windle B, Deb S, Deb SP (2014) The human oncoprotein MDM2 induces replication stress eliciting early intra-S-phase checkpoint response and inhibition of DNA replication origin firing. *Nucleic Acids Res*. 42(2):926-940.
- Fulford LG, Reis-Filho JS, Ryder K, Jones C, Gillett CE, Hanby A, Easton D, Lakhani SR (2007) Basal-like grade III invasive ductal carcinoma of the breast: patterns of metastasis and long-term survival. *Breast Cancer Res*. 9(1):R4.
- Ghiam AF, Spayne J, Lee J (2014) Current challenges and future perspectives of radiotherapy for locally advanced breast cancer. *Curr Opin Support Palliat Care*. 8(1):46-52.
- Gómez-Flores-Ramos L, Álvarez-Gómez RM, Villarreal-Garza C, Wegman-Ostrosky T, Mohar A (2017) Breast cancer genetics in young women: What do we know? *Mutat Res Rev Mutat Res*. 774:33-45.
- Hanahan D, Weinberg RA (2000) The hallmarks of cancer. *Cell*. 100(1):57-70.
- Hanahan D, Weinberg RA (2011) Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 144(5):646-674.
- Hepel JT, Leonard KL, Rivard M, Benda R, Pittier A, Mastras D, Sha S, Smith L, Kerley M, Kocheril PG, et al. (2021) Multi-institutional registry study evaluating the feasibility and toxicity of accelerated partial breast irradiation using noninvasive image-guided breast brachytherapy. *Brachytherapy*. 20(3):631-637.
- Huang J, Chan PS, Lok V, Chen X, Ding H, Jin Y, Yuan J, Lao XQ, Zheng ZJ, Wong MC (2021) Global incidence and mortality of breast cancer: a trend analysis. *Aging (Albany NY)*. 13(4):5748-5803.
- Ibarra A, Schwob E, Méndez J (2008) Excess MCM proteins protect human cells from replicative stress by licensing backup origins of replication. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 105(26):8956-8961.
- Isakoff SJ (2010) Triple-negative breast cancer: role of specific chemotherapy agents. *Cancer J*. 16(1):53-61.
- Jackson DA, Pombo A (1998) Replicon clusters are stable units of chromosome structure: evidence that nuclear organization contributes to the efficient activation and propagation of S phase in human cells. *J Cell Biol*. 140(6):1285-1295.
- Johnson RH, Anders CK, Litton JK, Ruddy KJ, Bleyer A (2018) Breast cancer in adolescents and young adults. *Pediatr Blood Cancer*. 65(12):e27397.
- Kastan MB, Bartek J (2004) Cell-cycle checkpoints and cancer. *Nature*. 432(7015):316-323.
- Katalinic A, Eisemann N, Kraywinkel K, Nofzt MR, Hübner J (2020) Breast cancer incidence and mortality before and after implementation of the German mammography screening program. *Int J Cancer*. 147(3):709-718.
- Kataoka A, Iwamoto T, Tokunaga E, Tomotaki A, Kumamaru H, Miyata H, Niikura N, Kawai M, Anan K, Hayashi N, et al. (2016) Young adult breast cancer patients have a poor prognosis independent of prognostic clinicopathological factors: a study from the Japanese Breast Cancer Registry. *Breast Cancer Res Treat*. 160(1):163-172.
- Klusmann I, Rodewald S, Müller L, Friedrich M, Wienken M, Li Y, Schulz-Heddergott R, Dobbelsstein M (2016) p53 Activity Results in DNA Replication Fork Processivity. *Cell Rep*. 17(7):1845-1857.

