Universitätsklinikum Ulm
Abteilung Humangenetik
Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. W. Vogel

# Charakterisierung der Mutagensensitivität von Lymphozyten und lymphoblastoiden Zelllinien mit *BRCA*-Mutationen

Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades
der Humanbiologie (Dr. biol. Hum.)
der Medizinischen Fakultät
der Universität Ulm

vorgelegt von
Kristina Trenz
aus Stuttgart

Ulm, 2003

Amtierender Dekan: Prof. Dr. R. Marre
1.Berichterstatter: Prof. Dr. G. Speit
2. Berichterstatter: Prof. Dr. H.U. Wolf
Tag der Promotion: 14.11.03

**INHALTSVERZEICHNIS**


**1 Einleitung** **7**

1.1 Brustkrebs und die Bedeutung von *BRCA*-Mutationen 7

1.2 Die Brustkrebssuszeptibilitätsgene *BRCA1* und *BRCA2* 8

1.2.1 Struktur von *BRCA1* und *BRCA2* 8

1.2.2 Funktionen von BRCA1 und BRCA2 9

1.2.3 Expression von *BRCA1* und *BRCA2* 12

1.3 DNA-Reparaturmechanismen und Krebs 12

1.4 Brustkrebs und Mutagensensitivität 14

1.5 Testsysteme zum Nachweis von Mutagensensitivität 15

1.5.1 Der Mikronukleustest 16

1.5.2 Der Comet-Assay 18

1.6 Fragestellung der Arbeit 20

**2 Material und Methoden** **22**

2.1 Material 22

2.1.1 Zellen 22

2.1.2 Testagenzien 25

2.1.3 Chemikalien 28

2.1.4 Geräte und Materialien 31

2.1.5 Lösungen, Medien und Puffer 32

2.1.6 Reagenziensyteme (Kits) 36

2.1.7 Primer 36

2.2 Methoden 37

2.2.1 Chromosomenanalyse 37

2.2.2 Mikronukleustest (MNT) 38

2.2.3 Schwesterchromatidaustauschtest (SCE-Test) 41

2.2.4 Comet-Assay (Einzelzellgelelektrophorese) 42

2.2.5 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) 46

2.2.6 Sequenzierung 55

2.2.7 Toxizitätstests 59

2.2.8 Pulsfeld Gelelektrophorese (PFGE) 60

2.2.9 Expressionsbestimmung mit dem Lightcycler 62

2.2.10 Statistik 68

**3 Ergebnisse** **69**
3.1 Mutagensensitivität von Lymphozyten BRCA-heterozygoter Frauen 69
3.1.1 Mutagensensitivität im Mikronukleustest 69
3.1.2 Mutagensensitivität im Comet-Assay 88
3.2 Untersuchungen zur Mutagensensitivität von lymphoblastoiden Zelllinien (LCL) 94
3.2.1 Sequenzierung des *BRCA1*-Gens 94
3.2.2 Chromosomenanalyse der LCL 94
3.2.3 Mutagensensitivität im Mikronukleustest 96
3.2.4 Toxizitätstests 100
3.2.5 Mutagensensitivität im Comet-Assay 106
3.2.6 Comet-FISH 114
3.2.7 Nachweis von Mutagensensitivität mittels der Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE) 122
3.2.8 Bestimmung der *BRCA1*-Expression mit dem Lightcycler 127
**4 Diskussion** **133**
4.1 Bedeutung der BRCA Mutationen für chromosomale Strahlensensitivität 134
4.2 Mutagensensitivität und die Funktionen von BRCA1 141
4.3 Lymphoblastoide Zelllinien mit *BRCA1*-Mutation als Modell für Untersuchungen zur Mutagensensitivität 149
**5 Zusammenfassung** **158**
**6 Literaturverzeichnis** **160**

# ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

| | |
|---|---|
| BCNU | 1,3-bis(2-chlor-ethyl)nitrosurea |
| BER | Basenexzisionsreparatur |
| BLM | Bleomycin |
| BNC | Binuclear cells (zweikernige Zellen) |
| bp | Base pair (Basenpaar) |
| BrdU | Bromdesoxyuridin |
| BSA | Bovine serum albumine (Rinderserumalbumin) |
| CDDP | Cisplatin |
| cDNA | complementary DNA (komplementäre DNA) |
| CP | Cyclophosphamid |
| CP | Crossing Point |
| DAPI | 4,6-Diamino-2-phenylindol |
| DEPC | Diethylpyrocarbonat |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| dNTP | Desoxy-Nukleotidtriphosphate |
| DSB | double strand break (Doppelstrangbruch) |
| EBV | Epstein-Barr-Virus |
| EDTA | Ethylendiaminotetraacetat |
| ENU | N-Ethyl-N-nitrosurea |
| FDA | Fluorescein Diacetat |
| FISH | Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung |
| Gy | Gray |
| HBSS | Hanks balanced salt solution |
| HR | Homologe Rekombination |
| kDa | KiloDalton |
| LCL | Lymphoblastoid cell lines (lymphoblastoide Zelllinien) |
| MN | Mironukleus /Mikronuklei |
| MNT | Mikronukleustest |
| NDI | Nuclear division index (Kernteilungsindex) |
| NER | Nukleotidexzisionsreparatur |
| NHEJ | Non-homologous-end-joinig |
| PBS | Phosphate buffer saline |
| PCR | Polymerase chain reaction (Polymerase Kettenreaktion) |
| PFGE | Pulsfeld-Gelelektrophorese |
| rpm | Rotations per minute (Umdrehungen pro Minute) |
| SCE | Sister chromatid exchange (Schwesterchromatidaustausch) |
| SEM | Standard error of the mean (Standardfehler) |
| TAX | Taxol |
| TCR | Trancription coupled repair (Transkriptiongekoppelte Reparatur) |
| VIN | Vincristin |

# 1 Einleitung

## 1.1 Brustkrebs und die Bedeutung von *BRCA*-Mutationen

Brustkrebs ist eine der häufigsten Tumorerkrankungen und betrifft jede zehnte Frau. Etwa 10 % aller Brustkrebserkrankungen sind familiären Ursprungs, wobei die Hälfte dieser Fälle Keimbahnmutationen in einem der beiden Brustkrebs-suszeptibilitätsgene *BRCA1* oder *BRCA2* aufweisen (Venkitaraman, 2001). Trägt eine Frau eine Mutation in einem dieser beiden Gene, so besteht ein Risiko von 30 bis 70% im Laufe ihres Lebens an Brustkrebs zu erkranken (Ford et al., 1998), Variationen in der Anfälligkeit für Brustkrebs sind im genetischen Hintergrund einzelner Personen begründet (Nathanson, 2001). Träger einer *BRCA1*-Mutation besitzen ein zusätzlich erhöhtes Risiko einen Tumor in Ovar, Prostata und Pankreas zu entwickeln. Bei heterozygoten Trägern einer *BRCA2*-Mutation bedingt diese Mutation eine große Anfälligkeit für Brustkrebs und Ovarialkrebs sowie mehrerer anderer Tumore (Übersicht in Rahman und Stratton, 1998, Nathanson et al. 1999). Für die übrigen familiären Fälle von Brustkrebs soll eine geringe Anzahl von anderen Genen verantwortlich sein (Easton et al.,1999).

Durch Kopplungsanalysen wurde herausgefunden, dass in einigen Familien das Krankheitsrisiko mit der Chromosomenregion 17q21 verbunden war (Hall et al.; 1990). Daraufhin wurde das dort lokalisierte *BRCA1*-Gen kloniert (Miki et al., 1994). Ein zweites Brustkrebssuszeptibilitätsgen *BRCA2* wurde auf der Chromosomenregion 13q12 lokalisiert (Wooster et al., 1994; 1995). Eine Analyse des Mutationsspektrums in beiden Genen offenbarte eine Dominanz von kleinen Insertionen und Deletionen, die über das gesamte Gen verteilt auftreten. Darüber hinaus konnten Missens- und Nonsens-Mutationen identifiziert werden. In den meisten Fällen resultierten diese Mutationen in einem verkürzten Protein (Friedman et al., 1994; Castilla et al, 1994; Simard et al., 1994, Breast Cancer Information Core, Bic, http://www.nhgri.nih.gov/Intramural_research/Lab_transfer/Bic). Es konnte keine ausgeprägte Korrelation zwischen einer bestimmten Mutation und dem daraus resultierenden Phänotyp identifiziert werden. Dies liegt zum einen an der geringen zur Verfügung stehenden Datenmenge, zum anderen an der Tatsache, dass weitere genetische und umweltbedingte Faktoren das Krebsrisiko modifizieren können (Gayther et al., 1997). Prädiktive Aussagen über einen bestimmten Genotyp und

dem dadurch begründeten Krebsrisiko lassen sich daher nicht ableiten. Man geht davon aus, dass die Gene *BRCA1* und *BRCA2* als Tumorsupressorgene agieren, da zur Krebsentstehung neben der Keimbahnmutation in BRCA-Genen auch eine somatische Inaktivierung des zweiten Wildtyp-Allels stattfinden muss. Andererseits treten in sporadischen Brustkrebsfällen sehr selten somatische BRCA-Mutationen auf, was für Tumorsupressorgene untypisch ist. Eine mögliche Erklärung für diese Diskrepanz wäre jedoch, dass die genetischen Änderungen in sporadischem Brustkrebs andere Gene betreffen, deren Funktion mit der Funktion von BRCA1 und BRCA2 verbunden ist (Übersicht in Kerr and Ashworth, 2001; Venkitaraman, 2002; Welcsh et al., 2000).

## 1.2 Die Brustkrebssuszeptibilitätsgene *BRCA1* und *BRCA2*

### 1.2.1 Struktur von *BRCA1* und *BRCA2*

Betrachtet man die Aminosäuresequenz der beiden Brustkrebssuszeptibilitätsgene *BRCA1* und *BRCA2*, so sind keine offensichtlichen Homologien zueinander, wie auch zu anderen Proteinen zu erkennen. Auf genomischer Ebene sind jedoch Parallelen erkennbar: beide Gene überspannen einen Bereich von über 80 kb genomischer DNA und haben sehr große Zentralexons, die für mehr als 50% des Proteins kodieren. *BRCA1* ist auf der Chromosomenregion 17q21 lokalisiert und besitzt 24 Exons, wovon 22 Exons für ein Protein mit 1863 Aminosäure kodieren. Das 220 kDa-Protein weist am N-terminalen Ende eine RING-Finger-Domäne auf (Abb.1). RING-Finger sind Zink bindende Domänen, die sich durch ein konserviertes Muster von Cysteinen und Histidinen auszeichnen und Protein-Protein- oder Protein-DNA-Interaktionen vermitteln. Die BRCA1-RING-Domäne interagiert mit der RING-Domäne von BARD1. Am C-terminalen Ende des Proteins befindet sich eine Transaktivierungsdomäne (Chapman and Verma, 1996) und zwei globuläre Domänen mit „tandem repeats“. Diese sogenannten BRCT (BRCA1-carboxyl-terminal) -Domänen sind ein allgemeines Merkmal von Proteinen, die an der DNA-Reparatur und Zellzykluskontrolle beteiligt sind.

Das *BRCA2*-Gen ist auf Chromosom 13q12 lokalisiert und kodiert für ein 3418 Aminosäuren langes Protein (Abb. 1). Das 384 kDa-Protein zeigt keine Ähnlichkeiten mit bisher bekannten Proteinen, einzig in Exon 11 des *BRCA2*-Gens treten 8 BRC-Wiederholungen auf. Diese Region ist, wie auch die BRCT- und die RING-Domäne

des *BRCA1*-Gens, in verschiedenen Säugerspezies hoch konserviert, was auf eine essentielle Funktion hindeutet. Es wurde gezeigt, dass in dieser Region eine Interaktion mit Rad51 stattfindet, ein Protein, das bei Eukaryoten eine wichtige Rolle in der DNA-Reparatur und in der genetischen Rekombination spielt (Wong et al, 1997). Beide BRCA-Proteine werden während der S-Phase am stärksten exprimiert, was auf eine Funktion bei der DNA-Replikation hindeutet. BRCA1 und BRCA2 sind in somatischen Zellen im Zellkern lokalisiert, wo sie in sogenannten „Foci" koexistieren, die sich nach DNA-Schädigung wieder auflösen.

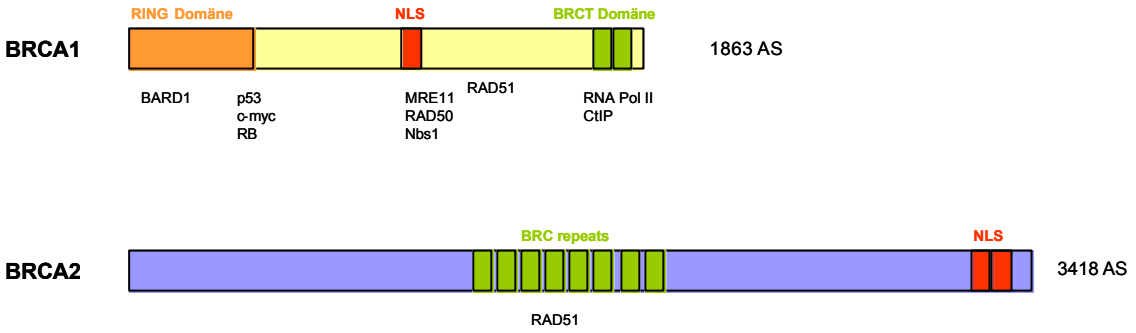



Abb. 1: Struktur des *BRCA1*- und *BRCA2*-Gens mit funktionellen Domänen und einigen Interaktionspartner der beiden Proteine

### 1.2.2 Funktionen von BRCA1 und BRCA2

Die genauen Funktionen der BRCA-Proteine konnten bislang nicht eindeutig aufgeklärt werden. Bislang vorliegende Untersuchungen zeigen jedoch, dass beide in eine Vielzahl von unterschiedlichsten zellulären Prozessen, wie DNA-Reparatur und Rekombination, Zellzykluskontrolle und Transkription involviert sind (Venkitaraman, 2001; 2002). Die Aktivität von BRCA1 wird durch eine Reihe epigenetischer Faktoren wie Phosphorylierung, Ubiquitinierung und Methylierung reguliert (Übersicht Deng and Brodie, 2000). Einige der vielseitigen Funktionen und einige Interaktionspartner von BRCA1 sind in Abb.2 schematisch dargestellt (Übersicht bei Venkitaraman, 2001).

- BRCA1 wird zellzyklusabhängig wie auch nach Schädigung der DNA von ATM (Ataxia Teleangiectasia mutated) und CHK2-Proteinen phosphoryliert (Cortez et al., 1999).

- In brca1-defizienten Fibroblasten der Maus ist ein Verlust des $G_2$-M-Phase „checkpoints“ festgestellt worden, sowie Centrosomenamplifikationen (Xu et al., 1999).
- Das BRCA1-Protein ist Teil des BASC-Komplexes (BRCA1-associated genome surveillance complex), der sowohl an der Erkennung wie auch an der Regulation der Reparatur von abnormalen DNA-Strukturen beteiligt ist. Dieser Komplex beinhaltet die Tumorsupressoren und die DNA-Reparaturproteine MSH2, MSH6, MLH1, ATM, BLM, wie auch den Proteinkomplex aus RAD50, MRE11, NBS1. Ebenfalls enthalten ist der DNA-Replikationsfaktor C (RFC), der die Bindung von PCNA an die DNA vermittelt (Wang et al., 2000).
- Durch Interaktion mit dem Proteinkomplex SWI/SNF ist BRCA1 auch an Veränderungen der Chromatinstruktur beteiligt (Bochar et al., 2000).
- Als Antwort auf DNA-Schäden ist BRCA1 in der Lage die Transkription von GADD45 (Zheng et al., 2000) und p21 (Li et al., 1999) zu regulieren.
- Eine Funktion von BRCA1 in der transkriptionsgekoppelten Reparatur (TCR) oxidativer Schäden wurde zunächst von Gowen et al. (1998) an *brca1*$^{-/-}$ embryonalen Stammzellen von Mäusen festgestellt. Dieser Defekt in der TCR konnte auch an humanen Tumorzellen beobachtet werden (LePage et al., 2000). Durch Einbringen von funktionellem BRCA1 wurde dieser Defekt und die damit verbundene Strahlensensitivität behoben (Abbott et al., 1999).
- Eine wichtige Rolle wird BRCA1 in der homologen Rekombination (HR) zugeschrieben, da es mit dem Proteinkomplex MRE11/RAD50/NBS1, der an der HR beteiligt ist, interagiert (Zhong et al., 1999).
- Sowohl BRCA1, BRCA2 und RAD51 kolokalisieren in mitotischen Zellen in einem BRCA1-BRCA2-RAD51-Komplex (Scully et al, 1997, Chen et al., 1999). Aufgrund der Homologie von RAD51 zu dem bakteriellen RecA wird diesem Komplex eine Funktion in der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen (DSB) durch HR zugeschrieben. Es konnte gezeigt werden, dass brca1- und brca2-defiziente Mauszellen eine große Sensitivität gegenüber DNA-DSB-induzierenden Substanzen aufweisen (Connor et al., 1997; Patel et al., 1998; Sharan et al., 1997; Xu et al., 1999).
- Fanconi Anämia (FA) ist ein Chromosomeninstabilitätssyndrom für das verschiedene Komplementationsgruppen bekannt sind. Der Verlust von FANCD1 führt zu Mutagensensitivität und Chromosomenbrüchen. Es wird

angenommen, dass BRCA2 identisch mit FANCD1 ist, da durch Einbringen von funktionellem BRCA2 in FA-Zellen, die für FA typische Sensitivität gegenüber Mitomycin C, aufgehoben wird (Howlett et al., 2002).

- Ein BRCA2 enthaltender Komplex (mit BRAF35) zeigte sich verantwortlich für die Modulation des Zellzyklus, da er mit kondensiertem Chromatin kolokalisiert (Marmorstein et al., 2001).

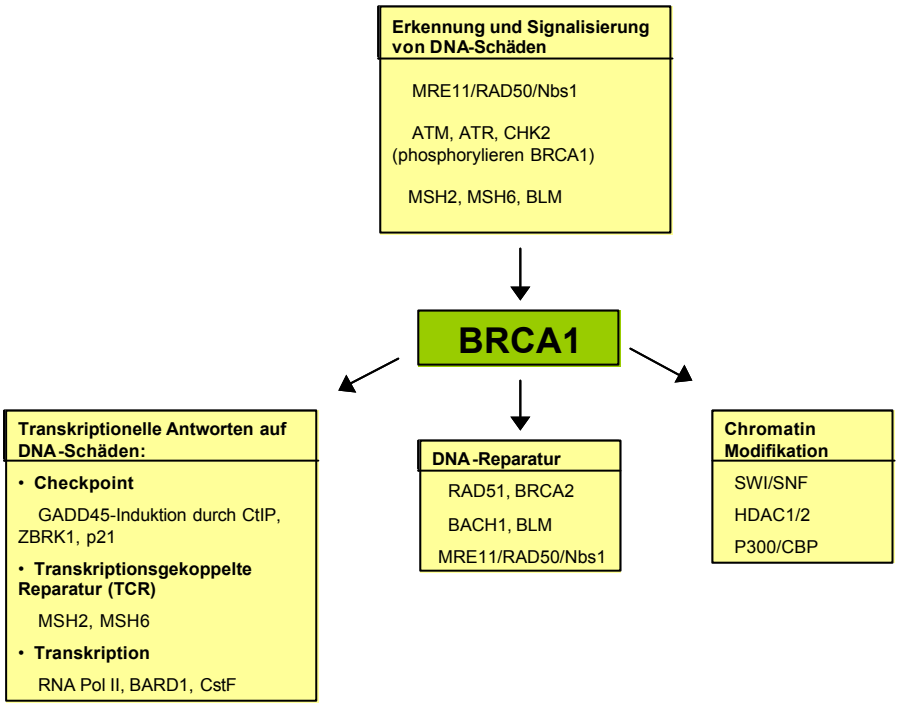



Abb. 2: Einige Interaktionspartner von BRCA1 bei der Antwort auf DNA-Schäden.

Experimente zur Aufklärung der Funktion der Proteine BRCA1 und BRCA2 wurden zumeist an konditionalen Knock-Out-Mäusen, murinen embryonalen Stammzellen, embryonalen Mäusefibroblasten (MEF) und an Tumorzelllinien durchgeführt. Es ist zu beachten, dass die Homologie von murinem brca1 und humanem BRCA1 lediglich 58% beträgt. Brca1-defiziente Mäuseembryos zeichnen sich durch mangelndes Wachstum wie auch durch frühes Absterben aus. Beim Menschen führt das Fehlen von funktionellen BRCA1-Proteins zum unkontrollierten Tumorwachstum. Eine heterozygote Mutation in *BRCA1* oder *BRCA2* stellt im Menschen eine Prädisposition zur Mammakarzinombildung dar, in brca1$^{+/-}$-Mäusen dagegen ist keine verstärkte Brustkrebsbildung zu beobachten. Auch eine Defizienz von brca2 führte in Mäusen zu embryonaler Letalität (Sharan et al., 1997; Patel et al., 1998).

### 1.2.3 Expression von *BRCA1* und *BRCA2*

*BRCA1* und *BRCA2* zeigen ein ähnliches Expressionsmuster und eine ähnliche Lokalisation. Sie werden in vielen Geweben zellzyklusabhängig exprimiert. Die höchste Menge an BRCA-Protein wurde in der S-Phase festgestellt, was auf Funktionen bei der DNA-Replikation schließen lässt. Es ist festgestellt worden, dass die Expression von *BRCA1* mit fortschreitender Entwicklung sporadischer Mammakarzinome stetig verringert wird (Thompson et al., 1995). Bei Untersuchung verschiedener Tumorzelllinien stellte man in allen Zellen eine sehr geringe Expression von *BRCA1* fest (Ribieras et al. 1997). In lymphoblastoiden Zelllinien (LCL) von Frauen mit einer Keimbahnmutation in *BRCA1*, also für *BRCA1*-heterozygote Zellen, wurde nur dann eine geringere Menge an *BRCA1* detektiert, wenn die Mutation zu einem Verlust des Transkripts führt. In diesen Zellen konnte etwa die Hälfte der Transkriptmenge detektiert werden (Ribieras et al., 1997). Andres et al. (1998) und auch Su und Ciftci (2002) konnten zeigen, dass eine Behandlung mit mutagenen Substanzen in verschiedenen Brustkrebszelllinien zu einer verringerten Menge an *BRCA1*- und *BRCA2*-mRNA führte. Dies lässt auf eine direkte Rolle der BRCA-Proteine in der zellulären Antwort auf DNA-Schäden schließen.

## 1.3 DNA-Reparaturmechanismen und Krebs

Krebs entsteht durch Mutationen in Genen, die eine wichtige Funktion in der Kontrolle des Zellwachstums innehaben. Genomische Stabilität ist daher essentiell um die Onkogenese zu verhindern. Im Laufe der Zeit können Veränderungen der DNA akkumuliert werden, die zur Aktivierung von Protoonkogene und zur Inaktivierung von Tumorsupressorgenen führen. Die genetische Stabilität ist gefährdet durch die Induktion von DNA-Schäden und Fehlern in der DNA-Replikationsmaschinerie. Eine zentrale Rolle stellen erworbene oder vererbte Mutationen in „Genomwächtern“ dar, die einen Mutator-Phänotyp erzeugen. Als Genomwächtergene konnten dabei Gene identifiziert werden, die an der DNA-Reparatur, Zellzykluskontrolle und chromosomalen Integrität beteiligt sind. Die Reparatur von geschädigtem Erbgut besitzt dabei eine zentrale Funktion. Sowohl endogene Substanzen, die bei normalen zellulären Stoffwechselprozessen anfallen, wie auch Substanzen aus der Umwelt, wie UV-Licht oder genotoxische Chemikalien, erzeugen eine Vielfalt an verschiedenen DNA-Läsionen. Das Spektrum solcher

Schäden reicht von Einzelstrangbrüchen über oxidative Basenmodifikationen, Alkylierungen, DNA-Vernetzungen („Crosslinks“), Adduktbildungen bis hin zu Doppelstrangbrüchen (DSB). Durch verschiedene Mechanismen der DNA-Reparatur hat eine Zelle die Möglichkeit diese primären DNA-Modifikationen zu beseitigen und somit die Mutationen zu verhindern. Reparaturmechanismen umfassen die Nukleotidexzisionsreparatur (NER), die Basenexzisionsreparatur (BER), Mismatchreparatur (MMR), homologe Rekombination (HR) und non-homologous end joining (NHEJ) (Hoeijemakers, 2001). DNA-Schäden die mit der BER , NER oder MMR behoben werden, betreffen nur einen der beiden DNA-Stränge und können durch Ausschneiden der geschädigten Stelle und komplementäres Auffüllen des Einzelstrangbruchs behoben werden. Die transkriptionsgekoppelte Reparatur (TCR) dient der bevorzugten Reparatur aktiv transkribierter Gene und ist der NER zugehörig. Die Reparatur von DNA-DSB ist dagegen weitaus problematischer, da beide DNA-Stränge betroffen sind und keine Vorlagen für Reparaturvorgänge zur Verfügung stehen. Es wird vermutet, dass Defekte in der zellulären Antwort auf DNA-DSB mit der Tumorigenese assoziiert sind (Khanna und Jackson; 2001). Zwei verschiedene Mechanismen stehen für die Reparatur von DSB zur Verfügung, die HR und das NHEJ. HR kommt vor allem in der S- und $G_2$-Phase des Zellzyklus zum Einsatz, wenn eine zweite Kopie der geschädigten Sequenz vorhanden ist, in der $G_1$-Phase des Zellzyklus wird zumeist das fehlerbelastete NHEJ angewandt. Das NHEJ scheint der am häufigsten verwendete Weg in adulten und differenzierten Zellen zu sein. Liegt in einem der Reparaturmechanismen ein Defekt vor, so prädisponiert dies zur Entstehung von Krebs. Bei der autosomal rezessiv vererbten Krankheit Xeroderma Pigmentosum beispielsweise, liegt ein Defekt in der NER vor, was zu einer mehr als 1000fach erhöhten Inzidenz von Hautkrebs führt. Bei Ataxia Telangiectasia (AT) wie auch dem Nimegen Breakage Syndrom (NBS) ist die DNA-DSB-Reparatur betroffen, was zu der Entstehung von Lymphomen führt, bei dem familiären Kolonkarzinom (HNPCC, hereditary nonpolyposis colon carcinoma) liegt ein Defekt in der MMR vor (Übersicht bei Hoeijmakers, 2001). Werden Zellen dieser Patienten mit ionisierender Strahlung behandelt, so zeigt sich eine erhöhte chromosomale Mutagensensitivität. Eine erhöhte Sensitivität gegenüber ionisierender Strahlung ließ sich ebenfalls bei einem Teil der Brustkrebspatienten feststellen. Strahlung induziert neben einer Vielzahl von Läsionen hauptsächlich DSB, die bei nicht adäquater Reparatur zur Entstehung von

Chromosomenaberrationen führen (Obe et al., 2002). Da eine Kolokalisation von BRCA1 und BRCA2 mit Rad51 beobachtet wurde (Scully et al.,1997; Chen et al.1998, 1999), wird vermutet, dass die BRCA-Proteine in die Reparatur von DSB über den Weg der HR involviert sind. Moynahan et al. (1999) konnten zeigen, dass brca1-defiziente embryonale Stammzellen einen Defekt in der HR der DSB-Reparatur aufweisen. Da entdeckt wurde, dass BRCA1 auch mit RAD50 interagiert (Zhong et al.,1999), stellt sich die Frage, ob BRCA1 ebenfalls in das NHEJ involviert ist. RAD50 bildet zusammen mit Mre11 und p95 einen Komplex, der in HR, NHEJ, meiotische Rekombination und bei der Antwort auf DNA-Schäden aktiv ist (Haber et al., 1998). Die multifunktionelle Rolle von BRCA1 wird durch Entdeckung des BASC-Komplexes gestützt, der sowohl in die Signalisierung von DNA-Schäden wie auch in die DNA-Reparatur involviert ist (Wang et al., 2000; Futaki und Lui, 2001). Eine Funktion von BRCA1 in der Koordination der vielfältigen Aktivitäten des Komplexes wäre denkbar.

## 1.4 Brustkrebs und Mutagensensitivität

Brustkrebspatienten wurden in verschiedenen Studien auf Mutagensensitivität untersucht (Helzlsouer et al., 1995, 1996; Parshad et al., 1996; Patel et al., 1997; Scott et al., 1998, 1999; Rao et al., 1998; Roberts et al., 1999; Burrill et al., 2000; Rothfuss et al., 2000; Roy et al., 2000a; Baria et al., 2001a, 2001b; Riches et al., 2001; Buchholz et al., 2002; Baeyens et al., 2002). Verglichen mit gesunden Kontrollen zeigte ein Teil der Brustkrebspatienten eine erhöhte Sensitivität gegenüber dem chromosomenschädigenden Effekt von ionisierender Strahlung. Es wird daher ein Defekt in der Reparatur strahleninduzierter Schäden vermutet (Parshad et al., 1996; Helzlsouer et al., 1996). Mit Hilfe von Segregationsanalysen konnte die Vererbbarkeit von Strahlensensitivität in Brustkrebsfamilien nachgewiesen werden (Roberts et al., 1999). Der Anteil strahlensensitiver Individuen ist deutlich höher als der Prozentsatz prädisponierter Individuen, die eine Mutation in einem der beiden BRCA-Gene aufweisen (Peto et al., 1999). Es scheint daher naheliegend, dass ein Teil der Brustkrebspatienten Mutationen in Genen mit geringer Penetranz aufweist (Teare et al., 1994; Roberts et al., 1999), die in die DNA-Reparatur involviert sind und somit für die beobachtete Strahlensensitivität in familiärem Brustkrebs verantwortlich sein können. Verschiedene DNA-Reparatur-Genotypen und

Phänotypen scheinen als Marker für Brustkrebssuszeptibilität zu fungieren (Hu et al., 2002). Es zeigte sich in verschiedenen Studien, dass etwa 40 % der Frauen mit Brustkrebs eine erhöhte chromosomale Sensitivität nach Bestrahlung aufwiesen (Scott et al., 1994; Parshad et al., 1996; Baeyens et al., 2002). Einige Untersuchungen zur Strahlensensitivität von Krebspatienten wurden auch an lymphoblastoiden Zelllinien (LCL) durchgeführt. Diese Zelllinien wurden durch Immortalisierung mit dem Epstein-Barr-Virus aus Lymphozyten von Patienten hergestellt (Lavin et al., 1994; Ramsay and Birrell, 1995). Es wurde dort die Strahlensensitivität von Brustkrebspatienten wie auch von Ataxia Telangiectasia Patienten näher untersucht und es konnte ein Teil der LCL als strahlensensitiv klassifiziert werden. Nur in einigen Arbeiten wurde bisher der Zusammenhang zwischen Mutagensensitivität und Mutationen in *BRCA1* und *BRCA2* untersucht. Diese Untersuchungen wurden sowohl an Lymphozyten von Patienten (Rothfuss et al., 2000; Buchholz et al., 2002; Nieuwenhuis et al., 2002) wie auch in Zelllinien (Foray et al., 1999; Nieuwenhuis et al.,2002; Buchholz et al., 2002) durchgeführt. In LCL mit verschiedenen *BRCA1*- und *BRCA2*-Mutationen wurde neben erhöhter Strahlensensitivität eine defekte Reparatur strahleninduzierter DNA-Schäden festgestellt (Foray et al., 1999).

## 1.5 Testsysteme zum Nachweis von Mutagensensitivität

Zur Bestimmung der Mutagensensitivität wurde klassischerweise der $G_2$-Chromosomenaberrationstest verwendet (Scott et al., 1994; 1999; Parshad et al., 1996, Patel et al., 1997; Baria et al., 2001b; Riches et al., 2001; Baeyens et al., 2002). Lymphozyten werden dabei in der $G_2$-Phase des Zellzyklus mit ionisierender Strahlung behandelt und in der darauf folgenden Mitose werden die Metaphase-chromosomen auf chromosomale Änderungen hin untersucht. Durch eine erhöhte Anzahl an Chromatidbrüchen wird eine verstärkte Mutagensensitivität und eine reduzierte DNA-Reparaturkapazität der Zellen deutlich (Baria et al., 2001a; Baeyens et al., 2002). Eine einfachere und weniger zeitaufwendige Alternative zum $G_2$-Chromosomenaberrationstest bietet der Mikronukleustest (MNT) (Scott et al., 1998, 1999; Rothfuss et al., 2000; Baeyens et al., 2002). Die Zellen werden hierbei in der $G_0$-Phase bestrahlt und ein chromosomaler Schaden kann nach Durchlaufen einer Zellteilung in Form von Mikronuklei detektiert werden.

Neben diesen beiden Endpunkten für Chromosomenmutationen wurden in verschiedenen Studien auch Indikatortests wie der Schwesterchromatidaustausch-test (SCE-Test) (Cianciulli et al., 1995; Abrahams et al., 1998) und der Comet-Assay zu Untersuchungen der Mutagensensitivität in Brustkrebspatienten verwendet (Jaloszynski et al., 1997; Alapetite et al., 1999; Rajeswari et al., 2000, Nieuwenhius et al., 2002, Smith et al., 2003). Der SCE-Test ist ein sensitiver Indikator genotoxischer Effekte und mit ihm kann ein Austausch von DNA-Replikations-produkten zwischen den identischen Regionen von Schwesterchromatiden festgestellt werden. Jedoch sind der Mechanismus und die biologische Signifikanz, welche zu SCE-Formationen führen nicht bekannt. Mit dem Comet-Assay ist ein Nachweis von DNA-Strangbrüchen auf Einzelzellebene möglich. Da hier einzelne Zellen auf die Effekte einer Mutagenbehandlung hin untersucht werden, ermöglicht dies einen direkten Vergleich mit den zytogenetischen Endpunkten zur Bestimmung von Mutagensensitivität. Der Comet-Assay und der SCE-Test dienen zur Feststellung der Menge an primär induzierten DNA-Schäden, Chromosomenaberrationen und Mikronuklei dagegen spiegeln die fehlgeschlagenen Bemühungen einer Zelle wider DNA-Schäden zu beheben und machen daher indirekt eine Aussage über die Reparaturkapazität von Zellen. Eine spezifische Detektion von DNA-DSB ist auch mit der Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE) möglich. Hier müssen die Zellen jedoch im Unterschied zum Comet-Assay mit deutlich höheren Strahlendosen behandelt werden und diese Analyse basiert nicht auf Einzelzellniveau. Es wurde mit der PFGE eine Korrelation zwischen unreparierten DNA-DSB und Strahlensensitivität gefunden, sowohl in BRCA1-defizienten Fibroblasten wie auch in BRCA1-heterozygoten Zelllinien (Foray et al., 1999). Da die meisten Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit mit dem Mikronukleustest und dem Comet-Assay durchgeführt wurden, werden diese beiden Testsysteme im Folgenden detaillierter beschrieben.

### 1.5.1 Der Mikronukleustest

Durch klastogene oder aneugene Mechanismen der Mutagene wird das Genom geschädigt und es verbleiben Chromosomenbruchstücke oder ganze Chromosomen im Cytoplasma, während die Chromosomen auf die beiden Tochterzellen verteilt werden. Ein im Cytoplasma verbliebenes Chromosomenfragment wird in der Telophase mit einer eigenen Kernmembran umschlossen und wird als Mikronukleus sichtbar (Abb. 3) (Fenech, 1993). Da die Entstehung von Mikronuklei eine Zellteilung

voraussetzt, müssen Lymphozyten mit einem Mitogen, wie beispielsweise Phytohämaglutinin, stimuliert werden. Eine Modifikation des MNT mit Cytochalasin B, das die Zellteilung, nicht jedoch die Kernteilung verhindert, ermöglicht die gezielte Auswertung von Zellen, die nach der Mutagenexposition genau eine Mitose durchlaufen haben (Fenech et al., 1997).

Mit dem Mikronukleustest (MNT) kann sowohl die genomische Stabilität wie auch die Mutagensensitivität von Zellen detektiert werden. Auskunft über chromosomale Stabilität eines Genoms erhält man durch Analyse der spontanen Mikronukleus-Frequenzen. Zur Untersuchung von Mutagensensitivität werden Zellen in der $G_0$-Phase des Zellzyklus mit Mutagenen behandelt und nach einer Zellteilung, wenn sich die Zellen in der nächsten $G_0$-Phase befinden, wird die Mikronukleus-Frequenz bestimmt. Die Auswertung des MNT erfordert weniger zytogenetische Erfahrung als die Analyse von Chromosomenaberrationen und vereinfacht und beschleunigt daher das Testverfahren. Mit Hilfe einer zusätzlichen Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) kann Auskunft über den Entstehungsmechanismus der Mikronuklei gewonnen werden (Miller et al., 1991). Bei einer FISH-Analyse der Mikronuklei wird eine Centromersonde, die an allen Centromeren des menschlichen Chromosomensatzes bindet, auf ein MNT-Präparat hybridisiert und die Mikronuklei werden auf Fluoreszenzsignale hin analysiert. Ist ein Signal erkennbar, so wird angenommen, dass dieser Mikronukleus durch Fehlverteilung eines ganzen Chromosoms entstanden ist (Abb. 3C). Ist in dem Mikronukleus kein Signal zu erkennen, so deutet dies auf Entstehung des Mikronukleus durch einen Chromosomenbruch hin.

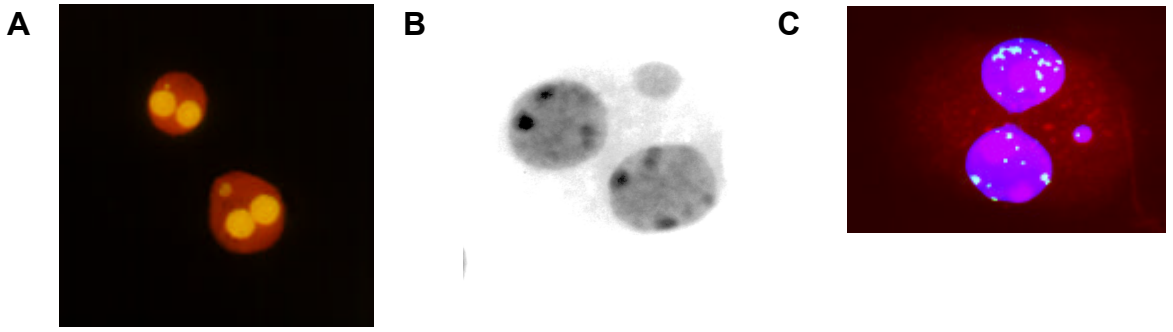



Abb. 3: (A) Acridinorange und (B) Giemsa gefärbte zweikernige Zellen mit je einem Mikronukleus. In (C) ist eine Dapi-Propidiumjodid gefärbte zweikernige Zelle nach Durchführung einer FISH auf einem MNT-Präparate zu sehen. Das Fluoreszenz-signal einer Centromersonde ist im Mikronukleus zu erkennen.

### 1.5.2 Der Comet-Assay

Der Comet-Assay oder Einzelzellgelelektrophorese (SCGE) ist eine Methode zum sensitiven Nachweis von Strangbrüchen auf der Ebene einzelner Zellen. Aufgrund seiner einfachen und schnellen Durchführung hat der Comet-Assay als Genotoxizitätstest vielseitig Anwendung gefunden (Übersicht bei Tice et al., 1995, Speit und Hartmann, 1999). In seiner alkalischen Version (pH 13) ermöglicht der Comet-Assay den Nachweis von Einzel- wie Doppelstrangbrüchen und auch alkalilabile Stellen können detektiert werden. Durch Veränderung des pH-Werts des Alkali-Elektrophoresepuffers lässt sich die Sensitivität des Comet-Assays bezüglich der Detektion von alkalilabilen Stellen und DNA-Einzel- und Doppelstrangbrüchen verändern. Hat der verwendete Puffer einen niedrigeren pH-Wert, so steigt die Spezifität für Doppelstrangbrüche. Für den Comet-Assay bei pH 9 und pH 8,3 wurde erfolgreich gezeigt, dass DNA-DSB zu strahleninduzierter Migration der DNA führen. (Singh and Stephens, 1997; Wojewodzka et al, 2002).

Die Durchführung des Comet-Assays ist nicht sehr zeit- und kostenaufwendig und würde sich somit ideal als Screening-Methode eignen. Die Zellen müssen nicht proliferieren und nur sehr geringe Zellmengen werden benötigt. Die Zellen werden als Einzelzellsuspension in Agarose aufgenommen, auf einen Objektträger aufgetragen und unter alkalischen Bedingungen im Gel lysiert. Während der Lyse werden Proteine und Membranen zerstört, so dass die Kern-DNA frei in der Agarose vorliegt. Im folgenden Schritt der Alkalibehandlung wird der DNA-Doppelstrang denaturiert und alkalisensitive DNA-Schäden werden in Strangbrüche umgewandelt. Die Objektträger werden dann einer horizontalen Elektrophorese unterzogen, wobei relaxierte DNA-Loops oder DNA-Fragmente in Richtung Anode aus dem Kern herauswandern. Nach Anfärben mit einem DNA-bindenden Farbstoff wird im Mikroskop das Bild eines Kometen ersichtlich, wobei der Kometenkopf dem ursprünglichen Zellkern entspricht und der Kometenschweif der gewanderten DNA (Abb.4).

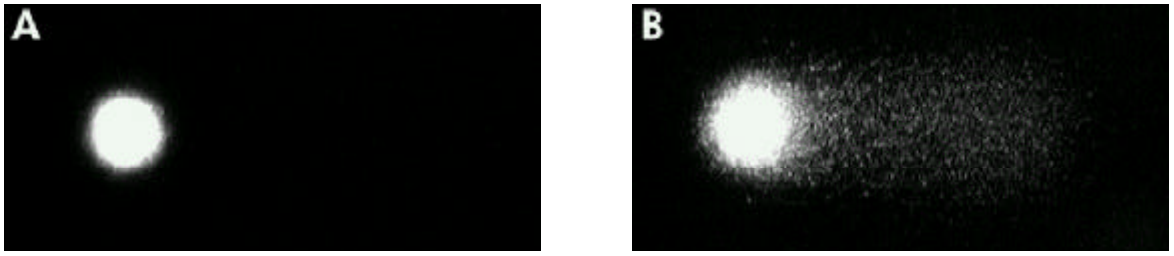



Abb. 4: Ethidiumbromid gefärbter Zellkern nach Durchführung des Comet-Assays. (A) keine DNA-Migration erkennbar, (B) deutliche DNA-Migration erkennbar

Der Comet-Assay erlaubt eine Untersuchung sowohl der Schadensinduktion, die sich in einer erhöhten DNA-Migration manifestiert, als auch der DNA-Reparaturkapazität einer Zelle. Die Zellen werden hierzu zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Schadensinduktion auf einen Objektträger aufgebracht. Während des Reparaturprozesses kommt es zu einer Entfernung von DNA-Schäden und einer Wiederverknüpfung gebrochener DNA-Fragmente, die als Abnahme der DNA-Migration über den betrachteten Zeitraum sichtbar wird. Der Comet-Assay kann daher möglicherweise Hinweise auf die Ursachen der im MNT gefundenen Mutagensensitivität geben. Es kann mit dieser Methode untersucht werden, ob in sensitiven Zellen mehr Schäden induziert wurden, oder ob die Zellen sensitiver reagieren, weil DNA-Schäden langsamer oder nur teilweise repariert werden. Da im Comet-Assay allerdings nur die Kinetik der DNA-Reparatur, jedoch nicht deren Qualität erfasst wird, sind Aussagen über die Genauigkeit der Reparatur nicht möglich.

Um neben der Reparatur im gesamten Zellkern (global genome repair, GGR) auch eine genregionspezifische Reparatur untersuchen zu können, wird der Comet-Assay mit einer Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) kombiniert. Bei diesem Comet-FISH-Assay wird ein bestimmtes Gen durch Hybridisierung einer Sonde auf ein Comet-Assay-Präparat sichtbar gemacht. Je nach Lokalisation dieses Signals kann eine Aussage über die Schädigung dieses Genombereichs getroffen werden. Befindet sich das Fluoreszenzsignal im Kopfbereich des Kometen, so wurde diese Region nicht geschädigt. Wurde der Schaden in der umgebenden Region des untersuchten Gens gesetzt, so kommt es zu einer Wanderung des Signals aus dem Kopfbereich des Kometen in den Schweifbereich. Wurde der Schaden direkt in dem untersuchten Gen gesetzt, so kommt es zu einer Zunahme der Fluoreszenzsignale,

da alle Bruchstücke des Gens von der Sonde detektiert werden. Diese Methode wurde zunächst zur Erfassung von Interphasekernstrukturen von Lymphozyten angewandt (Santos et al., 1997). Aber auch die Lokalisation bestimmter Gene oder Chromosomenbereiche nach Induktion eines Schadens wurde damit untersucht (McKelvey-Martin et al., 1998; Rapp et al., 2000).

## 1.6 Fragestellung der Arbeit

In früheren Studien wurde in einem Teil der untersuchten Brustkrebspatientinnen eine erhöhte chromosomale Sensensitivität gegenüber ionisierender Strahlung festgestellt. Es sollte im Rahmen dieser Arbeit mit dem Mikronukleustest und dem Comet-Assay geprüft werden, ob ein Zusammenhang besteht zwischen Mutagensensitivität und Mutationen im *BRCA1*- und *BRCA2*-Gen. Zusätzlich sollte untersucht werden, ob lymphoblastoide Zelllinien (LCL) ein geeignetes Modell zur Charakterisierung von Mutagensensitivität BRCA-heterozygoter Zellen darstellen.