- Kockler ZW, Osia B, Lee R, Musmaker K, Malkova A (2021) Repair of DNA Breaks by Break-Induced Replication. *Annu Rev Biochem.* 90:165-191.
- Köhler C, Koalick D, Fabricius A, Parplys AC, Borgmann K, Pospiech H, Grosse F (2016) Cdc45 is limiting for replication initiation in humans. *Cell Cycle.* 15(7):974-985.
- Kotsantis P, Petermann E, Boulton SJ (2018) Mechanisms of Oncogene-Induced Replication Stress: Jigsaw Falling into Place. *Cancer Discov.* 8(5):537-555.
- Kotsantis P, Silva LM, Irmscher S, Jones RM, Folkes L, Gromak N, Petermann E (2016) Increased global transcription activity as a mechanism of replication stress in cancer. *Nat Commun.* 7:13087.
- Kötter A, Cornils K, Borgmann K, Dahm-Daphi J, Petersen C, Dikomey E, Mansour WY (2014) Inhibition of PARP1-dependent end-joining contributes to Olaparib-mediated radiosensitization in tumor cells. *Mol Oncol.* 8(8):1616-1625.
- Laurberg T, Lyngholm CD, Christiansen P, Alsner J, Overgaard J (2016) Long-term age-dependent failure pattern after breast-conserving therapy or mastectomy among Danish lymph-node-negative breast cancer patients. *Radiother Oncol.* 120(1):98-106.
- Le Calvez-Kelm F, Oliver J, Damiola F, Forey N, Robinot N, Durand G, Voegelé C, Vallée MP, Byrnes G, Registry BC, et al. (2012) RAD51 and breast cancer susceptibility: no evidence for rare variant association in the Breast Cancer Family Registry study. *PLoS One.* 7(12):e52374.
- Leclère B, Molinié F, Trétarre B, Stracci F, Daubisse-Marliac L, Colonna M (2013) Trends in incidence of breast cancer among women under 40 in seven European countries: a GRELL cooperative study. *Cancer Epidemiol.* 37(5):544-549.
- Lecona E, Fernández-Capetillo O (2014) Replication stress and cancer: it takes two to tango. *Exp Cell Res.* 329(1):26-34.
- Lee JK, Choi YL, Kwon M, Park PJ (2016) Mechanisms and Consequences of Cancer Genome Instability: Lessons from Genome Sequencing Studies. *Annu Rev Pathol.* 11:283-312.
- Li Y, Lu S, Zhang Y, Wang S, Liu H (2021) Loco-regional recurrence trend and prognosis in young women with breast cancer according to molecular subtypes: analysis of 1099 cases. *World J Surg Oncol.* 19(1):113.
- Llombart-Cussac A, Cortés J, Paré L, Galván P, Bermejo B, Martínez N, Vidal M, Pernas S, López R, Muñoz M, et al. (2017) HER2-enriched subtype as a predictor of pathological complete response following trastuzumab and lapatinib without chemotherapy in early-stage HER2-positive breast cancer (PAMELA): an open-label, single-group, multicentre, phase 2 trial. *Lancet Oncol.* 18(4):545-554.
- Lofterød T, Frydenberg H, Flote V, Eggen AE, McTiernan A, Mortensen ES, Akslen LA, Reitan JB, Wilsgaard T, Thune I (2020) Exploring the effects of lifestyle on breast cancer risk, age at diagnosis, and survival: the EBBA-Life study. *Breast Cancer Res Treat.* 182(1):215-227.
- Lund MJ, Trivers KF, Porter PL, Coates RJ, Leyland-Jones B, Brawley OW, Flagg EW, O'Regan RM, Gabram SG, Eley JW (2009) Race and triple negative threats to breast cancer survival: a population-based study in Atlanta, GA. *Breast Cancer Res Treat.* 113(2):357-370.
- Macheret M, Halazonetis TD (2015) DNA replication stress as a hallmark of cancer. *Annu Rev Pathol.* 10:425-448.
- Mansour WY, Borgmann K, Petersen C, Dikomey E, Dahm-Daphi J (2013) The absence of Ku but not defects in classical non-homologous end-joining is required to trigger PARP1-dependent end-joining. *DNA Repair (Amst).* 12(12):1134-1142.
- Mansour WY, Rhein T, Dahm-Daphi J (2010) The alternative end-joining pathway for repair of DNA double-strand breaks requires PARP1 but is not dependent upon microhomologies. *Nucleic Acids Res.* 38(18):6065-6077.
- Mansour WY, Schumacher S, Roskopf R, Rhein T, Schmidt-Petersen F, Gatzemeier F, Haag F, Borgmann K, Willers H, Dahm-Daphi J (2008) Hierarchy of nonhomologous end-joining, single-strand annealing and gene conversion at site-directed DNA double-strand breaks. *Nucleic Acids Res.* 36(12):4088-4098.
- Maréchal A, Zou L (2013) DNA damage sensing by the ATM and ATR kinases. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 5(9):a012716.
- Masai H, Matsumoto S, You Z, Yoshizawa-Sugata N, Oda M (2010) Eukaryotic chromosome DNA replication: where, when, and how? *Annu Rev Biochem.* 79:89-130.
- Matuschek C, Bölke E, Roth SL, Orth K, Lang I, Bojar H, Janni JW, Audretsch W, Nestle-Kraemling C, Lammering G, et al. (2012) Long-term outcome after neoadjuvant radiochemotherapy in locally advanced noninflammatory breast cancer and predictive factors for a pathologic complete remission : results of a multivariate analysis. *Strahlenther Onkol.* 188(9):777-781.
- Méchal M (2010) Eukaryotic DNA replication origins: many choices for appropriate answers. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 11(10):728-738.
- Mehta A, Haber JE (2014) Sources of DNA double-strand breaks and models of recombinational DNA repair. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 6(9):a016428.