- Lymphozyten von Frauen mit heterozygoter *BRCA1*- oder *BRCA2*-Mutation sollten im Mikronukleustest (MNT) auf Mutagensensitivität untersucht werden. Es sollte festgestellt werden, ob sich der MNT als funktioneller Test zur Früherkennung von BRCA-Mutationen in Brustkrebsfamilien eignet.
- Da BRCA2 eine wesentliche Funktion in der DNA-DSB-Reparatur zugeschrieben wird, sollte untersucht werden, ob sich über Unterschiede in der Mutagensensitivität Träger einer *BRCA1*-Mutation von Trägern einer *BRCA2*-Mutation unterscheiden lassen.
- Durch den Einsatz verschiedener chemischer Mutagene im MNT sollte untersucht werden, gegenüber welchen Arten von DNA-Schäden Mutagensensitivität besteht und welche Reparaturmechanismen involviert sind. Dadurch wurden Hinweise auf die Funktion der BRCA-Gene erwartet.
- Da einige der untersuchten Mutagene als Cytostatika in der Chemotherapie von Brustkrebs verwendet werden, könnten sich Hinweise auf eine erhöhte Sensitivität von Brustkrebspatientinnen mit BRCA-Mutationen ergeben, die mit einem erhöhten Risiko für Mutationen und sekundäre Tumore verbunden sein könnten.

- Der Comet-Assay sollte zur Untersuchung von Induktion und Reparatur strahleninduzierter DNA-Schäden angewandt werden, um Hinweise auf die Ursache der im MNT festgestellten Strahlensensitivität zu erhalten. Es sollte des Weiteren geprüft werden, ob eine neutrale Version des Comet-Assays, die eine hohe Spezifität für DNA-DSB aufweist, zur Diskriminierung zwischen Zellen mit und ohne BRCA-Mutation geeignet ist.

- Im zweiten Teil der Arbeit sollten verschiedene lymphoblastoide Zelllinien mit *BRCA1*-Mutationen hinsichtlich ihrer Eignung als Modell zur Untersuchung von Mutagensensitivität geprüft werden. Dazu sollte sowohl der MNT als auch der Comet-Assay eingesetzt werden. Um spezifische Aussagen zur DNA-DSB-Reparatur zu machen, sollten Untersuchungen mit dem neutralen Comet-Assay und der Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE) durchgeführt werden. Da für die BRCA-Gene auch eine Funktion in der transkriptions-gekoppelten Reparatur (TCR) nachgewiesen wurde, die aktive Gene bevorzugt repariert, sollte mit dem Comet-FISH-Assay die Reparatur spezifischer Genregionen im Vergleich zur globalen Genomreparatur analysiert werden.

# 2 Material und Methoden

## 2.1 Material

### 2.1.1 Zellen

#### 2.1.1.1 Blutproben

Für die Untersuchung meiner Fragestellung wurden im ersten Teil der Arbeit codierte Blutproben von Frauen mit einer heterozygoten Mutation in einem der beiden Brustkrebssuszeptibilitätsgene *BRCA1* oder *BRCA2* verwendet. Die Blutproben wurde uns freundlicherweise von der Frauenklinik Ulm überlassen, wo die Sequenzierung der beiden Gene *BRCA1* und *BRCA2* von Frau Dipl.-Biol. Elke Eberhardt durchgeführt wurde. Die Mutationen der BRCA1-Patientinnen sind in Tab. 1, die Mutationen der *BRCA2*-Patientinnen sind in Tab. 2 aufgeführt. Die erste Zahl der Codierung der Patientinnen gibt die Familienzugehörigkeit an, die zweite Zahl dient der Unterscheidung der verschiedenen Familienmitglieder. Als Kontrolle dazu wurde Vollblut von gesunden Frauen ohne eine Familienvorgeschichte von Krebserkrankungen herangezogen. Heparinisierte Blutproben wurden durch Venenpunktion erhalten. Die Studie wurde von der Ethikkommission der Universität Ulm geprüft und akzeptiert. Alle hier untersuchten Frauen wurden über die Verwendung des Vollbluts informiert und gaben ihr Einverständnis, an dieser Studie teilzunehmen. In einem Fragenbogen wurden das Alter, das Rauchverhalten die Einnahme von Medikamenten sowie vorangegangene Therapien der Patientinnen erfasst. Unter den Frauen mit *BRCA1*-Mutation fanden sich bei den 24 untersuchten Frauen 11 verschiedene Mutationen, darunter 6 Frameshift-Mutationen, die durch Verschiebung des Leserahmens ein Stoppcodon zur Folge haben. Bei den drei im Patientenkollektiv auftretenden Nonsensmutationen entstand durch den Austausch einer einzelnen Base an der Stelle der Mutation ein Stoppcodon. Ansonsten fanden sich noch eine Missens-Mutation und eine Splice-Mutation, wobei bei ersterer eine Aminosäure ausgetauscht wurde, bei letzterer eine “Splicesite“ von der Mutation betroffen war. Die Missens-Mutation bewirkte den Einbau einer falschen Aminosäure in der RING-Finger-Domäne von *BRCA1*. Alle Frameshift- und Nonsens-Mutationen hatten den vorzeitigen Abbruch der Proteinsynthese zur Folge. Unter den *BRCA2*-Mutationen fanden sich bei den 9 untersuchten Frauen 6 verschiedene Frameshift-

Mutationen und eine Nonsensmutation. Alle diese Mutationen resultierten in einem verkürzten Protein.

Tab. 1: BRCA1-Patientinnen mit Mutation, deren Lokalisation, Folge auf Proteinebene und die Art der Mutation sind dargestellt.

| Patientin* | Tumor | Mutation | Exon | Folge | Mutationsart |
|---|---|---|---|---|---|
| **1.1** | T | 5382 insC | 20 | 1829 Stopp | F |
| **1.2** | - | 5382 ins C | 20 | 1829 Stopp | F |
| **2.1** | T | 969 ins 7 | 11 | 288 Stopp | F |
| **3.1** | T | T 300 G | 5 | Cys zu Gly | M |
| **4.2** | - | 5382 ins C | 20 | 1829 Stopp | F |
| **5.2** | T | IVS 5+1 | 5 | 64Stopp | S |
| **5.5** | T | IVS 5+1 | 5 | 64Stopp | S |
| **7.1** | T | 2530 del AG | 11 | 808 Stopp | F |
| **8.1** | T | C 4302 T | 12 | Gln zu Stopp | N |
| **8.2** | T | C 4302 T | 12 | Gln zu Stopp | N |
| **8.3** | T | C 4302 T | 12 | Gln zu Stopp | N |
| **10.1** | - | C 4302 T | 12 | Gln zu Stopp | N |
| **10.2** | T | C 4302 T | 12 | Gln zu Stopp | N |
| **10.3** | - | C 4302 T | 12 | Gln zu Stopp | N |
| **11.1** | T | 4184 del4 | 11 | 1364 Stopp | F |
| **13.2** | T | 4184 del4 | 11 | 1364 Stopp | F |
| **16.1** | T | C 4341 T | 13 | Gln zu Stopp | N |
| **18.1** | T | 2520 del TG | 11 | 808 Stopp | F |
| **19.1** | T | G 2841 T | 11 | Glu zu Stopp | N |
| **21.1** | T | C 4341 T | 13 | Gln zu Stopp | N |
| **23.1** | T | 2520 del TG | 11 | 808 Stopp | F |
| **23.2** | T | 2520 del TG | 11 | 808 Stopp | F |
| **29.1** | T | 2524 del TG | 11 | 808 Stopp | F |
| **31.1** | T | n.d. | | | |

F= Frameshift-Mutation, S= Splicesite-Mutation ; N=Nonsens -Mutation, M= Missens -Mutation
* die erste Zahl kennzeichnet die Familie, die zweite Zahl das Individuum

Tab. 2: *BRCA2*-Patientinnen mit Mutation, deren Lokalisation, Folge auf Proteinebene und die Art der Mutation sind dargestellt.

| Patientin* | Tumor | Mutation | Exon | Folge | Mutationsart |
|---|---|---|---|---|---|
| **6.1** | T | 5950 del CT | 11 | 1909 Stopp | F |
| **9.1** | T | 5445 del 5 | 11 | 1739 Stopp | F |
| **17.1** | T | C 5910 G | 11 | Tyr zu Stopp | N |
| **25.1** | T | 9318 ins A | 23 | 3047 Stopp | F |
| **26.1** | T | 8138 del 5 | 17 | 2638 Stopp | F |
| **27.1** | - | 5465 ins T | 11 | 1747 Stopp | F |
| **27.2** | - | 5465 ins T | 11 | 1747 Stopp | F |
| **28.1** | T | 5946 del CT | 11 | 1909 Stopp | F |
| **30.1** | T | 9318 del A | 23 | 3047 Stopp | F |

F= Frameshift-Mutation, S= Splice-Mutation ; N=Nonsens-Mutation, M= Missens-Mutation
* die erste Zahl kennzeichnet die Familie, die zweite Zahl das Individuum

### 2.1.1.2 Zelllinien

Für weitere Experimente wurden sechs verschiedene durch Transformation mit dem Epstein-Barr-Virus (EBV) immortalisierte lymphoblastoide Zelllinien herangezogen. Drei davon weisen keine bekannte Mutation auf und dienten als Kontrollen. AG1011 wurde aus Blutzellen einer Frau mit einer balancierten Chromosomen-Translokation etabliert. Der Donor von AG09387 war die Mutter eines Kindes mit Down-Syndrom. L169-Zellen wurden aus peripheren Blutlymphozyten der gesunden Schwester einer Ataxia telangiectasia (AT)-Patientin etabliert, die keine AT-Mutation aufwies und somit auch keine heterozygote Trägerin war.

Die anderen drei Zelllinien tragen jeweils eine Mutation im *BRCA1*-Gen. L166 und L661 wurden aus Frauen mit *BRCA1*-Keimbahnmutationen etabliert und sind beide heterozygot für die T300G-Nukleotid-Substitution im Exon 5. Dies ist eine häufige, krankheitsprädisponierende Mutation, die eine Missense-Substitution in der N-terminalen BRCA1-Ring-Finger-Domäne zur Folge hat (Friedman et al., 1984). L166 stammt dabei aus Lymphozyten der gleichen Frau wie die Zelllinie HA166 (Speit et al., 2000). Bei HCC1937BL handelt es sich ebenfalls um B-lymphoblastoide Zellen, die aus den Blutzellen einer Brustkrebspatientin gewonnen wurden. Sie sind heterozygot für die häufige Mutation 5382insC im Exon 20 des *BRCA1*-Gens, die ein Stopp Codon in Position 1829 zur Folge hat (Tomlinson et al., 1998). Die Zelllinien

AG1011, AG09387 und HCC1937BL wurden von ATCC, Manassas, VA, USA bezogen, die Zelllinien L169, L166 und L661 stammen aus dem Labor von Dr. Thilo Dörk, Hannover. Alle lymphoblastoiden Zellen wurden in T25-Zellkulturflaschen unter Standardzellkulturbedingungen in RPMI-1640 Medium mit Glutamax, dem jeweils 15 % fötales Kälberserum und 0,5 % Gentamycin zugegeben wurde, kultiviert.

Für Validierungsexperimente wurde die Zelllinie V79 verwendet. Es handelt sich hierbei um permanente Lungenfibroblasten des chinesischen Hamsters. Diese Zelllinie findet weite Verbreitung in der Genotoxizitätsprüfung und ist zytogenetisch sehr gut charakterisiert. Die hier verwendete Linie besitzt eine modale Chromosomenzahl von 21 Chromosomen pro Metaphase und eine durchschnittliche Zellzyklusdauer von 12 h (Schemp und Vogel, 1979; Speit et al, 1994). Diese Zellen wurden in T75-Flaschen in MEM-Medium kultiviert. Die Subkultivierung erfolgte unter Standardzellkulturbedingungen.

### 2.1.2 Testagenzien

**Bestrahlung**

Die Bestrahlung von Zellen erfolgte mit einer $Cs^{137}$ Bestrahlungsquelle (Gammacell 2000) mit einer Strahlungsleistung von 4 Gy/min. Die gewünschte Dosis wurde über die Dauer der Bestrahlungszeit festgelegt. Für den MNT wurden 300 µl Vollblut von Patientinnen oder Kontrollen in 3 ml Chromosomenmedium 1A mit 2 Gy bestrahlt. Bei Durchführung des MNT an LCL wurden $2{,}5 \times 10^6$ Zellen in 10 ml RPMI-Zellkulturmedium mit 1 Gy oder 2 Gy bestrahlt. Bei der Durchführung des Comet-Assays wurden 500 µl Vollblut oder 800 000 lymphoblastoide Zellen in 500 µl RPMI-Medium in einem Eppendorfgefäß bestrahlt und anschließend sofort auf Eis gekühlt, um den Einfluss von Reparatur zu verhindern. Bei Verwendung von V79 Zellen wurden ebenfalls 800 000 Zellen in MEM-Medium bestrahlt. Für Experimente zur Reparaturkapazität der Zellen wurde eine Probe mit 2 Gy bestrahlt und danach für einen Zeitraum von einer Stunde bei 37°C inkubiert. Zu bestimmten Zeitpunkten (0, 5, 10, 20, 30, 60 min nach Bestrahlung) wurde ein Zellaliquot von 10 000 Zellen entnommen und in den Comet-Assay eingesetzt.

**Mutagenbehandlung**

**Koffein** wurde vor Verwendung jeweils frisch eingewogen und in Aqua bidest gelöst und verdünnt. Es wurde im MNT den Blutkulturen zum Zeitpunkt 0 h (d.h. vor der Bestrahlung) zugegeben und die Zellen wurden für die gesamte Kultivierungsdauer damit inkubiert.

Die verwendeten **Wasserstoffperoxid** ($H_2O_2$)-Verdünnungen wurden unmittelbar vor der Behandlung aus einer 37%igen Stammlösung in sterilem Aqua bidest angesetzt. Dadurch wurde verhindert, dass $H_2O_2$ abreagieren konnte, bevor es mit den Zellen in Kontakt kam. Das Vollblut der BRCA1-Patientinnen und Kontrollpersonen wurde im Mikronukleus-Test mit 20 µM $H_2O_2$, Zellen wurden mit Endkonzentrationen von 10 µM, 20 µM und 40 µM $H_2O_2$ für die gesamte Kultivierungsdauer behandelt. Für den Comet-Assay wurden 500 000 Zellen in 200 µl PBS resuspendiert und mit 100 µl einer $H_2O_2$-Verdünnung für eine Dauer von 5 min auf Eis behandelt. Die Zellen wurden mit Endkonzentrationen von 40, 60 und 80 µM $H_2O_2$ behandelt.

Das Radiomimetikum **Bleomycin** wurde im MNT in den Konzentrationen 2 und 5 µg/ml dem Vollblut für 16 h zugegeben. Es wurde in Aqua bidest gelöst und aliquotiert bei -20 °C gelagert.

**BCNU (1,3-bis(2-chlorethyl)nitrosurea)** ist ein bifunktionell alkylierendes Agenz mit klastogenen Eigenschaften. Es wurde in Ethanol gelöst und verdünnt. Im MNT wurde das Vollblut mit Endkonzentrationen von 10 und 20 µM BCNU für 16 h behandelt. Im SCE Test wurde Vollblut mit 5, 10 und 20 µM BCNU für ebenfalls 16 h behandelt.

**Cisplatin**, eine bifunktionell alkylierende Substanz, verursacht intra- und interstrand-DNA-Vernetzungen (Crosslinks). Cisplatin wurde vor jedem Experiment frisch eingewogen und in DMSO gelöst und verdünnt. Im MNT wurde das Vollblut mit Endkonzentrationen von 10 und 20 µM Cisplatin für 16 h behandelt. Im SCE-Test wurde Vollblut mit Konzentrationen von 0,5, 1, 2 und 5 µM Cisplatin für 16 h behandelt.

**Cyclophosphamid** ist ein bifunktionell alkylierendes Stickstofflostderivat. Durch Vernetzung von DNA-Strängen entstehen Crosslinks. Cyclophosphamid wurde vor jedem Experiment frisch eingewogen und in Hanks-Lösung verdünnt. Im MNT wurde das Vollblut zunächst 24 h ohne Mutagenzugabe inkubiert und dann für 2 h mit 100 µM und 200 µM Cyclophosphamid behandelt. Die Behandlung erfolgte in Anwesenheit von 3 % S9-Mix (1,2 mg Protein / ml). Der S9-Mix wurde hergestellt durch Zugabe von 10 mM Gucose-6-phosphate und 5 mM NADP zu Aroclor-induzierter Ratten Leber S9 Fraktion (CCR, Roßdorf).

Das Alkylanz **N-Ethyl-N-Nitrosourea (ENU)** erhielten wir in lyophilisierter Form von Herrn Prof. Thomale aus Essen. Es wurde in Aliquots bei –20°C gelagert. Die 1 M Stammlösung wurde mit Hanks-Lösung auf die gewünschten Konzentrationen verdünnt. Die lymphoblastoiden Zelllinien wurden 16 h mit 50 und 75 µg/ml ENU behandelt.

**Taxol** bewirkt eine Ansammlung von Tubulindimeren und verhindert deren Depolimerisation. Es können dadurch Störungen der Chromosomensegregation hervorgerufen werden, die Aneuploidien verursachen. Taxol wurde in DMSO gelöst und bei –20°C aufbewahrt. Die Zellen wurden mit Konzentrationen von 15 und 20 nM für 16 h behandelt.

**Vincristin** gehört der Gruppe der Alkaloide an und reagiert mit den Tubulinuntereinheiten und hemmt den Ausbau der Teilungsspindel. Es induziert abnormale Chromosomensegregation in sich teilenden Zellen und verursacht Aneuploidien. Vincristin wurde in Aqua bidest gelöst und bei -20°C gelagert. Das Vollblut wurde im MNT 24 h nach Ansatz der Kulturen mit 10 und 20 ng/ml Vincristin für 48 h (entspricht dem Ende der Kultivierung) inkubiert.

### 2.1.3 Chemikalien

| | |
|---|---|
| Acridinorange | Merck, Darmstadt |
| Acrylamid/Bisacrylamid (19:1) | Sigma, München |
| Agarose LMA, Sea plaque, NuSieve GTG) | Biozym, Hameln |
| Agarose MEEO | Roth, Karlsruhe |
| Agarose NEEO | Roth, Karlsruhe |
| Ampicillin | Sigma, München |
| Anti-Digoxygenin-AP, Fab fragments | Roche, Mannheim |
| Aqua ad injectabilis | Braun, Melsungen |
| ATP (10 mM) | Sigma, München |
| β-Mercaptoethanol | Roth, Karlsruhe |
| 1,3-bis(2-chlorethyl)nitrosurea (BCNU) | Bristol-Myers-Squibb, München |
| biotinylierter Anti-Avidin-Antikörper | Vector, Burlingame, USA |
| Bromphenolblau | Serva, Heidelberg |
| Borax | Sigma, München |
| Borsäure | Serva, Heidelberg |
| Bovine serum albumine, Fraction V | Sigma, München |
| Bromdesoxyuridin BrdU | Sigma, München |
| Cisplatin | Sigma, München |
| Colcemid | Biochrome, Berlin |
| Chromosomenmedium 1A | Gibco BRL, Eggenstein |
| Cyclophosphamid | Sigma, München |
| Cytochalasin B | Sigma, München |
| DAPI | Sigma, München |
| Diethylpyrocarbonat (DEPC) | Sigma, München |
| Digoxygenin-11-dUTP | Roche, Mannheim |
| Dimethylsulfoxid (DMSO) | Serva, Heidelberg |
| DNase I | Boehringer, Mannheim |
| DNA-Standard 100 bp ladder (1 µg/ml) | Pharmacia, Freiburg |
| DNA-Polymerase I | Roche, Mannheim |
| DNAzol$^{TM}$ Reagenz | Gibco BRL, Eggenstein |
| ENU | Prof. Thomale, Essen |
| Essigsäure (≥99,7 %) | Roth, Karlsruhe |
| Ethanol, absolut | Riedel DeHaen, Seelze |

| | |
|---|---|
| Ethidiumbromid | Sigma, München |
| Eukitt | Kindler Freiburg |
| Fixogum | Marabu, Tamm |
| Formaldehydlösung (min. 37 %) | Merck, Darmstadt |
| Formamid | Fluka, Neu-Ulm |
| Fötales Kälberserum | Biochrom, Berlin |
| Fluorescein-Avidin-Antikörper | Vector, Burlingame, USA |
| Gentamycin | Biochrom, Berlin |
| Giemsa | Merck, Darmstadt |
| Glycerin | Merck, Darmstadt |
| Glucose-6-phosphat | Sigma, München |
| Hanks balanced salt solution (HBSS) | Biochrom, Berlin |
| Heparin-Natrium | Braun, Melsungen |
| Hepes | Sigma, München |
| Histopaque 1077 | Sigma, München |
| Human Cot-1 DNA | Invitrogen, Karlsruhe |
| InCert Agarose | Biowitthaker, Rockland, USA |
| Kanamycin (10.000 U/ml) | Gibco BRL, Eggenstein |
| Spritzen (5, 10, 20, 60 ml) | BectonDickinson, Heidelberg |
| KCl | Merck, Darmstadt |
| Koffein | Merck, Darmstadt |
| L-Glutamin | Biochrom, Berlin |
| Lightcycler Capillaries | Roche, Mannheim |
| Sea Plaque GTG agarose | BioWitthaker, Rockland, USA |
| MEM-Earle (Minimal Essential Medium) | Biochrom, Berlin |
| MEEO Agarose | Roth, Karlsruhe |
| Methanol | Merck, Darmstadt |
| $MgCl_2$ | Merck, Darmstadt |
| NaCl-Lösung, isoton (0,9 %) | Delta Pharma, Pfullingen |
| NaCl | Fluka, Neu-Ulm |
| NADP | Böhringer, Mannheim |
| $Na_2HPO_4$ | Merck, Darmstadt |
| $NaH_2PO_4$ | Merck, Darmstadt |
| NaOH | Merck, Darmstadt |

| | |
|---|---|
| Natriumacetat | Merck, Darmstadt |
| Natriumdodecylsulfat | Serva, Heidelberg |
| Natrium-Ethylendiaminotetraacetat (EDTA) | Fluka, Neu-Ulm |
| N-Ethyl-N-Nitrosourea (ENU) | Sigma, München |
| P53 DNA Sonde | Appligene Oncor, Illkirch, Frankreich |
| Pan-centromeric Hybridisierungsprobe | Cambio, Cambridge, UK |
| Phosphate buffer saline (PBS, ohne $Ca^{2+}$ und $Mg^{2+}$), Dulbecco | Biochrom, Berlin |
| Penicillin/Streptomycin (10.000 U/ml) | Gibco BRL, Eggenstein |
| Pepsin | Sigma, München |
| PCR 10x Puffer | Pharmacia, Freiburg |
| PHA, M-Form | Pharmacia, Freiburg |
| Propidiumjodid | Gibco BRL, Eggenstein |
| RPMI-1640 Medium mit Glutamax | Sigma, München |
| RNase A | Gibco BRL, Eggenstein |
| Seakam GTG Agarose | Sigma, München |
| Salzsäure, rauchend, 37% | Biowitthaker, Rockland, USA |
| Taxol | Riedel DeHaen, Seelze |
| Taq-Polymerase (5 U/µl) | Pharmacia, Freiburg |
| Tris | Boehringer, Mannheim |
| Triton X-100 | Sigma, München |
| Trypanblau | Sigma, München |
| Trypsin | Biochrom, Berlin |
| Tween 20 | Sigma, München |
| Vectashield | SA Vector, Burlingame, U |
| Vincristin | Sigma, München |
| Wasser, steril | Delta Pharma, Pfullingen |
| Wasserstoffperoxid (37 %) | Merck, Darmstadt |

### 2.1.4 Geräte und Materialien

| | |
|---|---|
| AL Cellcounter, Modell 871 | AL-Systeme, Karlsruhe |
| ALF express (Software: ALFwin™ Version 1.00) | Pharmacia, Freiburg |
| Biometra Rotaphor (Typ V) | Biometra, Göttingen |
| Blutkulturröhrchen 10 ml | Greiner, Nürtingen |
| Lighcycler Kapillaren | Roche, Mannheim |
| Brutschrank B 6200 | Heraeus, Hanau |
| CCD-Kamera 4910 | Cohu, San Diego, USA |
| $CO_2$-Brutschrank B 6220 CU | Heraeus, Hanau |
| Comet-Assay II Meßsystem V1.02;1 .03 | Perceptive Instruments, Haver-Hill, UK |
| Deckgläser (24x60 mm, 24x50) | Menzel, Braunschweig |
| Elektrophorese Power Supply | Fröbel, Ulm |
| Elektrophoresekammer DNA Sub Cell™ | BioRad, München |
| Fluoreszenzmikroskop Axioplan | Zeiss, Oberkochen |
| Geldokumentationssystem Image Store 5000 | Ultra Violet Products Ltd. Cambridge, UK |
| Ikaros-Bildanalysesystem | Metasystems, Unterlussheim |
| ISIS - Bildanalysesystem | Metasystems, Unterlussheim |
| Laminar Air Flow TL2448 | Heraeus, Hanau |
| Laminar Air Flow HB2448K | Heraeus, Hanau |
| Lichtmikroskop Axiophot | Zeiss, Oberkochen |
| LightCycler | Roche, Mannheim |
| Neubauer-Zählkammer | Karl Hecht KG, Sondheim |
| Objektträger mit Mattrand | Menzel, Braunschweig |
| PCR-SoftStrips 0,2 ml, 8fach | Biozym, Hess. Oldendorf |
| Plastikdeckgläser | Appligene, Oncor |
| Plastikpipetten 5, 10, 25, 50 ml | Falcon, Heidelberg |
| Reaktionsgefäße 1,5 ml | Roth, Karlsruhe |
| Thermal Cycler PTC 100 | MJ Research Inc., Waterhouse, USA |
| UV-Schirm | Bachofer, Reutlingen |
| $\gamma$-Strahlenquelle Gammacell 2000 | Nuclear Data, Frankfurt |
| Zellkulturflaschen 25, 75, 185 $cm^2$ | Nunc, Wiesbaden |

| | |
|---|---|
| Zentrifuge Modell Minifuge | Heraeus, Hanau |
| Zentrifuge Modell Labofuge 400 | Eppendorf, Hamburg |
| Zentrifuge Modell 5402 | Eppendorf, Hamburg |
| Zentrifugenröhrchen 10 ml | Nunc, Wiesbaden |

### 2.1.5 Lösungen, Medien und Puffer

| | |
|---|---|
| Acridinorange-Färbelösung | 125 µg/ml Acridineorange in<br>10 ml Sörensenpuffer Lösung A<br>10 ml Sörensenpuffer Lösung B;<br>ad 100 ml A. dest. |
| Alkali – Elektrophoresepuffer (pH 13)<br>Leitfähigkeit 60-65 mS/cm | 300 mM NaOH<br>1 mM EDTA<br>pH > 13 mit NaOH |
| Alkali – Elektrophoresepuffer (pH 9) | 100 mM Tris<br>300 mM Natrium-Acetat,<br>mit Essigsäure auf pH 9 einstellen |
| Alkali – Elektrophoresepuffer (pH 8,3) | 100 mM Tris<br>300 mM Natrium-Acetat,<br>mit HCl auf pH 8,3 einstellen |
| Blocking-Lösung für FISH | 5% BSA in 4xSSC/0,1% Tween 20,<br>filtriert |
| Blockinglösung für Comet-FISH-Assay | 3 % BSA in 1xPBS |
| BrdU-Stammlösung | 500 µg/ml BrdU in Hanks |
| DAPI-Lösung | 80 µl DAPI (1 mg/ml)<br>in 80 ml 4xSSC/0,1% Tween20; |

| | |
|---|---|
| DAPI-Propidiumiodid-Lösung | 70 µl DAPI (1 mg/ml)<br>30 µl Propidiumiodid (0,1 mg/ml)<br>in 70 ml 4xSSC/0,1% Tween20 |
| DEPC-Wasser | 0,1 % DEPC, üN 60 °C; autoklavieren |
| dNTPs | 0,5 mM dATP, dCTP, dGTP, 0,05 mM dTTP |
| ESP-Puffer | 0,5 M EDTA, pH 8<br>10 mg/ml Laurylsarcosinat<br>1 mg/ml Proteinase K |
| Ethidiumbromidfärbelösung | 20µg / ml in A. dest. |
| FDA-Lösung | 50 µl FDA (5 µg/ml Aceton)<br>200 µl Ethidiumbromid (200 µg/ml)<br>4,8 ml 1x PBS |
| Fixierlösung I für MNT | Methanol : Eisessig (5+1),<br>1:1 mit 0,9 % NaCl gemischt |
| Fixierlösung II für MNT | Methanol : Eisessig (5+1), |
| Fixierlösung für Chromosomenpräparate | Methanol : Eisessig (3+1) |
| Giemsa-Färbelösung | 5 ml Sörensenpuffer Lsg. A<br>5 ml Sörensenpuffer Lsg. B<br>5 bzw. 7 ml Giemsa-Lösung<br>ad 100 ml Aqua dest. |
| Hanks-Lösung | 50 ml Hanks balanced salt solution<br>+2,35 ml 7,5% $NaHCO_3$<br>ad 500 ml Aqua bidest |

| | |
|---|---|
| HNPP-Puffer 1 | 0,1 M Tris<br>150 mM NaCl, pH 7,5 |
| HNPP-Puffer 2 | HNPP-Puffer 1<br>+ 1% BSA |
| HNPP-Puffer 3 | HNPP-Puffer 1<br>+ 0,05% Tween20 |
| HNPP-Puffer 4 | 0,1 M Tris<br>0,1 M NaCl<br>0,01 M $MgCl_2$, pH 8 |
| LB-Medium | 1% NaOH<br>1% Bacto-Tryptone<br>0,5% Hefe-Extrakt<br>ad pH7,2 mit NaOH |
| LB-Kanamycin-Medium | LB-Medium<br>30 µg/ml Kanamycin<br>(Stammlösung: 25 mg/ml) |
| Lyselösung (pH 10, pH 9,5) | 2,5 M NaCl<br>100 mM EDTA<br>10 mM Tris,<br>1 % Triton X-100<br>und 10 % DMSO frisch zugeben |
| Mastermix für Sonden | 400 µl Dextransulfat (50%ig)<br>400 µl Aqua bidest<br>200 µl 20xSSC, steril |
| NaAcetat, 3 M | 3 M Na-Acetat in H2O<br>pH 5,3 mit Essigsäure |

| | |
|---|---|
| Neutralisationspuffer | 0,4 M Tris; pH 7,5<br>mit 37 % HCl einstellen |
| 10x NT | 16,8 g $Na_2HPO_4$<br>0,83 g $NaH_2PO_4$<br>0,6 ml Triton<br>ad 1000 ml, pH 8 |
| PBD-Puffer | 0,5 M Tris<br>50 mM MgCl<br>0,5 mg/ml BSA |
| 10xPBS | 95,5 g PBS in 1000 ml A. dest |
| Pepsin-Lösung | 50 µl Pepsin Stammlösung (100 mg/ml)<br>+ 99 ml Aqua bidest<br>+ 1 ml 1 N HCl ( $\rightarrow$ pH 2,3) |
| 10x PCR-Puffer | 100 mM TrisHCl (pH 8,4)<br>15 mM $MgCl_2$ |
| Rinsing-Puffer | 10 mM Tris<br>10 mM HCl<br>10 mM EDTA, pH 7,5 mit NaOH |
| RPMI-Zellkulturmedium | 500 ml RPMI-1640<br>mit Glutamax - I<br>15% fötales Kälberserum<br>0,5% Gentamycin |
| Sörensenpuffer Lösung A | 0.3 M $Na_2HPO_4$ x $2H_2O$ |
| Sörensenpuffer Lösung B | 0,3 M $KH_2PO_4$ |

| | |
|---|---|
| 20xSSC | 3 M NaCl<br>0,3 M Na-Citrat-Dihydrat, pH 7 |
| 10x TBE, pH 8 | 900 mM Tris<br>900 mM Borsäure<br>20 mM EDTA, pH 8 |
| TE-Puffer | 10 mM Tris pH 7,6<br>1 mM EDTA pH 7,6 |
| Trypsin-Lösung (0,15 %) | 0,25 % Trypsin in<br>0,08 % EDTA<br>0,86 x PBS |

### 2.1.6 Reagenziensysteme (Kits)

| | |
|---|---|
| Cycle Sequencing Kit | Pharmacia |
| HNPP Fluorescent Detection Set | Roche |
| LC-FastStart DNA Master SYBR Green I | Roche |
| Omniscript$^{TM}$ Reverse Transkriptase Kit | Qiagen |
| Qiafilter Plasmid Midi | Qiagen |
| Rneasy Mini und Midi Kit | Qiagen |

### 2.1.7 Primer

Alle verwendeten Primer wurden von der Firma Thermo Hybaid, Ulm synthetisiert.

Primer für den Lightcycler

| **Genregion** | | **Sequenz** | **Produktlänge** |
|---|---|---|---|
| *BRCA1* | fwd | 5´-GGA ATG GAT GGT ACA GCT GTG-3´ | 235 bp |
| | rev | 5´-GAT CTG GGG TAT CAG GTA GGT G-3´ | |
| PBGD | fwd | 5´-GCC CAG CTG CAG AGA AAG TTC C-3´ | 262 bp |
| | rev | 5´-GCA GCA CAC CCA CCA GAT CCA-3´ | |

Primer für die Sequenzierung (Cy5-markiert)

| Genregion | | Sequenz | Produktlänge |
|---|---|---|---|
| *BRCA1* Exon 5 | fwd | 5´-TGG CTC TTA AGG GCA GTT GTG AG-3´ | 242 bp |
| | rev | 5´-GGA AGC AAC CAC AGT AGG AAA AAG-3´ | |
| *BRCA1* Exon 20 | fwd | 5´-CGA CGT TGT AAA ACG ACG GCC AGT ATA TGA CGT GTC TGC TCC AC-3´ | 444 bp |
| | rev | 5´-CAG GAA ACA GCT ATG ACC GGG AAT CCA AAT TAC ACA GC-3´ | |

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Chromosomenanalyse

Von den sechs verwendeten lymphoblastoiden Zelllinien wurden Chromosomenpräparate angefertigt, um Aussagen über die Chromosomenzahl machen zu können. Jeweils $3x10^6$ Zellen wurden in 10 ml Medium in T25-Zellkulturflaschen für 24 h bei 37°C kultiviert. 2 h vor der Präparation wurde Colcemid (Endkonzentration 0,2 µg/ml) zur Anreicherung von Mitosen zugegeben. Anschließend wurden die Zellen in ein 12 ml-Kulturröhrchen überführt und bei 1000 rpm für 10 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und die Zellen resuspendiert. Unter Schütteln wurden tropfenweise 5 ml auf 37°C vorgewärmte 0,4 %ige KCl-Lösung (hypoton) zugegeben und anschließend für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Durch den erhöhten äußeren osmotischen Druck quellen die Zellen. Die Zellen wurden dann wiederum bei 1000 rpm für 10 min abzentrifugiert. Die Fixierung der Mitosen erfolgte durch tropfenweise Zugabe von 5 ml Fixierungslösung (Methanol / Eisessig 3+1) und anschließender Inkubation bei Raumtemperatur für 15 min. Nach Abzentrifugieren, Absaugen des Überstandes und Resupendieren des Pellets wurde dieser Schritt noch zweimal wiederholt. Das Pellet resuspendierte man in etwa 1 ml Fixierungslösung. Die Objektträger wurden vor dem Auftropfen der Zellsuspension für 24 h in 2 N $HNO_3$ aufbewahrt, für ca. 20 min in Aqua demin. gespült und dann in der Küvette bis unmittelbar vor dem Auftropfen auf 4°C aufbewahrt. Pro Objektträger wurden 2 Tropfen Zellsuspension aufgetropft. Nachdem die Objektträger über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet worden

waren, wurden sie für 10 min in 5 %iger Giemsa-Färbelösung gefärbt, dann zwei mal kurz mit Aqua bidest gewaschen und nach Trocknen über Nacht bei 37°C in Eukitt eingebettet.

Die Chromosomenzahl pro Mitose wurde am Lichtmikroskop mit Hilfe von *IKAROS*-Software ermittelt, wobei pro Zelllinie 20 Metaphasen ausgezählt wurden. Des Weiteren wurden pro Zelllinie die Anzahl der polyploiden Metaphasen pro 100 Metaphasen bestimmt.

### 2.2.2 Mikronukleustest (MNT)

Der MNT dient dem Nachweis von Chromosomen- und Genommutationen. Sowohl klastogene (chromosomenbrechende) als auch aneugene (chromosomenfehlverteilende) Eigenschaften eines Mutagens können nachgewiesen werden. Als Mikronuklei (MN) bezeichnet man Chromosomenfragmente oder ganze Chromosomen, die bei der Zellteilung nicht auf einen der beiden Tochterkerne verteilt wurden, sondern mit einer eigenen Kernmembran umgeben als zusätzlicher „kleiner“ Kern im Zytoplasma der Tochterzellen verbleiben. In der vorliegenden Arbeit wurde der MNT an humanen Blutzellen und an lymphoblastoiden Zelllinien durchgeführt.

**Ansatz der Blutkulturen**

Die Entstehung eines MN setzt voraus, dass sich die Zelle mindestens einmal geteilt hat. Da Blutzellen zum Wachstum stimuliert werden müssen, und der Anteil an proliferierenden Zellen innerhalb einer Blutkultur sehr variabel sein kann, wurde der modifizierte MNT mit Cytochalasin B durchgeführt (Fenech, 1996). Unter dem Einfluss von Cytochalasin B können Zellen nur noch die Kernteilung, nicht jedoch die Cytokinese durchführen. Man erhält so nach einer Zellteilung zweikernige Zellen, nach weiteren Teilungen auch mehrkernige Zellen. Um sicherzustellen, dass nur Zellen zur Auswertung herangezogen wurden, die mindestens eine Zellteilung durchlaufen hatten, wurden nur die zweikernigen Zellen auf das Vorhandensein von MN untersucht.

In einem Blutkulturröhrchen wurden 300 µl Vollblut zu 3 ml Chromosomenmedium 1A gegeben, das zur Stimulation 2 % PHA enthielt. Zeitpunkt und Dauer der

Mutagenexposition variierten je nach untersuchtem Mutagen. Diese Daten sind in folgendem Schema dargestellt.

| **Substanzen** | **Lösungsmittel** | **Behandlungs-zeitpunkt** | **Behandlungs-dauer** | **Medium-wechsel** | **Gesamt-kultivierung** |
|---|---|---|---|---|---|
| BCNU | EtOH | t = 0 | 16h | + | 68h |
| Bleomycin | Aqua bidest | t = 0 | 16h | + | 68h |
| Cisplatin | DMSO | t = 0 | 16h | + | 68h |
| Cyclo-phosphamid | Hanks | t = 24 | 2h, + S9 Mix (2%) | +, waschen mit Hanks | 72h |
| γ-Strahlung | | t = 0 | - | - | 68h |
| $H_2O_2$ | Aqua bidest | t= 0 | 68h | - | 68h |
| Taxol | Hanks | t = 0 | 16h | + | 68h |
| Vincristin | Aqua bidest | t = 24 | 48h | - | 72h |

Die Zellen wurden für die gesamte Kultivierungsdauer bei 37°C im Brutschrank (5 % $CO_2$) inkubiert. 24 h vor Kulturende wurde den Kulturen 9 µl Cytochalasin B (Endkonzentration 6 µg/ml) zur Hemmung der Zytokinese zugegeben.

**Ansatz der LCL-Kulturen**

Es wurden pro Ansatz ca. $2{,}5 \times 10^6$ Zellen mit 10 ml RPMI-Zellkulturmedium in T25-Flaschen angesetzt und mit $CO_2$ versehen. Während der Gesamtkultivierungsdauer von 40 h wurden die Zellen in einem 37°C Brutschrank inkubiert. Die Mutagenbehandlung der Zellen fand immer zum Zeitpunkt $t_0$ statt, die Dauer der Mutagenexposition variierte je nach untersuchtem Mutagen und ist folgendem Schema zu entnehmen.

| **Substanzen** | **Lösungs-mittel** | **Behandlungs-zeitpunkt** | **Behandlungs-dauer** | **Medium-wechsel** | **Gesamt-kultivierung** |
|---|---|---|---|---|---|
| γ-Strahlung | | t = 0 | - | - | 40h |
| $H_2O_2$ | Aqua bidest | t = 0 | 40h | - | 40h |
| ENU | DMSO | t = 0 | 16h | + | 40h |

Auch hier wurde die Cytochalasin B-Modifikation des MNT verwendet. Zu Beginn der Kultivierungzeit, nach Zugabe des Mutagens, wurden den Kulturen jeweils 9 µl Cytochalasin B (Endkonzentration 2 µg/ml) zugegeben. Bei Behandlung mit ENU wurde nach 16 h ein Mediumwechsel vorgenommen. Die Zellen wurden in

Zentrifugenröhrchen überführt, bei 800 rpm für 10 min abzentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Pellet in frischem Medium resuspendiert. Anschließend wurde wieder Cytochalasin B zugegeben und für weitere 24 h bei 37°C inkubiert. Bei $H_2O_2$-Behandlung wurde kein Mediumwechsel durchgeführt, da $H_2O_2$ nach wenigen Minuten abreagiert.

**Fixierung, Färbung und Auswertung**

Die Präparation der Zellen wurde in Anlehnung an Fenech und Morley (1985) durchgeführt. Die Zellen wurden bei 800 rpm zentrifugiert und der Überstand zur Hälfte abgenommen. Nach Aufklopfen des Zellpellets wurden 2 ml eiskalte 0,56 % KCl-Lösung zugetropft und die Blutkulturen sofort zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und die Zellen in 5 ml eiskalter Fixierungslösung I (Methanol + Eisessig = 5:1; gemischt mit dem gleichen Volumen 0,9 % NaCl) aufgenommen. Nach 15 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde erneut zentrifugiert und die Zellen in 5 ml der eiskalten Fixierungslösung II (Methanol : Eisessig = 5:1) resuspendiert. Insgesamt wurde dreimal mit der Fixierungslösung II fixiert. Nach dem letzten Fixierungsschritt wurde die Zellsuspension vorsichtig auf einen trockenen Objektträger aufgebracht und mit Hilfe einer Heizplatte so getrocknet, dass das Zytoplasma möglichst groß ausgebreitet, die Zellgrenzen jedoch noch gut zu erkennen waren.

Zur Auswertung wurden die Präparate mit Acridinorange oder für die Herstellung von Dauerpräparaten mit Giemsa gefärbt. Zur Fluoreszenzfärbung wurden die Präparate kurz (1-3 s) in Acridinorange-Färbelösung getaucht, in $H_2O$ gründlich gespült und anschließend mit einem Deckglas und $H_2O$ eingedeckt. Die Auswertung erfolgte unter einem Fluoreszenzmikroskop bei 400-facher Vergrößerung (Anregungsfilter: BP 450-490 nm; Sperrfilter: LP 520 nm). Zur Herstellung von Dauerpräparaten wurden die Objektträger für 8-10 min in 7 %iger Giemsa-Färbelösung gefärbt, anschließend zwei mal kurz in Leitungswasser gespült und bei 37°C getrocknet. Die getrockneten Präparate wurden in Eukitt eingebettet und mit einem Deckglas versehen. Die Auswertung erfolgte bei dieser Färbung an einem Lichtmikroskop.

Pro Ansatz einer Blutkultur wurden 1000 binukleäre Zellen (BNC), pro Ansatz einer LCL wurden 500 BNC auf das Vorhandensein von MN hin untersucht. MN wurden nur dann gewertet, wenn sie den publizierten Kriterien entsprachen (Fenech, 1993):

- MN-haltige Zellen besitzen zwei ähnlich große Hauptkerne
- MN sind morphologisch identisch zum Hauptkern
- Der Durchmesser des MN ist nicht größer als ein Drittel des Hauptkerns
- MN und Hauptkern sind nicht durch eine nukleoplasmatische Brücke verbunden

Als Ergebnis wurde die Anzahl der MN pro 1000 (Blut) bzw. 500 (LCL) ausgewerteter Zellen (MN / 1000 BNC) angegeben. Durch Bestimmung des Anteils ein- bis mehrkerniger Zellen unter 500 Zellen konnte ein Proliferationsparameter, der „nuclear division index“ (NDI) bestimmt werden. Der NDI wird wie folgt berechnet:

$$NDI = \frac{1x\ (\text{Zellen mit } 1\ \text{Kern}) + 2x\ (\text{Zellen mit } 2\ \text{Kernen}) + 3x\ (\text{Zellen mit } 3\ \text{Kernen}) + 4x\ (\text{Zellen mit } 4\ \text{Kernen})}{\text{Anzahl ausgezählter Zellen}}$$

### 2.2.3 Schwesterchromatidaustauschtest (SCE-Test)

Der SCE-Test ist ein Indikatortest, mit welchem die genotoxische Wirkung von Substanzen untersucht werden kann. Es basiert auf der Grundlage reziproker Austausche zwischen den DNA Molekülen eines replizierenden Chromosoms. Diese Schwesterchromatidaustausche treten sowohl spontan als auch mutageninduziert auf. Die Vorteile des SCE-Tests liegen vor allem in seiner Empfindlichkeit, Schnelligkeit und eindeutiger Auswertbarkeit. Er ist wenig störanfällig und gut reproduzierbar (Latt et al., 1981, Swierenga et al., 1991). Um einen Austausch zwischen den Chromatiden beobachten zu können, müssen die Schwesterchromatiden unterschiedlich markiert werden. Dies erfolgt mit dem Thymidinanalogon Bromdesoxyuridin (BrdU), das statt Thymidin in die DNA eingebaut wird. Nach der ersten Replikation nach BrdU-Gabe sind beide Chromatiden unifilar substituiert und färben sich gleich an. Nach der zweiten S-Phase sind die Chromatiden asymmetrisch substituiert. Eine Chromatide ist in beiden Strängen mit BrdU substituiert und färbt sich nur schwach an, die andere Chromatide ist lediglich unifilar substituiert und färbt sich dunkel an. Somit kann nach der zweiten

Replikation der Zellen zwischen den beiden Chromatiden unterschieden werden und SCE können detektiert werden.