- Meyer F, Becker S, Classen S, Parpys AC, Mansour WY, Riepen B, Timm S, Ruebe C, Jasin M, Wikman H, et al. (2020) Prevention of DNA Replication Stress by CHK1 Leads to Chemoresistance Despite a DNA Repair Defect in Homologous Recombination in Breast Cancer. *Cells*. 9(1):238.
- Midha MK, Huang YF, Yang HH, Fan TC, Chang NC, Chen TH, Wang YT, Kuo WH, Chang KJ, Shen CY, et al. (2020) Comprehensive Cohort Analysis of Mutational Spectrum in Early Onset Breast Cancer Patients. *Cancers (Basel)*. 12(8):2089.
- Momenimovahed Z, Salehiniya H (2019) Epidemiological characteristics of and risk factors for breast cancer in the world. *Breast Cancer (Dove Med Press)*. 11:151-164.
- Narod SA (2012) Breast cancer in young women. *Nat Rev Clin Oncol*. 9(8):460-470.
- Nikkilä J, Parpys AC, Pylkäs K, Bose M, Huo Y, Borgmann K, Rapakko K, Nieminen P, Xia B, Pospiech H, et al. (2013) Heterozygous mutations in PALB2 cause DNA replication and damage response defects. *Nat Commun*. 4:2578.
- Offersen BV, Alsner J, Nielsen HM, Jakobsen EH, Nielsen MH, Krause M, Stenbygaard L, Mjaaland I, Schreiber A, Kasti UM, et al. (2020) Hypofractionated Versus Standard Fractionated Radiotherapy in Patients With Early Breast Cancer or Ductal Carcinoma In Situ in a Randomized Phase III Trial: The DBCG HYPO Trial. *J Clin Oncol*. 38(31):3615-3625.
- Paracha N, Reyes A, Diéras V, Krop I, Pivot X, Urruticoechea A (2020) Evaluating the clinical effectiveness and safety of various HER2-targeted regimens after prior taxane/trastuzumab in patients with previously treated, unresectable, or metastatic HER2-positive breast cancer: a systematic review and network meta-analysis. *Breast Cancer Res Treat*. 180(3):597-609.
- Parpys AC, Petermann E, Petersen C, Dikomey E, Borgmann K (2012) DNA damage by X-rays and their impact on replication processes. *Radiother Oncol*. 102(3):466-471.
- Parpys AC, Seelbach JI, Becker S, Behr M, Wrona A, Jend C, Mansour WY, Joosse SA, Stuerzbecher HW, Pospiech H, et al. (2015) High levels of RAD51 perturb DNA replication elongation and cause unscheduled origin firing due to impaired CHK1 activation. *Cell Cycle*. 14(19):3190-3202.
- Pathania S, Bade S, Le Guillou M, Burke K, Reed R, Bowman-Colin C, Su Y, Ting DT, Polyak K, Richardson AL, et al. (2014) BRCA1 haploinsufficiency for replication stress suppression in primary cells. *Nat Commun*. 5:5496.
- Petermann E, Maya-Mendoza A, Zachos G, Gillespie DA, Jackson DA, Caldecott KW (2006) Chk1 requirement for high global rates of replication fork progression during normal vertebrate S phase. *Mol Cell Biol*. 26(8):3319-3326.
- Peto R, Davies C, Godwin J, Gray R, Pan HC, Clarke M, Cutter D, Darby S, McGale P, Taylor C, et al. (2012) Comparisons between different polychemotherapy regimens for early breast cancer: meta-analyses of long-term outcome among 100,000 women in 123 randomised trials. *Lancet*. 379(9814):432-444.
- Phuah SY, Looi LM, Hassan N, Rhodes A, Dean S, Taib NA, Yip CH, Teo SH (2012) Triple-negative breast cancer and PTEN (phosphatase and tensin homologue) loss are predictors of BRCA1 germline mutations in women with early-onset and familial breast cancer, but not in women with isolated late-onset breast cancer. *Breast Cancer Res*. 14(6):R142.
- Poli J, Tsaponina O, Crabbé L, Keszthelyi A, Pantesco V, Chabes A, Lengronne A, Pasero P (2012) dNTP pools determine fork progression and origin usage under replication stress. *Embo j*. 31(4):883-894.
- Primo LMF, Teixeira LK (2019) DNA replication stress: oncogenes in the spotlight. *Genet Mol Biol*. 43(1 suppl 1):e20190138.
- Puhalla S, Bhattacharya S, Davidson NE (2012) Hormonal therapy in breast cancer: a model disease for the personalization of cancer care. *Mol Oncol*. 6(2):222-236.
- Qiu Z, Oleinick NL, Zhang J (2018) ATR/CHK1 inhibitors and cancer therapy. *Radiother Oncol*. 126(3):450-464.
- Quinet A, Carvajal-Maldonado D, Lemacon D, Vindigni A (2017). DNA Fiber Analysis: Mind the Gap! In *Methods in Enzymology*, B.F. Eichman, ed. (Academic Press), pp. 55-82.
- Rickman KA, Noonan RJ, Lach FP, Sridhar S, Wang AT, Abhyankar A, Huang A, Kelly M, Auerbach AD, Smogorzewska A (2020) Distinct roles of BRCA2 in replication fork protection in response to hydroxyurea and DNA interstrand cross-links. *Genes Dev*. 34(11-12):832-846.
- Rieckhoff J, Meyer F, Classen S, Zielinski A, Riepen B, Wikman H, Petersen C, Rothkamm K, Borgmann K, Parpys AC (2020) Exploiting Chromosomal Instability of PTEN-Deficient Triple-Negative Breast Cancer Cell Lines for the Sensitization against PARP1 Inhibition in a Replication-Dependent Manner. *Cancers (Basel)*. 12(10):2809.
- RKI (2019) Zentrum Für Krebsregisterdaten - Brustkrebs (Rober Koch Institut) [www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/Brustkrebs/brustkrebs\\_node.html](http://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/Brustkrebs/brustkrebs_node.html).
- Rogoża-Janiszewska E, Malińska K, Górski B, Scott RJ, Cybulski C, Kluźniak W, Lener M, Jakubowska A, Gronwald J, Huzarski T, et al. (2021) Prevalence of germline TP53 variants among early-onset breast cancer patients from Polish population. *Breast Cancer*. 28(1):226-235.