Es wurden pro Konzentration 300 µl Vollblut in je 3 ml vorgewärmtes Chromosomenmedium 1A mit 2% PHA gegeben. Zur Darstellung der SCEs wurden 60 µl BrdUrd-Stammlösung (Endkonzentration 10 µg/ml) zugegeben und die Zellen wurden für insgesamt 72 h im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Die Zugabe der Mutagene erfolgte bei Ansatz der Kulturen für 16 h. Zwei Stunden vor Ende der Inkubation wurden 60 µl Colcemid zur Anreicherung von Mitosen zugegeben. Die Zellen wurden abzentrifugiert und die Chromosomen wurden präpariert (siehe 2.2.1). Zur Unterscheidung der unifilar, bzw. bifilar mit BrdU substituierten Chromatiden wurden die Präparate mit einer Fluoreszenz plus Giemsa Färbung gefärbt. Dazu wurden die mindestens 24 h alten Präparate in einer Färbewanne mit Sörensenspuffer (pH 6,8) bedeckt und für 30 min UV bestrahlt (254 nm; 8W-Röhre, 15cm Abstand). Nach einer Inkubation bei 60°C in einer Küvette mit 2xSSC für 60 min wurden die Präparate in einer Küvette mit 5%iger Giemsa-Färbelösung für 10 min gefärbt, anschließend zweimal mit Aqua dest gespült und gut getrocknet. Zur besseren Haltbarkeit werden die Objektträger mit Eukitt eingedeckt und im Lichtmikroskop ausgewertet.

Pro Ansatz wurden 20 Metaphasen auf die Anzahl der SCEs untersucht und der Mittelwert berechnet. Dabei wurden nur Metaphasen ausgewertet, die eine normale Chromosomenanzahl aufwiesen, d.h. 46±2 Chromosomen.

### 2.2.4 Comet-Assay (Einzelzellgelelektrophorese)

Der Comet-Assay (Einzelzellgelelektrophorese) ist ein Genotoxozitätstest zum Nachweis von DNA-Strangbrüchen auf Einzelzellebene. Mit ihm können einfach, schnell und sensitiv DNA-Schäden nachgewiesen werden. DNA-Doppelstrangbrüche wie auch Einzelstrangbrüche und auch alkalilabile Stellen können detektiert werden. Der Comet-Assay wurde erstmals von Singh et al. (1988) beschrieben. Neben der alkalischen Version (pH 13) existieren auch Protokollvarianten, bei denen die Objektträger nach der Lyse in einem Puffer mit niedrigerem pH-Wert als 13 ausgesetzt werden. Bei einem pH von 9 oder von 8,3 führen vorwiegend Doppelstrangbrüche zu einer Migration der DNA. In dieser Arbeit

wurden drei verschiedene Versionen des Comet-Assays verwendet. Im folgenden wird daher der alkalische Comet-Assay detailliert beschrieben, für die zwei anderen Protokolle werden nur die jeweiligen Modifikationen aufgeführt.

### 2.2.4.1 Comet-Assay bei pH 13

Die von Singh et al. (1988) eingeführte Methode wurde in modifizierter Form durchgeführt (Speit und Hartmann, 1999). In der alkalischen Form des Comet-Assay können Strangbrüche und alkalilabile Stellen detektiert werden. Der schematische Ablauf ist in Abb.5 dargestellt.

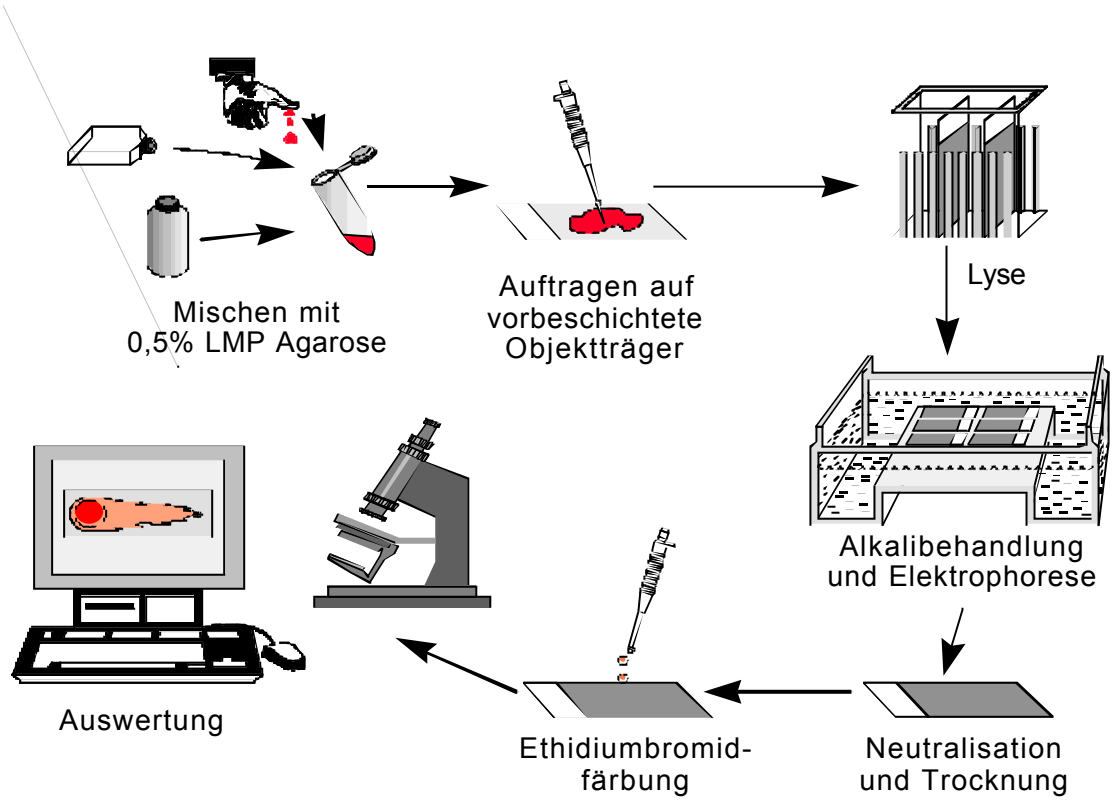



Abb. 5: Schematischer Ablauf des Comet-Assays

**Herstellung der Präparate**

Objektträger mit Mattrand wurden an der dem Mattrand gegenüberliegenden Seite mit einem Diamantschreiber eingeritzt und bis zur Hälfte des Mattrandes in 60°C warme Agarose (1,5 % MEEO in 1xPBS) eingetaucht. Das Einritzen der Objektträger sorgt für bessere Haftung der basalen Agaroseschicht auf den Objektträgern. Die

Unterseite der Objektträger wurde abgewischt und die Objektträger wurden horizontal getrocknet. So hergestellte Objektträger können über Monate hinweg aufbewahrt werden.

Die Zellen wurden zunächst einer Mutagenbehandlung unterzogen. Nach dieser Behandlung wurden 5 µl Vollblut oder 10 µl Zellsuspension in 120 µl LowMeltingPoint-Agarose (0,5 % Sea Plaque GTG Agarose in 1xPBS, 37°C) aufgenommen und auf die Basalschicht eines Objektträgers pipettiert. Durch Auflegen eines Deckglases (24x60 mm) erhält man eine gleichmäßige Schicht. Nach Aushärten der Agarose wurde das Deckglas vorsichtig abgezogen und die Objektträger wurden für mindestens eine Stunde in einer lichtgeschützten Küvette mit 4°C kalter Lyselösung im Kühlschrank aufbewahrt. Der Lyseschritt dient dem Entfernen von Membranen und Proteinen, die Kern-DNA liegt danach frei in der Agaroseschicht vor.

**Alkalidenaturierung und Elektrophorese**

Nach der Lyse wurden die Objektträger in eine horizontal ausgerichtete, im Eisbad stehende Elektrophoresekammer gelegt. Zur Alkalidenaturierung wurden die Objektträger mit auf 4°C vorgekühltem Alkali-Elektrophoresepuffer überschichtet, und für 25 min vor Licht geschützt inkubiert. Der Alkali-Elektrophoresepuffer wird so eingestellt, dass er einen pH-Wert von über 13 erreicht. Daher wird diese alkalisceh Version des Comet-Assays in dieser Arbeit als Comet-Assay pH 13 bezeichnet. Während dieser Zeit kommt es zur Denaturierung des DNA-Doppelstrangs und alkalilabile Stellen werden zu Einzelstrangbrüchen umgewandelt. Anschließend wurde mit dem gleichen Puffer eine Elektrophorese bei einer Spannung von 25 V (0,86 V/cm) und einer Stromstärke von 300 mA für 25 min durchgeführt. Auch während der Elektrophoresezeit wurde direkter Lichteinfall durch Abdecken der Elektrophoresekammer vermieden. Die Zeiten für Alkalibehandlung und Elektrophorese wurden auf 25 min festgelegt, da die unbehandelten Zellen nach diesem Protokoll eine minimale DNA-Migration aufweisen.

**Neutralisierung und Anfärben der Präparate**

Nach der Elektrophorese wurden die Objektträger aus der Elektrophoresekammer genommen, auf ein Färbebänkchen horizontal aufgelegt und 3 x 5 min mit

Neutralisationspuffer überschichtet. Nach der Neutralisation wurden die Objektträger für 5 min in 100 %igem Ethanol absolut dehydriert und danach zum Trocknen vertikal aufgestellt. Unmittelbar vor der Auswertung erfolgte die Färbung der Objektträger mit 50 µl Ethidiumbromid (20 µg/ml). Es wurde ein Deckglas aufgelegt und die Objektträger wurden in einer dunklen feuchten Kammer aufbewahrt.

**Mikroskopie und Auswertung**

Zur Auswertung wurde ein Fluoreszenzmikroskop mit einem Anregungsfilter bei 515 - 560 nm und einem Sperrfilter bei 590 nm verwendet. Mit einem PC-gestützten Bildanalysesystems, das über eine CCD - Kamera und eine Digitalisierkarte an das Mikroskop angeschlossen war, konnten verschiedene Parameter der DNA-Migration bestimmt werden. Die Auswertung wurde bei 400-facher Vergrößerung mit der Softwareversion Comet-Assay II Messsystem V1.03 durchgeführt. In dieser Arbeit wurde der Parameter Tailmoment für das Maß der DNA-Migration verwendet. Das Tailmoment wird berechnet aus dem Produkt von relativer Fluoreszenzintensität des Kometenschweifs gegenüber dem Kometenkopf (% an gewanderter DNA) und aus der auf den Schwerpunkt des Schweifes korrigierten Wanderungslänge. Pro Objektträger wurden 50 Zellen vermessen. Die Zellen wurden zufällig ausgewählt, wobei Zellen aus dem Randbereich des Objektträgers aufgrund möglicher unspezifischer DNA-Effekte nicht berücksichtigt wurden. Es wurden nur Zellen mit rundem Kopf zur Auswertung herangezogen. Von den 50 gemessenen Zellen wurde in dieser Arbeit der Mittelwert des Tailmoments als Maß der Schädigung herangezogen. Wurde ein anderer Parameter als Maß der DNA-Schädigung verwendet, so wurde dies gesondert aufgeführt.

### 2.2.4.2 Comet-Assay bei pH 9

Das Protokoll des Comet-Assays bei pH 9 wurde 1997 von Singh und Stephens eingeführt. Es können damit Doppelstrangbrüche nachgewiesen werden. Im Unterschied zu dem alkalischen Comet-Assay bei pH 13 wurde ein Tris-Acetat-Puffer mit pH 9 verwendet. Die Objektträger wurden darin nach der Lyse für 20 min equilibriert und anschließend wurde eine Elektrophorese bei einer Spannung von 12 V (0,41 V/cm) und 50 mA für 60 min durchgeführt. Sowohl Equilibrierung wie auch Elektrophorese erfolgten in einer im Eisbad stehenden Elektrophoresekammer mit vorgekühltem Puffer.

#### 2.2.4.3 Comet-Assay bei pH 8,3

Eine andere neutrale Version des Comet-Assays wurde von Wojewodzka et al. im Jahr 2002 publiziert. Es wurde in dieser Arbeit mit Hilfe spezifischer Antikörper gegen einzelsträngige DNA gezeigt, dass unter den neutralen Bedingungen bei pH 8,3 nur doppelsträngige DNA vorlag. Im Unterschied zu den beiden zuvor beschriebenen Versionen des Comet-Assays wurden hier die Lyse der Objektträger bei pH 9,5 durchgeführt. Für Equilibrierung und Elektrophorese wurde ein Tris-Acetat-Puffer mit pH 8,3 verwendet. Die Objektträger wurden in dem Puffer zunächst 3 x gewaschen und anschließend darin für 1 h equilibriert; dies erfolgte in einer Küvette. Zur Durchführung der Elektrophorese wurden die Präparate in eine Elektrophoreskammer gelegt, mit frischem Puffer überschichtet und es wurde bei einer Spannung von 14 V (0,48 V/cm) und 60 mA für 1 h durchgeführt. Dazu wurde auf 4°C vorgekühlter Puffer verwendet, die Elektrophoresekammer stand in einem Eisbad.

### 2.2.5 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)

Die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung findet normalerweise in der Zytogenetik Anwendung. Die Hybridisierung wird auf fixierten Metaphasen durchgeführt und es können hiermit z.B. chromosomale Rearrangements durch genaue Lokalisation von DNA-Sequenzen nachgewiesen werden. Hybridisierungssonden können entweder in direkt mit Fluoreszenzfarbstoff markierter Form oder in indirekt markierter Form vorliegen. In dieser Arbeit wurden indirekt markierte Sonden (Markierung mit Biotin oder Digoxigenin) verwendet. Dies hat den Vorteil, dass das Fluoreszenzsignal durch wiederholte Nachweisreaktionen beliebig verstärkt werden kann.

#### 2.2.5.1 Hybridisierungssonden

Zwei der drei hier verwendeten Sonden wurden gekauft, eine der Sonden wurde wie im Folgenden beschrieben hergestellt.

Die Hybridisierung der p53 Region wurde mit einer käuflichen digoxygenin-markierten Sonde durchgeführt. Die Sonde überspannte die Region des p53-Gens mit etwa 140 kb und ist auf Chromosom 17q13.1 lokalisiert.

Die FISH-Analyse von Mikronuklei wurde mit einer Biotin-markierten “human pan centromeric“ Hybridisierungssonde durchgeführt. Diese Sonde bindet an allen Centromeren des menschlichen Genoms.

Die NF1-Sonde wurde selbst hergestellt. Vier überlappende Fragmente des NF1-Gens lagen in Form von Cosmiden (enthalten je ~ 40 kb genomischer DNA) vor und überspannen eine Region von 120 Kb des 3`Endes des NF1-Gens.

**Isolation der NF1-Cosmid-DNA**

Zur Präparation dieser NF1-Cosmid-DNA aus *E.coli* wurde eine 250 ml LB-Medium-Kanamycin (50 mg/ml) Übernachtkultur verwendet. Mit Hilfe des „Qiafilter Plasmid Midi Kits“ von Qiagen wurde die DNA laut Angaben des Herstellers am folgenden Tag isoliert und in je 150 µl TE-Puffer über Nacht auf dem Schüttler gelöst.

**Markierung der Sonde mit Hilfe der Nick-Translation**

Nach Bestimmung der DNA-Konzentration wurde die Cosmid-DNA in einer Nicktranslation markiert. Die Methode der Nicktranslation zur Fluoreszenz-Markierung von DNA wurde von Langer et al. (1981) publiziert. Diese Methode basiert auf zwei verschiedenen enzymatischen Reaktionen. Die DNase I aus *E. coli* spaltet in gewissen Abständen Phosphodiesterbindungen der doppelsträngigen DNA-Sonde („nicks“). Ausgehend von diesen geöffneten Phosphodiesterbindungen baut die DNA-Polymerase durch ihre Exonuklease-Aktivität die DNA in Replikationsrichtung ab. Gleichzeitig wird ein neuer Tochterstrang unter Verwendung der im Reaktionsmix enthaltenen modifizierten Nukleotide synthetisiert. Durch Variation der eingesetzten Menge an DNaseI kann die Fragmentlänge der markierten Sonde beeinflusst werden. DNA-Fragmente von 100 -500 bp Länge gelten als ideal für den Comet-FISH-Assay. Pro Ansatz wurden jeweils 1,2 µg DNA mit Digoxigenin-11-dUTP markiert.

Pipettierschema der Nicktranslation:

| Substanz | Menge |
|---|---|
| 10 x NT-Puffer | 10 µl |
| 0,1 M Mercaptoethanol | 10 µl |
| dNTP-Mix | 10 µ |
| Dig-dUTP | 4 µl |
| DNA Polymerase I | 2 µl |
| DNase (1:1000) | 4 µl |
| Sonden-DNA (1,2 µg) | x µl |
| Aqua bidest (ad 100 µl) | x µl |

Der Ansatz wurde für 90 min bei 15°C inkubiert. Die Fragmentgröße wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese überprüft. Zur Inaktivierung der Enzyme wurde 1 µl 0,5 M EDTA zugegeben und für 10 min bei 65°C inkubiert.

Vor dem Fällen wurde der digoxigeninmarkierten DNA je Ansatz 20 µg Heringssperma DNA und 20-30 µg Human Cot-1 DNA zur Absättigung der unspezifischen Sequenzen zugegeben. Nach gutem Durchmischen mit 1/10 Volumen 3 M Na-Acetat und 2 Volumina eiskaltem Ethanol absolut (-20°C) wurden die Proben für 2 h bei -70°C gefällt. Nach 30-minütiger Zentrifugation bei maximaler Geschwindigkeit und 4°C wurde der Überstand verworfen und das Pellet mit 70% eiskaltem Ethanol gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurde der Überstand verworfen und das Pellet getrocknet. Zum Lösen des Pellets wurden zunächst 30 µl Formamid zugegeben und mindestens 2 h unter Schütteln bei 37°C inkubiert. Hatte das Pellet sich gelöst, so wurde 30 µl Mastermix zugegeben. Die so vorbereiteten Hybridisierungssonden können bei -20°C einige Monate aufbewahrt werden.

**Vorbehandlung der Sonden**

Je 10 µl p53-Sonde wurden für 5 min auf 37°C erwärmt und auf ein Präparat aufgetragen. Je 30 µl der NF1-Sonde (~600ng) wurden zunächst für 6 min bei 76°C denaturiert und dann für 30 min bei 37°C vorhybridisiert zur Absättigung der hochrepetitiven Sequenzen mit der im Mix enthaltenen Human Cot-1 und der Heringssperma-DNA. Je 20 µl der Sonde wurden auf ein Präparat pipettiert und mit einem Deckglas abgedeckt.

### 2.2.5.2 FISH auf Metaphasen

Die käuflich erworbene p53-DNA-Sonde, wie auch die selbst hergestellte NF1-DNA-Sonde wurden bei einer FISH auf Metaphasechromosomen auf ihre Spezifität hin untersucht. Dazu wurden Chromosomenpräparate aus Vollblut angefertigt (siehe 2.2.1.). Nach der Trocknung wurden die Präparate bis zur Hybridisierung bei –20°C tiefgefroren. Am Tag vor der Hybridisierung wurden die Präparate aufgetaut und über Nacht bei 37°C getrocknet. Um unspezifische Bindung der Sonde zu verhindern und die chromosomale DNA für die Sonde besser zugänglich zu machen, wurden die Präparate mit RNase und Pepsin behandelt. Dazu wurden 150 µl RNase-Lösung (100 µg/ml) auf die Objektträger pipettiert, diese mit einem Deckglas eingedeckt und für 1 h bei 37°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Anschließend wurde das Deckglas entfernt, die Präparate erst einmal kurz, dann dreimal für je 5 min in 2xSSC bei Raumtemperatur gespült. Es folgte eine Inkubation für 8 min bei 37°C in Pepsin-Lösung (0,2 µg/ml in 0,01M HCl, pH2,3), danach wurden die Objektträger einmal kurz und zweimal für je 5 min in 1xPBS gewaschen. Nun wurden die Präparate für 5 min in 1xPBS / 50 mM $MgCl_2$ inkubiert und dann für 15 min in 1% Formaldehyd in 1xPBS / 50 mM $MgCl_2$ fixiert. Dies dient der Erhaltung der Chromosomenstruktur. Nach zweimaligem Spülen für 5 min in 1xPBS wurden die Objektträger in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70%, 70%, 90%, 95%, 99%, 99%) entwässert und bei Raumtemperatur für 1 - 2 h getrocknet.

Die getrockneten Präparate wurden für 1 min in einer Küvette mit 70% Formamid / 2xSSC bei 76°C denaturiert, sofort kurz in kaltem (4°C) 2xSSC, dann in kaltem 70% Alkohol kräftig gespült. Anschließend erfolgte eine Entwässerung über eine aufsteigende Alkoholreihe (70%, 90%, 95%, 99%, 99%). Die Objektträger wurden bei Raumtemperatur 1 – 2 h getrocknet.

Die NF1-Sonde (siehe auch 2.2.5.1.) wurden vor der Verwendung 5 min bei 72°C denaturiert und dann, zur Absättigung der unspezifischen Sequenzen mit der bereits im Hybridisierungsmix enthaltenen Human Cot-1 DNA 30 min bei 37°C inkubiert. 12 µl der Hybridisierungslösung wurden auf die vorgewärmten Objektträger pipettiert und unter einem Deckglas (24x24 mm) luftblasenfrei eingedeckt. Das Deckglas wurde mit Fixogum umrandet und die Präparate wurden über Nacht auf dem Boden einer Metallkassette im 37°C Wasserbad inkubiert. Die p53-Sonde wurde nach

Angaben des Herstellers 5 min auf 37°C erwärmt, dann wurden jeweils 10 µl der Hybridisierungsmixes auf die Präparate aufgetragen, ebenfalls mit einem Deckglas abgedeckt und mit Fixogum verschlossen. Auch hier wurde in einer feuchten Kammer bei 37°C über Nacht hybridisiert. Die Präparate wurden aus dem Wasserbad genommen, Fixogum wurde entfernt und das Deckglas wurde in einer Küvette mit 45°C warmem 2xSSC abgeschwemmt. Danach wurden die Präparate in 50% Formamid / 2xSSC, pH 7, 45°C auf dem Schüttler bei RT 3 x 10 min gespült, im Anschluss 2x5 min in 2xSSC, pH 7 , 45°C auf dem Schüttler bei RT, dann 2 x 5 min in 0,2 x SSC, 60°C auf dem Schüttler bei RT gewaschen und in einer Küvette mit 4xSSC/0,1% Tween 20, RT gesammelt.

Zur Unterdrückung von unspezifischer Bindung der Antikörper wurden die Objektträger für 30 min in Blocking-Lösung bei 37°C inkubiert und anschließend kurz in 4xSSC/0,1%Tween20 gespült. Zum Nachweis der biotinylierten DNA-Sonde mit dem Fluorescein-Avidin-Antikörper wurde der Antikörper 1:200 mit 1% BSA in 4 x SSC / 0,1%Tween20 auf ein Konzentration von 10 µg/ml verdünnt, gut gemischt, 5 min bei 13000 rpm abzentrifugiert und lichtgeschützt aufbewahrt. Auf einer Heizplatte (38°C) wurden Deckgläser (24x50 mm) vorbereitet und 150 µl der Antikörper pro Deckglas wurden aufgetragen. Das Deckglas wurde mit dem Objektträger so aufgenommen, dass sich die zu hybridisierende Seite mit dem Deckglas auf der Unterseite befindet („hängender Tropfen“). Die Präparate wurden in dieser Stellung für 40 min bei 37°C in einer feuchten, dunklen Kammer inkubiert. Im Anschluss daran wurden die Objektträger in eine Küvette gestellt und 3 x 5 min in 4 x SSC / 0,1%Tween20, vorgewärmt auf 45°C auf dem Schüttler bei RT gespült. Zur Verstärkung des Signals wurden die Präparate mit einem biotinyliertem Anti-Avidin-Antikörper inkubiert. Dazu wurde der Antikörper 1:100 auf eine Konzentration von 5µg/ml verdünnt in 4 x SSC/ 0,1%Tween20/ 1%BSA, gut gemischt, abzentrifugiert und lichtgeschützt aufbewahrt. 150 µl wurden auf vorgewärmte Deckgläser aufgebracht und wie oben beschrieben wurden die Präparate über Kopf 45 min bei 37°C in einer feuchten, dunklen Kammer inkubiert. Anschließend werden die Präparate dreimal für 5 min in 4 x SSC/ 0,1%Tween20 bei 45°C gespült. Der Nachweis des biotinylierten Anti-Avidin-Antikörpers mit dem Fluorescein-Avidin-Antikörper erfolgte wie in obigem Abschnitt beschrieben. Die Gegenfärbung zum Sichtbarmachen der Kerne und des Cytoplasmas erfolgte mit einer DAPI -

Propidiumiodid-Lösung. Nach 10 min in der Färbelösung wurden die Präparate in Aqua bidest gespült und luftgetrocknet. Nach Eindecken der Präparate mit 20 µl Vectashield, zum Schutz gegen vorschnelles Ausbleichen, und Auflegen eines Deckglases erfolgte die Auswertung im Fluoreszenzmikroskop mit entsprechenden Filtern.

#### 2.2.5.3 FISH-Analyse von Mikronuklei

MN können durch zwei verschieden Mechanismen entstehen. Entweder werden durch klastogene Substanzen Chromosomenbrüche induziert, dann enthalten die MN Chromosomenfragmente, oder es werden durch Spindelgifte Chromosomenfehlverteilungen induziert, dann bestehen die MN aus ganzen Chromosomen. Eine Methode den Entstehungsmechanismus von MN zu untersuchen bietet die FISH-Analyse. In dieser Arbeit wurde mit einer „human pan centromeric“ Sonde, mit der alle Chromosomen des menschlichen Genoms markiert werden, auf MNT-Präparate hybridisiert. Die Analyse der MN auf das Vorhandensein von Fluoreszenzsignalen gibt Auskunft über ihren Entstehungsmechanismus: ist in einem MN ein Centromersignal zu erkennen, so nimmt man an, dass dieser MN durch Fehlverteilung eines ganzen Chromosoms entstanden ist, ist in dem MN kein Signal zu erkennen, so deutet dies auf Entstehung des MN durch einen Chromosomenbruch hin.

**Vorbehandlung der MNT-Präparate**

Die MNT-Präparate (siehe MNT-2.2.1.) wurden bei –20°C aufbewahrt und einen Tag vor der Hybridisierung in den Brutschrank auf 37°C gestellt. Zunächst wurden die Objektträger für 5 min in 2 x SSC rehydriert, dann wurden die Präparate für 3 min in 2xSSC / 0.1% Triton X-100 (80 µl Triton X -100 in 80 ml 2xSSC) behandelt, was dem Aufbrechen von Zellkernen und Mikronuklei diente, um der Sonde ein Eindringen zu ermöglichen. Es schloss sich ein 2-minütiger Waschschritt in 2xSSC an, danach 10 min Fixierung in 4% Formaldehyd (4,3 ml 37%iges Formaldehyd + 30 ml 2xSSC) bei Raumtemperatur. Nach erneutem Waschen in 2xSSC (5min) wurden die Präparate in 70% Formamid, 2xSSC (59 ml + 21 ml, pH 7 einstellen mit HCl) bei 72-74°C für 10 min denaturiert. Die Objektträger wurden in einer eiskalten aufsteigenden Ethanol-Reihe (70, 90, 100%) dehydriert und anschließend 1 – 2 h luftgetrocknet.

**Hybridisierung**

Die “human pan-centromeric“ Hybridisierungsprobe wird 5 min auf 37°C erwärmt und gut durchgemischt. Für jeden Objektträger wurde eine 25 µl Portion des Hybridisierungsmixes in ein Eppendorfgefäß pipettiert und für 10 min bei 85°C denaturiert und danach sofort auf Eis gekühlt. Der Hybridisierungsmix wurde aufgetragen, ein 24 x 50 mm Deckglas wurde aufgelegt und mit Fixogum auf dem Objektträger fixiert um ein Verdampfen des Hybridisierungsmix zu verhindern. Die Präparate wurden über Nacht bei 37 °C im Wasserbad inkubiert.

**Waschen**

Die Präparate wurden aus dem Wasserbad genommen, Fixogum wurde entfernt und das Deckglas wurde in einer Küvette mit 45°C warmem 2xSSC abgeschwemmt. Danach wurden die Präparate in 50%Formamid / 2xSSC, pH 7, 45°C auf dem Schüttler bei RT 3 x 10 min gespült. Im Anschluss folgten 2 x 5 min in 2xSSC, pH 7, 45°C auf dem Schüttler bei RT, 2 x 5 min in 0,2 x SSC, 60°C auf dem Schüttler bei RT gewaschen. Nach diesem Schritt wurden die Objektträger in einer Küvette mit 4 x SSC/0,1% Tween 20, bei RT gesammelt.

**Nachweis**

Zur Unterdrückung von unspezifischer Bindung der Antikörper wurden die Objektträger für 30 min in Blocking-Lösung (5 % BSA in 4xSSC/0,1% Tween20, filtriert) bei 37°C inkubiert und anschließend kurz in 4xSSC/0,1%Tween20 gespült. Zum Nachweis der biotinylierten DNA-Sonde mit dem Fluorescein-Avidin-Antikörper wurde der Antikörper 1:200 mit 1% BSA in 4 x SSC / 0,1%Tween20 auf eine Konzentration von 10 µg/ml verdünnt, gut gemischt, 5 min bei 13000 rpm abzentrifugiert und lichtgeschützt aufbewahrt. Auf einer Heizplatte (38°C) wurden Deckgläser (24x50 mm) vorbereitet und 150 µl der Antikörper pro Deckglas wurden aufgetragen. Das Deckglas wurde mit dem Objektträger so aufgenommen, dass sich die zu hybridisierende Seite mit dem Deckglas auf der Unterseite befindet („hängender Tropfen“). Die Präparate wurden in dieser Stellung für 40 min bei 37°C in einer feuchten, dunklen Kammer inkubiert. Im Anschluss daran wurden die Objektträger in eine Küvette gestellt und 3 x 5 min in 4 x SSC/0,1%Tween20, vorgewärmt auf 45°C auf dem Schüttler bei RT gespült. Zur Verstärkung des Signals wurden die Präparate mit einem biotinyliertem Anti-Avidin-Antikörper inkubiert. Dazu

wurde der Antikörper 1:100 auf eine Konzentration von 5 µg/ml verdünnt in 4xSSC/ 0,1%Tween20/ 1%BSA, gut gemischt, abzentrifugiert und lichtgeschützt aufbewahrt. 150 µl wurden auf vorgewärmte Deckgläser aufgebracht und wie oben beschrieben wurden die Präparate über Kopf 45 min bei 37°C in einer feuchten, dunklen Kammer inkubiert. Anschließend wurden die Präparate dreimal für 5 min in 4 x SSC/ 0,1%Tween20 bei 45°C gespült. Der Nachweis des biotynilierten Anti-Avidin-Antikörpers mit dem Fluorescein-Avidin-Antikörper erfolgt wie in obigem Abschnitt beschrieben. Die Gegenfärbung zum Sichtbarmachen der Kerne und des Cytoplasmas erfolgte mit einer DAPI - Propidiumiodid-Lösung (90µl DAPI ; 1 mg/ml + 30µl Propidiumiodid; 0,1 mg/ml in 90 ml 4 x SSC/0,1%Tween20). Nach 10 min in der Färbelösung wurden die Präparate in Aqua bidest gespült und luftgetrocknet.

#### 2.2.5.4 Comet-FISH-Assay

Der Comet-FISH-Assay ist eine kombinierte Methode aus Comet-Assay und Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH). Der Comet-Assay wurde unter 2.2.4 bereits beschrieben. Mit seiner Hilfe kann die Induktion von DNA-Schäden wie auch deren Reparatur untersucht werden. Es wird hierbei immer der Schaden wie auch die Reparatur im gesamten Genom der Zelle detektiert. In Kombination mit FISH bietet sich die Möglichkeit von genregionspezifischen Untersuchungen auf Einzelzellebene. Es können sowohl die induzierten Schäden in bestimmten Genregionen wie auch die Reparatur dieser Regionen untersucht werden.

**Herstellen der Präparate**

Der Comet-Assay wird durchgeführt wie unter 2.2.4. beschrieben, mit dem Unterschied, dass hier ein Gelsandwich aus verschiedenen Agaroseschichten verwendet wird. Auf die Objektträger wird eine Basalschicht aus einer 1%iger Agarose (MEEO in 0,05M PBS) aufgetragen. Dazu werden 100 µl der auf 50°C temperierten Agaroselösung auf einen Objektträger pipettiert und mit einem zweiten Objektträger gleichmäßig verteilt und luftgetrocknet. Die Mittelschicht wird am Vortag des Experiments aufgetragen. 400 µl einer 1%igen Agaroselösung (MEEO in 0,1M PBS, 50°C) werden auf die vorbeschichteten Objektträger aufgetragen und mit einem Deckglas abgedeckt, um eine gleichmäßige Schicht zu erhalten. Um die Agarose zu verfestigen werden die Objektträger kurz auf eine kalte Metallplatte gelegt, dann werden sie über Nacht in einer feuchten Kammer bei 4°C gelagert.

Die Zellen werden mit 5 Gy bestrahlt und direkt nach Bestrahlung wie auch nach 10 und 20 min Reparaturzeit auf die am Vortrag präparierten Objektträger aufgetragen. 20 µl Zellsuspension werden mit 80 µl 1%iger LMP-Agarose (in Aqua bidest ) gemischt, auf den Objektträger aufgetragen, mit einem Deckgas abgedeckt und zum Erstarren auf eine gekühlte Metallplatte gelegt. Das Deckglas wird vorsichtig abgezogen und die Objektträger werden zur Lyse für 1 h in eine Küvette mit vorgekühltem Lysepuffer gestellt. Es folgen Alkalidenaturierung, Elektrophorese und Neutralisierung wie unter 2.2.4. beschrieben. Das Dehydrieren der Präparate erfolgt in Ethanol bei 4°C. Die Präparate wurden mindestens drei und bis zu 14 Tagen darin aufbewahrt, danach werden sie einige Stunden luftgetrocknet, bevor sie für die Hybridisierung vorbehandelt werden.

**Vorbehandlung der Präparate**

Die luftgetrockneten Päparate wurden 20 min in Aqua bidest rehydriert. Die Denaturierung der Kometen-DNA erfolgt chemisch in 0,5 M NaOH für 25 min. Eine Hitzedenaturierung, wie bei Metaphasen üblich, würde die Gelschicht auf den Objektträgern zum Schmelzen bringen und somit zerstören. Im Anschluss an die Denaturierung werden die Objektträger in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70%, 80%, 95%) je 5 min dehydriert. Danach werden die Objektträger luftgetrocknet. Sobald das Gel getrocknet ist, sollte die Probe aufgetragen werden, da sich bei Übertrocknung der Präparate das Gelsandwich vom Objektträger lösen kann.

**Hybridisierung**

Auf die Präparate wurden 10 µl der Sonde aufgetragen, mit einem Plastikdeckglas verstrichen und ebenfalls mit einem Plastikdeckglas abgedeckt. Die Präparate wurden in einer feuchten Kammer in ein 37°C Wasserbad gelegt und über Nacht inkubiert.

**Waschen und Nachweis**

Nach Inkubation mit der DNA-Sonde werden die Objektträger am nächsten Tag der Kammer entnommen, das Plastikdeckglas wird vorsichtig abgezogen und die Objektträger werden für 2 min ohne Agitation in 2xSSC Lösung bei 70°C für 2 min gewaschen, vorsichtig herausgenommen und sofort in eiskaltem PBD-Puffer für 5 min inkubiert. Zunächst wurden die Präparate für 15 min in 3% BSA in 1xPBS

geblockt, danach erfolgt die probenspezifische Detektion. Da beide hier verwendeten Sonden Digoxigenein-11-dUTP markiert waren, wurde zunächst 50 µl Anti-Digoxigenin-AP, Fab fragments (1:500 in HNPP-Puffer 2 verdünnt) auf den Objektträger aufpipettiert, mit einem Plastikdeckglas abgedeckt und für 1 h bei 37°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Der Nachweis der alkalischen Phosphatase erfolgte mit Hilfe des „HNPP Fluorescent Detection Set“ laut Angaben des Herstellers. Zur Verstärkung des Fluoreszenzsignals wurde die Inkubation der Objektträger mit HNPP / Fast Red TR-Lösung einmal wiederholt. Die Präparate wurden mit DAPI (70 µl DAPI (1mg/ml) in 70 ml 4xSSC/0,1% Tween20) 5 min gegengefärbt. Um vorschnelles Ausbleichen der Präparate zu verhindern, wurden 20 µl Vectashield auf die Objektträger pipettiert, bevor sie mit einem Deckglas eingedeckt wurden. Bis zur Auswertung wurden sie in einer dunklen, feuchten Kammer bei 4°C aufbewahrt.

**Auswertung**

Die Auswertung erfolgte an einem Fluoreszenzmikroskop (Axioplan, Zeiss), mittels zwei spezifischer Filter für die verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe DAPI und Texas-Rot, mit der CCD-Kamera IMAC CCD S30 und dem Bildanalysesystem ISIS V3.05 (MetaSystems) Bei 630-facher Vergrößerung wurden die Signale in Kometenkopf und Kometenschweif bestimmt.

## 2.2.6 Sequenzierung

Um die bekannten Mutationen der verwendeten lymphoblastoiden Zelllinien im *BRCA1*-Gen zu bestätigen und eine Verwechslung der Zelllinien auszuschließen, wurden alle sechs Zelllinien auf die Mutationen T300G im Exon 5 und 5382insC im Exon 20 mittels Sequenzierung analysiert.

### 2.2.6.1 DNA-Isolierung

$10^7$ Zellen wurden für 5 min. bei 1000 rpm abzentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Dann wurde das Pellet zweimal mit 5 ml 1x PBS gewaschen, anschließend jeweils abzentrifugiert und der Überstand wurde abgesaugt. Das Pellet resuspendierte man in 1 ml DNAzol™. 500 µl kaltes (-20°C) 100 % Ethanol wurde zugegeben. Nach kurzer Inkubation (1 - 3 min.) bei Raumtemperatur, wurde die DNA

als fädiges Präzipitat sichtbar. Mit Hilfe eines Glasstabes überführte man die DNA in ein frisches Gefäß und ein Waschschritt mit 5 ml kaltem (-20°C) 70 % Ethanol folgte. Die DNA wurde kurz bei Raumtemperatur getrocknet und dann in 200 µl TE-Puffer (pH 7,6) gelöst und bis zur Weiterverarbeitung bei 4°C gelagert

#### 2.2.6.2 PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) dient der Amplifizierung von Gensequenzen zwischen zwei Primern. Dabei werden die Primer so gewählt, dass einer auf dem codierenden Strang (*sense*), der zweite auf dem nicht-codierenden Strang (*antisense*) bindet. Durch die wiederkehrende Abfolge von Denaturierung, Primerbindung (*annealing*) und Synthese wird die Sequenz exponentiell amplifiziert. Die verwendeten Primer sind unter 2.1.7 aufgeführt.

Die PCR wurde in 50 µl-Ansätzen mit folgender Zusammensetzung durchgeführt:

| ***Substanz*** | ***Menge*** |
|---|---|
| DNA | 1µl |
| $H_2O$ | 39,8 µl |
| 10x Puffer (15 mM) | 5 µl |
| dNTPs (20 mM) | 0,5 µl |
| Primer 1 (hin) (10 pmol/µl) | 1,25 µl |
| Primer 2 (rück) (10 pmol/µl) | 1,25 µl |
| Taq Polymerase (5 U/µl) | 0,2 µl |

Die Reaktion erfolgte für die Amplifikation von Exon 5 nach dreiminütiger Denaturierung bei 93°C nach folgendem Schema:

| **Schritt** | **Temperatur** | **Dauer** |
|---|---|---|
| Denaturierung | 93°C | 30 sek |
| Annealing | 55°C | 30 sek |
| Synthese | 72°C | 30 sek |

Dieser Zyklus wurde 35 Mal wiederholt. Anschließend wurde für 5 min bei 72°C synthetisiert und auf 4°C abgekühlt. Die Ansätze wurden bei 4°C gelagert.

Die Amplifikation von Exon 20 erfolgte nach folgendem Schema, nachdem ebenfalls für 3 min bei 93°C denaturiert worden war:

| ***Schritt*** | ***Temperatur*** | ***Dauer*** |
|---|---|---|
| Denaturierung | 93°C | 30 sek |
| Annealing | 58°C | 30 sek |
| Synthese | 72°C | 30 sek |

Dieser Zyklus wurde 33 mal wiederholt, es folgte eine Synthesephase für 5 min bei 72°C und dann wurde auf 4°C gekühlt.

#### 2.2.6.3 Gelelektrophoretische Auftrennung und Aufreinigung

Zur Kontrolle wurden die amplifizierten Produkte auf einem 1,5 %igen Agarose-Gel (MEEO-Agarose in 1 x TBE-Puffer, ) aufgetragen. Je 5 µl der PCR-Produkte wurden mit 2 µl Blaumarker aufgetragen, als Längenstandard wurden 5 µl einer 100 bp-Leiter (1 µg/µl) verwendet. Die Elektrophorese erfolgte für 40 min bei 80 V, anschließend wurde das ethidiumbromid gefärbte Gel unter UV-Licht angeschaut.

Lagen die erwarteten Banden vor, so reinigte man das übrige PCR-Produkt mit MicroSpin™-Säulen auf. Hierfür wurden die Säulen durch Zentrifugieren bei 3000 rpm für 1 min equilibriert, anschließend wurde die Probe aufgetragen und durch erneutes Zentrifugieren der in einem Eppendorfgefäß stehenden Säule bei 3000 rpm für 2 min aufgereinigt. Das aufgereinigte PCR-Produkt befand sich nun im Eppendorfgefäß und konnte bei 4°C aufbewahrt werden.

#### 2.2.6.4 Sequenzierungsreaktion der PCR-Produkte

Die Sequenzierung nach Sanger et al. (1977) beruht auf der kontrollierten Unterbrechung der enzymatischen Replikation der DNA. Durch die Bindung eines Primers an eine einzelsträngige DNA kann eine DNA-Polymerase eine Strangverlängerung komplementär zum DNA-Einzelstrang durchführen. Dem Reaktionsansatz wird neben den normalen vier verschiedenen dNTPs auch eine begrenzte Menge an 2',3'-Didesoxynucleotiden (ddNTPs) zugegeben, die bei Einbau in den neusynthetisierten Strang die weitere Elongation blockieren, da die Polymerase keine weiteren Nukleotide am 3'-Ende anfügen kann. Auf diese Weise

entstehen Ketten in allen Längen. Die Sequenzierungsreaktion wird in vier verschiedenen Ansätzen, die sich in der Art des eingesetzten Didesoxynukleotids unterscheiden, durchgeführt, wobei die verwendeten Primer hier am 5'-Ende Cy5-fluoreszenzmarkiert waren. Jede Probe wurde dabei zur Kontrolle sowohl aus Sense- als auch aus Antisense-Richtung sequenziert. Die einzelnen Proben werden durch eine Gelelektrophorese der Größe nach aufgetrennt, wobei die einzelnen Fragmente durch die fluoreszenzmarkierten Primer von einem Laser detektiert werden können. Die Sequenzierung erfolgte mit dem „Cycle Sequencing Kit" der Firma Pharmacia nach Angaben des Herstellers. Die Sequenzierungsreaktion war wie folgt zusammengesetzt:

| ***Substanz*** | ***Menge*** |
|---|---|
| A-, C-, G- oder T-Mix | 2 µl |
| Primer (hin oder rück) (1-2 pmol/µl) | 1 µl |
| Aufgereinigte DNA (aus PCR) | 4 µl |

Die Reaktionsmischungen wurden auf Eis pipettiert und aufbewahrt, während die PCR-Maschine auf 95°C vorheizte. Die Ansätze wurden für 5 min bei 95°C denaturiert, anschließend durchliefen sie 25 mal folgenden Zyklus:

| ***Schritt*** | ***Temperatur*** | ***Dauer*** |
|---|---|---|
| Denaturierung | 95°C | 30 sek |
| Annealing/Synthese | 60°C | 30 sek |

Nach dem Ende der Sequenzierungsreaktion wurden die Ansätze sofort mit 3 µl des Lademixes gemischt und bis kurz vor Auftragen auf das Gel bei –20°C aufbewahrt.

Die Auftrennung der Sequenzfragmente erfolgte pro Ansatz vierspurig (getrennt nach dem Terminationsdidesoxynukleotid) auf einem Polyacrylamidgel mit einer Endkonzentration von 7 % Acrylamid/Bisacrylamid. Das Gel wurde nach den Angaben der Firma Pharmacia hergestellt. Dabei wurde die Polyacrylamidlösung zwischen die beiden, durch 0,5 mm breite Spacer getrennten, und vorher mit Ethanol geputzten sowie mit Bindesilan behandelten Glasplatten gegossen. Die Geltaschen wurden dabei durch einen Kamm freigehalten. Nach Auspolymerisieren unter einer UV-Lampe wurde das Gel an das ALFexpress-Gerät und dessen Kühlkreislauf

angeschlossen. Als Puffer wurde 0,5xTBE verwendet. Sobald das Gel auf 55°C vorgeheizt war, konnten die Proben aufgetragen werden. Kurz vor dem Auftragen auf das Gel wurden die Proben für 5 min bei 95°C denaturiert und anschließend auf Eis aufbewahrt. Pro Ansatz wurden 5 µl aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei 1500 V, 60 mA, 25 W und 55 °C für 750 min durchgeführt. Zur Auswertung wurde ALFWin-Software verwendet.

## 2.2.7 Toxizitätstests

### 2.2.7.1 Zellwachstum

Als Parameter für die Toxizität von γ-Strahlung wurde die Zellzahl zu verschiedenen Zeiten nach der Bestrahlung im Vergleich zur Kontrolle bestimmt:
Es wurden $1{,}25 \times 10^6$ Zellen in 5 ml Medium mit 2 Gy bzw. 10 Gy bestrahlt und anschließend für 40 h bei 37°C inkubiert. Die Zellzahl wurde vor der Bestrahlung, 24 h danach und nach 40 h mit Hilfe eines Partikelzählgeräts (AL Cellcounter, Modell 871) bestimmt.