- Rothkamm K, Krüger I, Thompson LH, Löbrich M (2003) Pathways of DNA double-strand break repair during the mammalian cell cycle. *Mol Cell Biol.* 23(16):5706-5715.
- Ruhstaller T, Giobbie-Hurder A, Colleoni M, Jensen MB, Ejlertsen B, de Azambuja E, Neven P, Láng I, Jakobsen EH, Gladiëff L, et al. (2019) Adjuvant Letrozole and Tamoxifen Alone or Sequentially for Postmenopausal Women With Hormone Receptor-Positive Breast Cancer: Long-Term Follow-Up of the BIG 1-98 Trial. *J Clin Oncol.* 37(2):105-114.
- Schlacher K, Christ N, Siaud N, Egashira A, Wu H, Jasin M (2011) Double-strand break repair-independent role for BRCA2 in blocking stalled replication fork degradation by MRE11. *Cell.* 145(4):529-542.
- Schlacher K, Wu H, Jasin M (2012) A distinct replication fork protection pathway connects Fanconi anemia tumor suppressors to RAD51-BRCA1/2. *Cancer Cell.* 22(1):106-116.
- Schoonen P, Llobet S, van Vugt M (2018) Replication stress: Driver and therapeutic target in genomically instable cancers. *Adv Protein Chem Struct Biol.* 115:157-201.
- Siddig A, Tengku Din T, Mohd Nafi SN, Yahya MM, Sulong S, Wan Abdul Rahman WF (2021) The Unique Biology behind the Early Onset of Breast Cancer. *Genes (Basel).* 12(3):372.
- Singh S, Vaughan CA, Frum RA, Grossman SR, Deb S, Palit Deb S (2017) Mutant p53 establishes targetable tumor dependency by promoting unscheduled replication. *J Clin Invest.* 127(5):1839-1855.
- Slavin TP, Maxwell KN, Lilyquist J, Vijai J, Neuhausen SL, Hart SN, Ravichandran V, Thomas T, Maria A, Villano D, et al. (2017) The contribution of pathogenic variants in breast cancer susceptibility genes to familial breast cancer risk. *NPJ Breast Cancer.* 3:22.
- Sokka M, Koalick D, Hemmerich P, Syväoja JE, Pospiech H (2018) The ATR-Activation Domain of TopBP1 Is Required for the Suppression of Origin Firing during the S Phase. *Int J Mol Sci.* 19(8):2376.
- Sokka M, Parkkinen S, Pospiech H, Syväoja JE (2010) Function of TopBP1 in genome stability. *Subcell Biochem.* 50:119-141.
- Somyajit K, Saxena S, Babu S, Mishra A, Nagaraju G (2015) Mammalian RAD51 paralogs protect nascent DNA at stalled forks and mediate replication restart. *Nucleic Acids Res.* 43(20):9835-9855.
- Srinivasan SV, Dominguez-Sola D, Wang LC, Hyrien O, Gautier J (2013) Cdc45 is a critical effector of myc-dependent DNA replication stress. *Cell Rep.* 3(5):1629-1639.
- Sundquist M, Thorstenson S, Brudin L, Wingren S, Nordenskjöld B (2002) Incidence and prognosis in early onset breast cancer. *Breast.* 11(1):30-35.
- Syljuåsen RG, Sørensen CS, Hansen LT, Fugger K, Lundin C, Johansson F, Helleday T, Sehested M, Lukas J, Bartek J (2005) Inhibition of human Chk1 causes increased initiation of DNA replication, phosphorylation of ATR targets, and DNA breakage. *Mol Cell Biol.* 25(9):3553-3562.
- Tao L, Schwab RB, San Miguel Y, Gomez SL, Canchola AJ, Gago-Dominguez M, Komenaka IK, Murphy JD, Molinolo AA, Martinez ME (2019) Breast Cancer Mortality in Older and Younger Patients in California. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 28(2):303-310.
- Técher H, Koundrioukoff S, Nicolas A, Debatisse M (2017) The impact of replication stress on replication dynamics and DNA damage in vertebrate cells. *Nat Rev Genet.* 18(9):535-550.
- Tovey SM, Brown S, Doughty JC, Mallon EA, Cooke TG, Edwards J (2009) Poor survival outcomes in HER2-positive breast cancer patients with low-grade, node-negative tumours. *Br J Cancer.* 100(5):680-683.
- Vilenchik MM, Knudson AG (2003) Endogenous DNA double-strand breaks: production, fidelity of repair, and induction of cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100(22):12871-12876.
- Wendt C, Margolin S (2019) Identifying breast cancer susceptibility genes - a review of the genetic background in familial breast cancer. *Acta Oncol.* 58(2):135-146.
- Wilhelm T, Magdalou I, Barascu A, Técher H, Debatisse M, Lopez BS (2014) Spontaneous slow replication fork progression elicits mitosis alterations in homologous recombination-deficient mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 111(2):763-768.
- Wörmann B, Aebi S, Balic M, Decker T, Fehm T, Greil R, Harbeck N, Krug B, Overkamp F, Rick O, et al. (2018) Mammakarzinom der Frau. *Onkopedia Leitlinien.*
- Yerushalmi R, Woods R, Ravdin PM, Hayes MM, Gelmon KA (2010) Ki67 in breast cancer: prognostic and predictive potential. *Lancet Oncol.* 11(2):174-183.

## 7. DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich meinen Dank nachstehenden Personen entgegenbringen, ohne deren Mithilfe die Anfertigung dieser Promotionsschrift niemals zustande gekommen wäre:

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Kerstin Borgmann, meiner Doktormutter für die zuverlässige Betreuung und Unterstützung bei der Durchführung der gesamten Arbeit.

Außerdem möchte ich mich bedanken bei Frau Dr. Ann Christin Parplys für die geduldige Einarbeitung in die experimentelle Methodik und die liebevolle Betreuung während meiner Zeit im Labor.

Ich bedanke mich auch beim ganzen Team des Labors für Strahlenbiologie und Radioonkologie des UKE, das mich während der Zeit dort unterstützt hat, die Zusammenarbeit hat großen Spaß gemacht.

Meiner Familie und meinen Freunden danke ich für ihre Ermutigungen und Zusprüche während des Studiums und der Arbeit an dieser Dissertation.

Insbesondere aber danke ich meinem Vater für die Unterstützung und die Hilfe bei allen meinen Schritten, solange ich denken kann.

## **8. LEBENSLAUF**

Lebenslauf wurde aus datenschutzrechtlichen Gründen entfernt

## 9. EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG

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

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

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

Unterschrift: .....

Helene Dikomey