### 2.2.7.2 Vitalfärbung mit Fluorescein-Diacetat (FDA) / Ethidiumbromid

Um die akute Toxizität und den Einfluss von Strahlung in den ersten Stunden nach der Behandlung zu untersuchen, wurde eine Vitalfärbung mit FDA / Ethidiumbromid durchgeführt. Bei dieser Art der Zellzählung kann zwischen lebenden und toten Zellen unterschieden werden. Die Vitalität wurde jeweils vor, unmittelbar nach und 2 h nach Bestrahlung mit 2 Gy und 10 Gy bestimmt. Hierfür wurden je 30 µl Zellsuspension mit 30 µl FDA/Ethidiumbromid-Lösung gemischt. 50 µl dieser Mischung wurden auf einen Objektträger aufgetragen und ein Deckglas aufgelegt. Anschließend wurden unter dem Fluoreszenz-Mikroskop 200 Zellen pro Ansatz ausgewertet, wobei die lebenden Zellen grün fluoreszieren und tote Zellen an rot gefärbten Zellkernen zu erkennen sind.

### 2.2.7.3 Zellzyklusanalyse

Um den Einfluss von Strahlung auf den weiteren Zellzyklusverlauf zu untersuchen, sowie einen Einfluss des Zellzyklus auf die Bildung von Mikronuklei zu testen,

wurden die Zelllinien einer Zellzyklusanalyse unterzogen. Dafür wurden die Zellen mit 2 Gy bestahlt. 100 µl der Zellsuspension wurden mit 2 ml DAPI (4,6-Diamidino-2-phenylindol) gemischt, bei Raumtemperatur eine Minute inkubiert und anschließend mit Hilfe eines Zellzyklus-Analysegerätes (partec cell counter analyser) gemessen. Die Messungen erfolgten jeweils vor der Bestrahlung, nach 16 h und 40 h nach Bestrahlung.

### 2.2.8 Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE)

Die Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE) wurde hier zur Quantifizierung von Doppelstrangbrüchen nach Gamma-Strahlung verwendet. Dazu werden die zu untersuchenden Zellen mit low-melting-point (LMP) Agarose gemischt und es werden Blöckchen hergestellt, die nun bestrahlt werden können. Nach der Behandlung und Reparatur der Zellen erfolgt die DNA-Isolierung, ebenfalls in diesen Agaroseblöckchen. Dies hat den Vorteil, dass in allen Proben Aliquots derselben Zellsuspension enthalten sind. Die Blöckchen werden nun in ein Gel eingegossen, und die DNA wird der PFGE unterworfen. Die Bedingungen der PFGE wurden so gewählt, dass Fragmente, die kleiner als 6 Mbp sind aus dem Blöckchen herauswandern und sich in einer sogenannten Pseudobande etwa 1 cm von den Blöckchen entfernt sammeln. Nach Anfärben des Gels mit Ethidiumbromid wird die Fluoreszenzintensität der Pseudobande bestimmt und man hat somit ein Maß für den Anteil an eluierter DNA. Der Anteil an eluierter DNA hängt jedoch nicht nur von der DSB-Häufigkeit und somit der durchschnittlichen Fragmentlänge ab, sondern auch von den Elektrophoresebedingungen und von der Zellzyklusverteilung der analysierten Zellen (replizierende DNA eluiert nicht).

#### 2.2.8.1 Herstellung von Agaroseblöckchen

Die lymphoblastoiden Zellen werden zunächst gezählt und einmal in 1xPBS gewaschen. Sie wurden so in 1xPBS resuspendiert (500 000 Zellen / ml) und dann 1:1 mit 1,6%iger LMP-Agarose (InCert Agarose in 1xPBS gelöst, 50 °C), gemischt. Mit einer Pipette wurde die Zellsuspension in die mit 70%igem Ethanol (abs) gespülten Blöckchenformen portioniert. Diese Schritte sollten recht schnell ablaufen, da ansonsten die Agarose vorzeitig erstarrt. Die Blöckchen werden zum Erhärten 15 min bei 4°C inkubiert, dann werden die Agaroseblöckchen mit einem Platikspatel in

ein Falcontube mit einigen ml Medium überführt und dort 30 min auf Eis equilibriert. Je nachdem ob die Schadensinduktion oder die Reparatur der Zellen untersucht werden sollte, wurde wie unter a) bzw. b) beschrieben mit den Zellen verfahren.

**a) Induktion (Dosis-Effekt-Beziehung nach Gamma-Strahlung)**

Je ein Blöckchen wurde in ein Blutkulturröhrchen in 3 ml Medium gegeben. Die Proben wurden dann mit 5, 10, 20, 30, 40 und 50 Gy bestrahlt und sofort auf Eis gestellt, um eventuelle Reparaturprozesse zu verhindern. Das Medium wurde dekantiert und durch 5 ml 0,5 M EDTA (pH8) ersetzt, worin die Blöckchen 10 min inkubiert wurden.

**b) Reparatur und Reparaturkontrollen**

Es wurden 7 Blöckchen je Zelllinie in ein Falconröhrchen in 20 ml Medium gegeben und mit einer Dosis von 40 Gy bestrahlt und sofort auf Eis gestellt. Das Medium wurde dekantiert, die Blöckchen wurden in Petrischalen mit vorgewärmtem Medium gegeben und in einem Brutschrank bei 37°C inkubiert. Zu den Zeitpunkten 0, 0,5, 1, 2, 3, 4 und 6 h, an welchen die Reparatur der Zellen untersucht wurde, nahm man je eines der Blöckchen aus dem Medium heraus und setzte es in ein Röhrchen mit 5 ml 0,5 M EDTA, worin es 10 min inkubierte.

Mit den Reparaturkontrollen wurde ebenso verfahren wie mit den Blöckchen zur Untersuchung der Reparatur, mit dem einzigen Unterschied, dass diese Zellen zuvor nicht bestrahlt wurden. Hierbei wird Auskunft gewonnen über die Vitalität der Zellen in den Blöckchen.

Nach der 10-minütigen Inkubation wurde bei allen Ansätzen das EDTA durch 1 ml ESP-Puffer ersetzt und die Blöckchen wurden 48 h bei 50 °C inkubiert. Der ESP-Puffer wurde dann abgegossen und die Röhrchen wurden mit Rinsing-Puffer gefüllt, der während der folgenden zwei Tage 3 - 4 Mal gewechselt wurde.

### 2.2.8.2 Elektrophorese

Es wurde ein 0,8%iges Gel (Seakam GTG-Agarose in 175 ml 0,5xTBE) mit drei eingesetzten Kämmen gegossen, ein Drittel der Agarose wurde zurückgehalten und bei 50°C aufbewahrt. Nach Erstarren der Agarose wurden die Kämme gezogen und die Taschen wurden mit Scheiben der Blöckchen befüllt. Die Scheibchen wurden

sorgfältig abgemessen (6 x 3 x 1 mm), damit jede Tasche mit der gleichen Menge an Zellen befüllt wurde, und sorgfältig an den vorderen Rand der Tasche angelegt. Nachdem alle Proben in das Gel eingesetzt worden sind, wurde die restliche Agarose über das Gel gegossen, um die Scheibchen zu fixieren. Nach Erkalten der Agarose kann die Elektrophorese gestartet werden. Der Gellauf erfolgte in einer Biometra Rothaphor (Typ V) bei einer Puffertemperatur von 22°C für 28 h mit Pulszeiten von 75 min. Als Steuereinheit wurde Programm Biometra Rothaphor Version 5.1 genutzt, und mit dem Standard Power Pack p25 von Biometra wurde die Spannung angelegt (1,3 V/cm). Es werden 2 Liter 0,5xTBE als Laufpuffer verwendet. Unter diesen Bedingungen wandern chromosomale Fragmente von einer Länge < 6 Mbp in das Gel ein und bilden eine Pseudobande. Größere Fragmente verbleiben in dem Blöckchen.

#### 2.2.8.3 Färbung und Auswertung

Das Gel wurde in einer Ethidiumbromidlösung (15 µl Ethidiumbromid, 10 mg/ml in 100 ml Laufpuffer) für eine Stunde angefärbt. Die Aufnahme erfolgte mit einer CCD-Kamera unter UV-Anregung von 312 nm. Mit Hilfe der Kodak digital Sciene 1D Image Analysis Software kann die Fluoreszenzintensität der Pseudobande bestimmt werden. Dieser Anteil an eluierter DNA spiegelt den Grad der DNA-Schädigung wieder.

Im Ergebnisteil sind zur Darstellung der Schadensinduktion nach verschiedenen Bestrahlungsdosen die DNA-Schäden durch die Fluoreszenzintensität der Pseudobande dargestellt. Die Reparatur der Zelllinien ist durch die induzierten DNA-Schäden dargestellt, d.h. die Intensität der Kontrollbande wurde jeweils von der Intensität der Reparaturbande subtrahiert. Dies dient einer exakteren Beobachtung der Reparaturkapazität, da die DNA-Schäden in der Kontrolle anzeigen, wie viele Zellen auch ohne Bestrahlung während der 6 h in der Agarose sterben.

### 2.2.9 Expressionsbestimmung mit dem Lightcycler

Mit dem Lightcycler kann ein quantitative Real-Time PCR durchgeführt werden. Es wird hierbei nach jedem Zyklus der Amplifikation die Fluoreszenz in jedem PCR-Ansatz detektiert. In dieser Arbeit wurde die relative *BRCA1*-Expression von sechs

LCL im Vergleich zu dem Haushaltsgen Porphobilinogendesaminase (*PBDG*) bestimmt. Die Bestimmung des RNA-Gehalts wurde vor Bestrahlung der Zellen mit γ-Strahlung, wie auch zu verschiedenen Zeitpunkten nach Bestrahlung vorgenommen. Es können somit Aussagen gemacht werden über mögliche Expressionsänderungen der Zellen nach Bestrahlung, wie auch über mögliche Expressionsunterschiede in Zelllinien mit *BRCA1*-Mutation im Vergleich zu Kontrollen.

#### 2.2.9.1 RNA-Isolierung

Für die Isolierung der RNA wurde zunächst die Zellzahl der LCL bestimmt. Für jeden Zeitpunkt der Isolierung wurden 5 Mio Zellen benötigt. In diesem Experiment wurde von jeder der sechs LCL vor Bestrahlung (2 Gy) RNA isoliert, wie auch 2 h, 8 h und 24 h nach Bestrahlung. Als Kontrolle wurden unbestrahlte Zellen ebenfalls zum Zeitpunkt 0 angesetzt, um einen Vergleichswert nach 24 h zu erhalten. Die Zellen wurden nun zweimal in PBS gewaschen, dann wurde der Überstand restlos abgenommen. Die Isolierung erfolgte mit dem „RNeasy Mini Kit“ von Qiagen laut Angaben des Herstellers. Die eluierte RNA wurde in 60 µl RNase-freiem Wasser aufgenommen und sofort bei -70°C gelagert. Die RNA-Konzentration der Proben (1:200 in DEPC verdünnt) wurde photometrisch bei einer Extinktion von 260 nm bestimmt. Um die Unversehrtheit der RNA zu überprüfen wurde 1µl jeder isolierten RNA auf ein 0,8%iges Agarosegel aufgetragen. Waren unter UV-Licht die zwei charakteristischen Banden zu erkennen, so konnte die RNA zur weiteren Verarbeitung verwendet werden.

#### 2.2.9.2 Reverse Transkription

Das Umschreiben der RNA in cDNA wurde mit Hilfe des „Omniscript-RT-Kits“ von Qiagen laut Angaben des Herstellers durchgeführt. Es wurden je Ansatz 1 µg RNA eingesetzt, das Umschreiben erfolgte mit „Random Hexamers“.

#### 2.2.9.3 Quantitative Real-Time PCR

Die Real-Time PCR wurde in Glaskapillaren durchgeführt. In diesen Kapillaren ist aufgrund des geringen Durchmessers von 1 mm eine schnelle Temperaturänderung des gesamten PCR-Ansatzes möglich. Die Glaskapillaren werden in ein

Probenkarussell im Innern des Lightcycler gesteckt. Es können somit 32 Proben in einem Lauf untersucht werden. Eine lichtemmitierende Diode dient als Lichtquelle zur Anregung der Fluoreszenz, die in jeder Kapillare nach jedem Amplifikationszyklus gemessen wird.

Der Ablauf einer PCR-Reaktion kann in drei verschiedene Phasen unterteilt werden. Zunächst gibt es eine frühe Hintergrund-Phase, während dieser das Signal im Hintergrundrauschen des Systems untergeht. Es schließt sich eine Phase der exponentiellen Zunahme (Log-Phase) an, während dieser das PCR-Produkt exponentiell amplifiziert wird. Danach wird ein Plateau erreicht, meist bedingt durch limitierte Mengen an Enzym.

Die Log-Phase kann durch folgende Gleichung ausgedrückt werde:

$$T_n = T_0(E)^n \qquad (I)$$

$T_n$ stellt die Menge der Zielsequenz im Zyklus n dar, $T_0$ die ursprünglich eingesetzte Menge. Da man weiß, dass etwa $10^{10}$ Kopien eines PCR-Produkts benötigt werden, um das Hintergrundsignal zu überschreiten, kann mit dieser Gleichung vorausgesagt werden, dass 14 Zyklen bis zu einem messbaren Signal benötigt werden, wenn man von 1 000 000 Kopien bei Beginn der PCR ausgeht und eine Effizienz von 1,9 voraussetzt. Werden in die PCR nur 1000 Kopien eingesetzt, so sind 25 Zyklen notwendig, bis ein Signal gemessen werden kann, bei nur einer Kopie werden 36 Zyklen benötigt.

Die Detektion der Menge an Zielsequenz erfolgt mit dem Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green I. SYBR Green I lagert sich in die kleine Furche doppelsträngiger DNA und wird durch diese Bindung angeregt. Am Ende der Synthese-Phase wird dann die Fluoreszenintensität gemessen und kann Auskunft über die Menge an Zielsequenz geben. Es besteht die Möglichkeit, dass ein Signal detektiert wird, obwohl keine spezifische Zielsequenz vorhanden ist. Dies kann z.B. der Fall sein bei Bildung von Primerdimeren durch die Wahl suboptimaler Primer, da SYBR Green unspezifisch an jegliche doppelsträngige DNA bindet. Um Die Spezifität einer durchgeführten PCR zu überprüfen gibt es daher, neben der altbekannten Möglichkeit der

gelelektrophoretischen Auftrennung des Ansatzes, die Möglichkeit der Schmelzkurvenanalyse.

#### 2.2.9.4 Schmelzkurvenanalyse

Die Schmelzkurvenanalyse kann der PCR angeschlossen werden. Dabei wird die Temperatur in der Thermokammer des Lightcyclers langsam erhöht, und bei Denaturierung des Produkts wird das gebundene SYBR Green freigesetzt, wodurch ein Abfall der Fluoreszenz messbar wird. Da jedes Produkt, durch Länge und GC-Gehalt definiert, eine spezifische Schmelztemperatur besitzt, kann somit das Produkt identifiziert werden. Eine Schmelzkurvenanalyse wurde jeder PCR angeschlossen, bei Etablierung der PCR für die Primerpaare des *BRCA1*- und *PBDG*-Gens wurden zusätzlich die Proben auf ein Gel aufgetragen.

#### 2.2.9.5 Erstellen einer Standardkurve

Nach der Phase des exponentiellen Anstiegs wird ein Plateau erreicht. Dies ist notwenig für die Berechnung der Konzentrationen nach der Methode des „Second Derivativ Maximum“. Dabei wird der Punkt der Kurve bestimmt, an welchem die Kopienzahl der Probe die Menge von $10^{10}$ Kopien überschreitet und die Nachweisgrenze erreicht. Dieser Punkt wird als „Crossing Point“ (CP) bezeichnet. Der CP spiegelt dabei die Zahl der PCR-Zyklen bis zum Einsetzen einer exponentiellen Amplifikation wider. Entspricht die Anzahl der Kopien des PCR-Produkts, die am CP vorhanden sind K, und CP der Zyklusanzahl, so ergibt sich folgende Gleichung aus Gleichung (I):

$$K = T_0 (E)^{CP} \qquad \text{(II)}$$

Gleichung (II) kann wie folgt umgeformt werden:

$$\log K = \log T_0 + CP * \log E \qquad \text{(III)}$$

Rearrangiert man diese Gleichung in die Form von $y = mx + b$, wobei CP gemessen werden soll, so erhält man Gleichung (IV):

$$CP = -(1/ \log E) * \log T0 + (\log K / \log E) \quad (IV)$$

Dies ist die Gleichung der Standardkurve, wobei die CP über der logarithmischen Konzentration der eingesetzten DNA aufgetragen werden. Die Steigung ist das negative Reziprok des Logarithmus der Effektivität. Der Schnittpunkt wird berechnet aus dem Logarithmus der Menge an PCR-Produkt am CP, dividiert durch den Logarithmus der Effektivität.

Die Effektivität einer Reaktion bis zum CP kann nicht mit einer direkten Methode bestimmt werden. Es müssen daher verschiedene Verdünnungen einer Probe eingesetzt werden, um sicherzustellen, dass die Amplifikation einer Probe konstant bleibt. Wird eine Probe nun mit einem Quantifizierungsstandard verglichen, so weisen sie nur dann dieselbe Effektivität auf, wenn die Steigung gleich ist oder nicht mehr als 0,1 voneinander abweicht. Die tatsächliche Konzentration und die Anzahl an Kopien sind dabei irrelevant. Als Quantifizierungsstandard wurde in dieser Arbeit das Haushaltsgen Porphobilinogendeasaminase *PBDG* verwendet.

Für das *BRCA1*-Gen und Für das *PBGD*-Gen wurden mit einem cDNA-Pool (cDNA aller LCL) in je einem separaten Lauf eine Standardkurve erstellt mit Verdünnungen von bis 1:100. Als Konzentration 1 wird die nach der reversen Transkription erhaltene cDNA bezeichnet, die 1:2 mit Aqua bidest verdünnt wurde, da in höherer Konzentration eine Hemmung der PCR-Reaktion zu erkennen war. In jedem Lightcyclerlauf wurden zwei Konzentrationen des DNA-Pools (Konzentration1 und Konzentration 1:10) mitamplifiziert und die zuvor erstellten Standardkurven wurden importiert. Somit konnten die Konzentrationen der Proben berechnet werden. Das Importieren der Standardkurven hat den Vorteil, dass mehr Proben in einem Lauf amplifiziert werden können.

#### 2.2.9.6 Lightcyclerlauf

**Ansatz der PCR Proben**

Zur Durchführung der Real-Time-PCR wurde der „Lightcycler-FastStart DNA Master SYBR Green I - Kit“ verwendet. Dieser Kit enthält eine FastStart Taq DNA Polymerase, die bei Raumtemperatur inaktiv ist, aufgrund blockierender Gruppen an

einigen Aminosäureresten des Enzyms. Zu Beginn der PCR werden die Proben daher 10 min bei 95°C inkubiert, um die blockierenden Gruppen zu inaktivieren. Des Weiteren ist im Kit der Farbstoff SYBR Green I enthalten, der spezifisch an DNA Doppelstränge bindet. Die Amplifikation des PCR-Produktes kann somit durch Messung der Fluoreszenz detektiert werden. Die einzelnen Komponenten wurden, wie in folgendem Schema dargestellt, pipettiert:

| **Komponenten** | **Menge** |
|---|---|
| Aqua bidest | 11,2 µl / 10,4 µl |
| $MgCl_2$ (2 mM, 3 mM)* | 0,8 / 1,6 µl |
| Primer Hin (0,5 µM ) | 2 µl |
| Primer Rück (0,5 µM ) | 2 µl |
| Lightcycler FastStart DNA Master SYBR Green | 2 µl |
| cDNA (Verdünnungen 1-1:100) | 2 µl |

zur Amplifikation des *BRCA1*-Fragements wurden 3 mM $MgCl_2$,
zur Amplifikation des *PBGD*-Fragments wurden 2 mM $MgCl_2$ verwendet

**PCR-Protokoll**

Der erste Schritt der PCR-Reaktion bestand in einer 10 minütigen Denaturierung bei 95°C zur Aktivierung der FastStart Taq DNA Polymerase.

Die Amplifikation erfolgte in 45 Zyklen von Denaturierung, Hybridisierung und Elongation, die Temperaturänderungen wurden mit maximaler Geschwindigkeit (20°C / sek) vorgenommen:

| **Schritt** | **Temperatur** | **Dauer** |
|---|---|---|
| Denaturierung | 95 °C | 15 sek |
| Hybridisierung | 68°C | 20 sek |
| Elongation | 72°C | 20 sek |

Zur Ermittlung des Schmelzpunktes wurde die Temperatur mit einer Geschwindigkeit von 0,1°C / sek von 65°C auf 95°C erhöht. Die Fluoreszenz wurde auf Kanal 1 (F1) detektiert. Nach dem Kühlen der PCR-Ansätze auf 40°C konnten die Konzentrationen an *BRCA1* im Verhältnis zu *PBGD* bestimmt werden.

### 2.2.10 Statistik

Die statistische Signifikanz von Ergebnissen wurde mit Hilfe des zweiseitigen t-Tests für zwei Stichproben mit ungleicher Varianz geprüft. Die Nullhypothese wurde bei einem Signifikanzniveau von kleiner 5% ($p < 0,05$) angenommen. In den Abbildungen werden Signifikanzen $p < 0,05$ mit einem Stern (*) gekennzeichnet; $p < 0,01$ wird mit zwei Sternen (**) gekennzeichnet

# 3 Ergebnisse

## 3.1 Mutagensensitivität von Lymphozyten BRCA-heterozygoter Frauen

### 3.1.1 Mutagensensitivität im Mikronukleustest

Mit Hilfe des Mikronukleustest (MNT) wurde untersucht, ob Lymphozyten von Frauen mit einer heterozygoten Mutation in einem der beiden Brustkrebssuszeptibilitätsgenen *BRCA1* oder *BRCA2* sensitiv gegenüber Strahlung reagieren. Die Bestimmung der Anzahl der Mikronuklei (MN) ohne vorige Mutagenbehandlung gibt zunächst Aufschluss über die Stabilität des Genoms ohne exogene Belastung. Wird das Blut im MNT mit verschiedenen genotoxischen Substanzen behandelt, so können Aussagen zur Mutagensensitivität im Zusammenhang mit einer möglichen Funktion von BRCA1 oder BRCA2 in der Prozessierung von DNA-Schäden getroffen werden. In diesem ersten Teil der Arbeit, der sich mit der Mutagensensitivität von BRCA-heterozygoten Frauen beschäftigt, wurde ausschließlich Vollblut behandelt und auf die MN-Induktion hin untersucht. Da die Bildung von MN eine Zellteilung voraussetzt, wurden die Zellen nach Mutagenbehandlung für mindestens einen Zellzyklus unter Zugabe von Phytohaemagglutinin inkubiert. Für eine spezifische Analyse sich teilender Blutzellen wurde die Cytochalasin B Version des MNT verwendet. Pro Ansatz wurden 1000 binukleäre Zellen ausgewertet.

#### 3.1.1.1 Induktion von Mikronuklei durch γ-Strahlung

Es wurden 24 Frauen mit Mutation im *BRCA1*-Gen und 9 Frauen mit Mutation im *BRCA2*-Gen untersucht. Das Kontrollkollektiv bestand aus 22 Frauen. Der Mikronukleustest wurde an unbehandeltem Vollblut wie auch nach Bestrahlung mit γ-Strahlung durchgeführt. Parallel zu den mutationstragenden Frauen wurden jeweils Kulturen der gesunden Kontrollen angesetzt. In Abb. 6 sind die Daten aller Probanden in einem Box-Plot dargestellt. Sowohl die basalen MN-Frequenzen als auch die MN-Häufigkeit nach 2 Gy γ-Strahlung sind gezeigt. Betrachtet man zunächst die basalen MN-Werte, so sind bei den mutationstragenden Frauen vier Ausreißer zu beobachten. Die Werte liegen möglicherweise aufgrund einer kurz zurückliegenden Therapie (bei Patientin 7.1, 19.1) extrem hoch. Jedoch ergibt sich ein signifikanter

Unterschied zwischen Frauen mit *BRCA1*- oder *BRCA2*-Mutation im Vergleich zu den hier untersuchten Kontrollen, ungeachtet, ob die extrem erhöhten Basalwerte berücksichtigt werden oder nicht (Tab. 3). Nach Behandlung der Lymphozyten mit 2 Gy γ-Strahlung ist bei allen Probandengruppen ein deutlicher Anstieg der MN-Frequenz zu erkennen. Bei den Kontrollpersonen ergibt sich ein Mittelwert von 283 MN / 1000 BNC, bei Frauen mit Mutation im *BRCA1*- oder *BRCA2*-Gen liegen die Mittelwerte mit 428 bzw. 465 MN / 1000 BNC deutlich höher. Die Differenz von *BRCA1*- wie auch von *BRCA2*-heterozygoten Frauen zu der Gruppe der Kontrollen ist hochsignifikant (Tab. 3). Die Signifikanz bleibt auch bei Ausschluss der Patientinnen mit extrem erhöhten Basalwerten erhalten.

Betrachtet man den Kernteilungsindex (NDI) aller Probanden, so ist in allen drei Gruppen nach Bestrahlung eine verringerte Proliferationsrate der Zellen zu beobachten. Die Lymphozyten der Frauen mit BRCA-Mutationen wachsen nach Bestrahlung etwas schlechter als die Zellen der Kontrollpersonen.

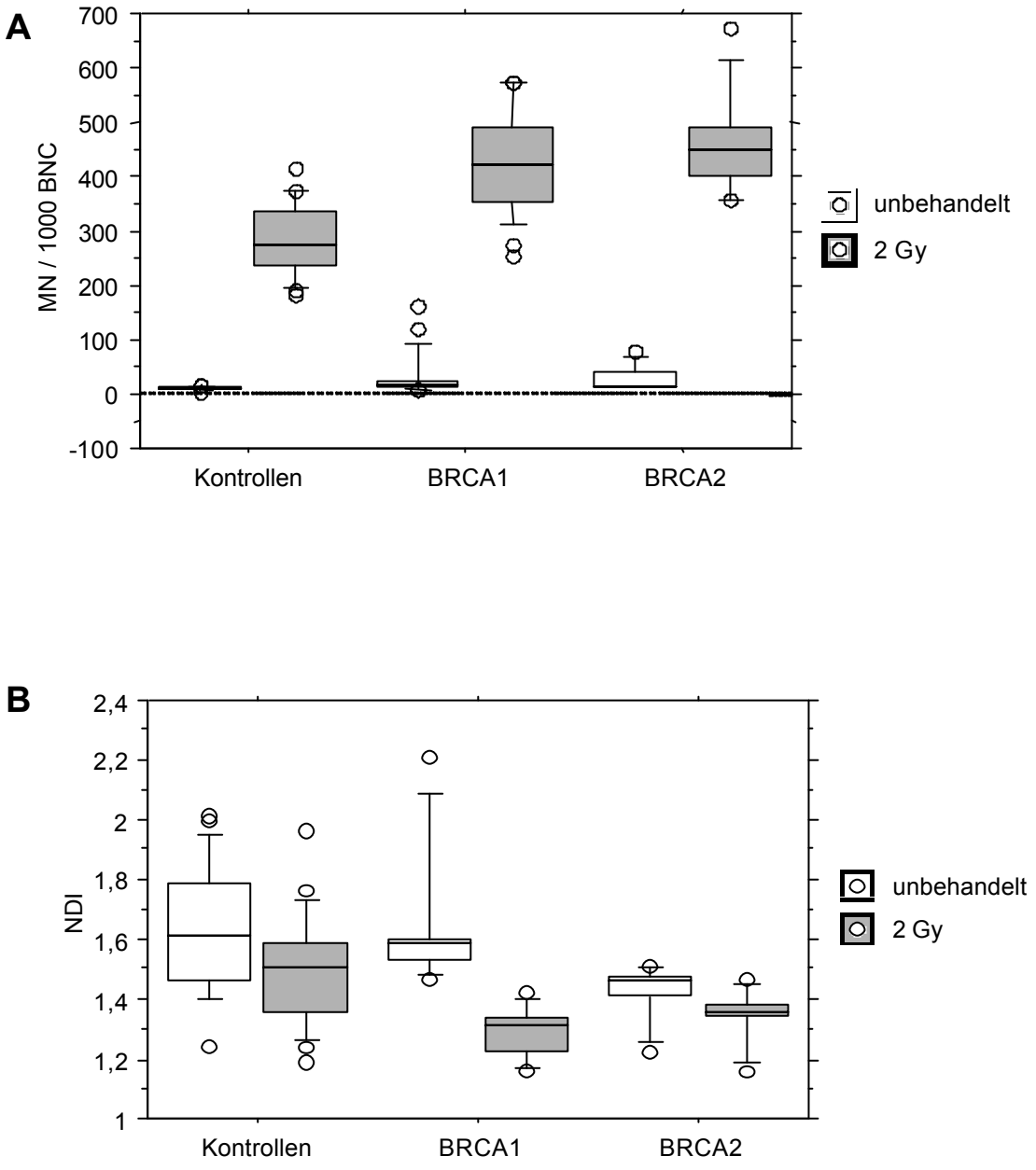



Abb. 6: (A) Basale MN-Frequenzen und MN-Induktion nach 2 Gy γ-Strahlung von *BRCA1*-(n=24) und *BRCA2*-(n=9) heterozygoten Frauen im Vergleich zu Kontrollen (n=22) und (B) Kernteilungsindex (nuclear division index, NDI). Die durchgezogene Linien zeigt den Median jeder Gruppe an, durch die Kanten des Boxplot wird die 25ste und die 75ste Percentile angezeigt, die horizontalen Linien zeigen 10te und 90ste Percentile an.

Tab. 3: Differenzen zwischen den Mittelwerten spontaner und induzierter MN-Frequenzen von Kontrollpersonen, *BRCA1*- und *BRCA2*-heterozygoten Frauen.

| Gruppen | Anzahl Probanden | Mittelwert ± SEM | Differenz Mittelwerte | p-Wert |
|---|---|---|---|---|
| **Basale MN-Frequenz** | | | | |
| *BRCA1* / Kontrollen [a] | 24 / 22 | 31,2±8,0 / 9,8±0,6 | 21,4 | 0,013 |
| *BRCA1* / Kontrollen [b] | 21 / 22 | 17,4±1,7 / 9,8±0,6 | 7,6 | < 0,0001 |
| *BRCA2* / Kontrollen [a] | 9 / 22 | 28,7±7,7 / 9,8±0,6 | 18,9 | 0,0007 |
| BRCA2 / Kontrollen [b] | 8 / 22 | 22,3±5,0 / 9,8±0,6 | 12,4 | 0,0004 |
| *BRCA1 / BRCA2* [a] | 24 / 9 | 31,2±8,0 / 28,7±7,7 | 2,5 | 0,86 |
| *BRCA1 / BRCA2* [b] | 21 / 8 | 17,4±1,7 / 22,3±5 | 4,9 | 0,25 |
| **Induzierte MN-Frequenz** | | | | |
| *BRCA1* / Kontrollen [c] | 24 / 22 | 428,3±19,5 / 283,4±14,3 | 144,9 | < 0,0001 |
| *BRCA1* / Kontrollen [d] | 21 / 22 | 417,5±20,9 / 283,4±14,3 | 134,2 | < 0,0001 |
| *BRCA2* / Kontrollen [c] | 9 / 22 | 465,8±32,0 / 283,4±14,3 | 182,4 | < 0,0001 |
| *BRCA2* / Kontrollen [d] | 8 / 22 | 457,9±35,2 / 283,4±14,3 | 174,5 | < 0,0001 |
| *BRCA1 / BRCA2* [c] | 24 / 9 | 428,3±19,5 / 465,8±32,0 | 37,5 | 0,32 |
| *BRCA1 / BRCA2* [d] | 21 / 8 | 417,5±20,9 /457,9±35,2 | 40,4 | 0,32 |

[a] alle Werte wurden berücksichtigt
[b] Ausreißer wurden ausgeschlossen
[c] alle Werte wurden berücksichtigt
[d] Ausreißer bei basalen Werten wurden bei induzierten Werten ausgeschlossen

Wenn die Effekte von γ-Strahlung auf die Induktion von MN in Form eines Histogramms dargestellt werden, wie in Arbeiten von Scott et al. (1999), Rothfuss et al. (2000) und Baeyens et al. (2002), so ergeben sich die in Abb. 7 präsentierten MN-Häufigkeiten. Die Probanden wurden entsprechend ihrer induzierten MN-Frequenzen (MN-Frequenz nach 2 Gy γ-Strahlung – MN-Frequenz ohne Mutagenbehandlung) entlang der x-Achse in verschiedene Gruppen mit unterschiedlich hoher MN-Häufigkeit eingeteilt. Auf der y-Achse ist die Zahl der Individuen ablesbar. Die induzierten MN der Kontrollpersonen liegen in einer Variationsbreite von 177 - 408 MN pro 1000 zweikerniger Zellen Abb. 7A Bei den Frauen mit Mutation sieht man eine deutlich verschobene Verteilung der MN-Frequenzen zu höheren Werten hin. Als Maß für Mutagensensitivität wurde hier der Mittelwert plus zweimal die Standardabweichung (MW + 2 SD) der Kontrollgruppe festgelegt. Alle Frauen, die MN-Frequenzen über diesem Wert aufweisen, werden als sensitiv eingestuft (Scott et al., 1998; Rothfuß et al., 2000). Nach Bestrahlung liegt der Mittelwert der Kontrollpersonen bei 283 MN / 1000 BNC und ist durch die gestrichelte Linie angezeigt, der MW + 2 SD ist durch die durchgezogene Linie gekennzeichnet (417

MN /1000 BNC). Nach diesem Kriterium können 42% der *BRCA1*-heterozygoten Frauen und 67% der *BRCA2*-heterozygoten Frauen als sensitiv eingestuft werden. Betrachtet man das Kollektiv der Kontrollpersonen, so fallen nach diesem Kriterium 5% der Frauen in die Gruppe sensitiver Personen. Auch ein Vergleich mikronukleushaltigen Zellen zeigt uns ein ähnliches Bild wie bei oben detailliert beschriebener Darstellung der Mikronuklei-Häufigkeit von 1000 binukleären Zellen.

In Arbeiten von Scott et al. (1999) und Baeyens et al. (2002) wurde die 90ste Percentile der Kontrollgruppe als Grenzwert für Strahlensensitivität gewählt. Die 90ste Percentile liegt bei unserem Kontrollkollektiv bei 374 MN / 1000 BNC. Nach diesem Kriterium sind 5% der Kontrollen, 54% der *BRCA1*- und 78% der *BRCA2*-Mutationsträger gegenüber $\gamma$-Strahlung sensitiv. Wird die 75ste Percentile der Kontrollgruppe (338 MN/1000 BNC) als Maß für Mutagensensitivität festgelegt, so fallen 75% der *BRCA1*-heterozygoten Frauen und 100 % der *BRCA2*-heterozygoten Frauen in die Gruppe sensitiver Frauen. Es werden jedoch auch 15% der Kontrollpersonen als sensitiv eingeschätzt.

Eine andere Möglichkeit bietet der direkte Vergleich der MN-Induktion der BRCA Mutationsträger mit der parallel untersuchten Kontrollperson. Von dem induzierten Werte der Mutationsträgerin wird der induzierte Wert der parallel mitgeführten Kontrolle subtrahiert. Aufgrund der erhaltenen Differenz kann eine Aussage über Mutagensensitivität gemacht werden. Diese Möglichkeit der Diskriminierung zwischen sensitiven und nicht-sensitiven Frauen, bei der möglicherweise technisch bedingte Variationen weniger stark ins Gewicht fallen, wurde bei Rothfuss et al. (2000) verwendet. In den Abbildungen 8 und 9 sind die Patientendaten in dieser Weise dargestellt. 78% der Frauen mit *BRCA1*-Mutation können als sensitiv bezeichnet werden (Abb. 8).

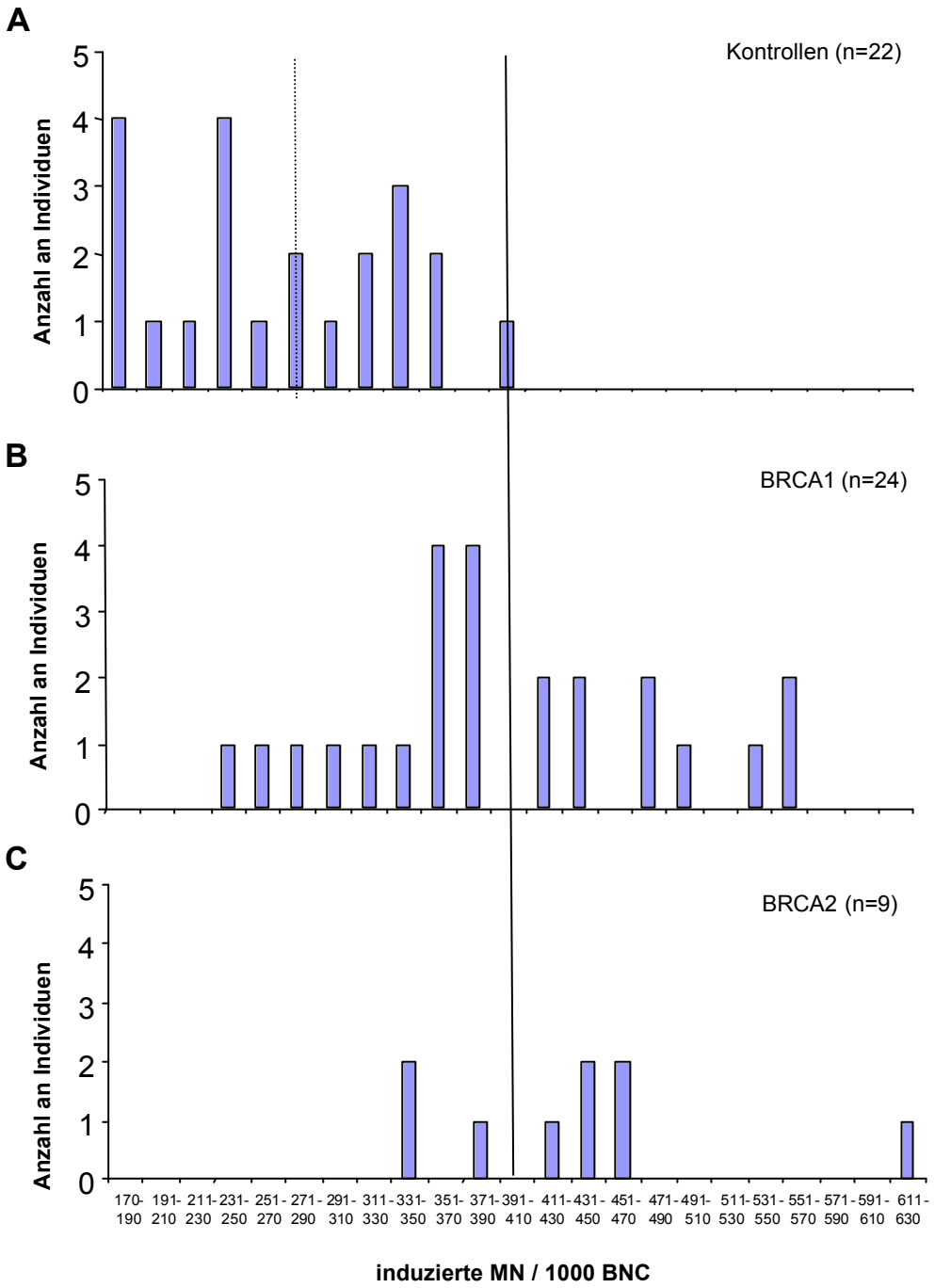



Abb. 7: Induzierte Mikronukleus-Frequenzen (MN / 1000 BNC) von (A) Kontrollpersonen, (B) Frauen mit *BRCA1*- oder (C) *BRCA2*-Mutation. Die gepunktete Linie zeigt den Mittelwert der Mikronukleus-Frequenz der Kontrollen an, die schwarze Linie zeigt den Mittelwert + 2SD.

Die Sensitivität dieser Frauen ist dabei nicht an bestimmte Mutationen gebunden. Die Mutationen befinden sich in verschiedenen Exons des *BRCA1*-Gens und bewirken zumeist eine Verkürzung des BRCA1-Proteins. Lediglich die Mutationen T300G und IVS+5 haben eine Veränderung des zinkbindenden Motivs wie die Veränderung einer Splicestelle zu Folge. Drei der fünf Frauen ohne deutlich erhöhte MN-Frequenzen (Differenz < 100 MN) gegenüber der zugehörigen Kontrolle stammen aus derselben Familie. Bei einer der Patientinnen wurde uns eine zweite Blutentnahme ermöglicht und in einem wiederholten Experiment wurde die Insensitivität bestätigt. Die Mutation dieser Familie (C4302T) tritt in dem verwendeten Patientenkollektiv nochmals in einer anderen Familie auf – dort sind jedoch bei allen Familienmitgliedern deutlich erhöhte MN-Frequenzen im Vergleich zu paralleler Kontrolle erkennbar. Die Mutation IVS+5 wurde ebenfalls bei zwei Frauen einer Familie festgestellt und auch hier konnte bei einer der Frauen mit 174 MN Differenz zu paralleler Kontrolle eine erhöhte Sensitivität festgestellt werden. Die andere Patientin zeigte eine Differenz von 94 MN und kann somit nach dem hier willkürlich definierten Kriterium „Differenz > 100 MN “ nicht mehr als sensitiv gewertet werden.

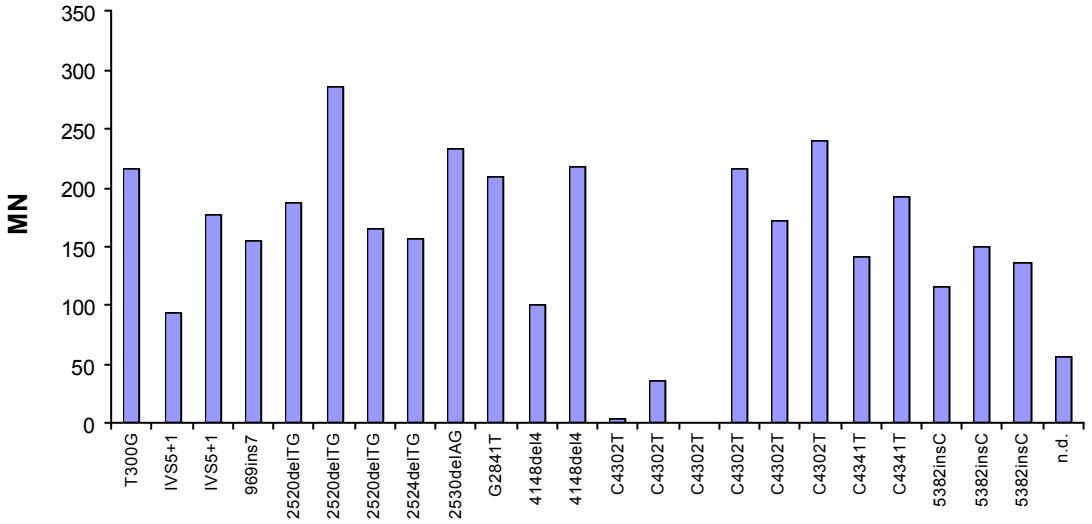



Abb. 8: Anstieg der MN-Frequenz im Vergleich zur parallel mitgeführter Kontrolle in 24 Frauen mit *BRCA1*-Mutation nach Bestrahlung mit 2 Gy. Es wurde die Anzahl an Mikronuklei in 1000 binukleären Zellen bestimmt und die Differenz der induzierten MN zwischen Patient und zugehöriger Kontrolle dargestellt. Auf der x-Achse sind die Mutationen der Patientinnen aufgelistet.

Bei Betrachtung der Frauen mit *BRCA2*-Mutation können 78% als sensitiv bezeichnet werden (Abb. 9). Zwei der insgesamt 9 untersuchten Frauen zeigten nur geringfügig erhöhte Mikronukleus-Frequenzen gegenüber der Kontrolle (48 und 77 MN Differenz). Beide Frauen tragen dieselbe Mutation (5465insT) und stammen aus derselben Familie. Ein Wiederholungsexperiment zur Verifizierung des Ergebnisses war leider nicht möglich. Die Mutation dieser Familie tritt in dem verwendeten Patientenkollektiv nicht nochmals auf, daher ist keine Aussage über den Zusammenhang Mutation und erhöhte Mutagensensitivität zu treffen. Bei der Mutation 5465insT wird ein verkürztes Protein von nur 1747 Aminosäuren, was etwa der Hälfte des *BRCA2*-Gens entspricht, gebildet. Andere Frauen mit deutlich längerem Protein zeigen hingegen eine Sensitivität.

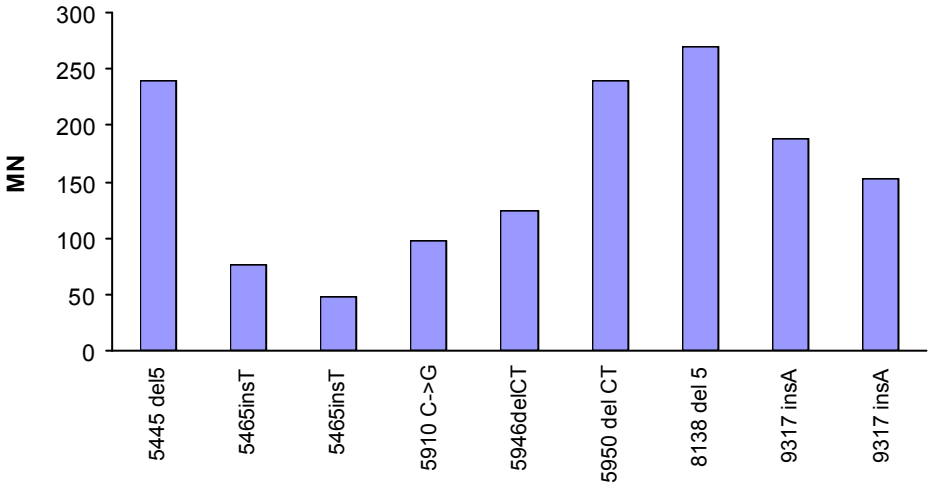



Abb. 9: Anstieg der Mikronukleus (MN)-Frequenz im Vergleich zu parallel mitgeführter Kontrolle in 9 Frauen mit *BRCA2*-Mutation nach Bestrahlung mit 2 Gy. Die MN in 1000 binukleären Zellen wurden bestimmt und die Differenz der induzierten MN zwischen Patient und zugehöriger Kontrolle sind hier dargestellt. Auf der x-Achse sind die Mutationen der Patientinnen aufgelistet.

Bei einigen Frauen - sowohl bei Kontrollpersonen wie auch bei Patientinnen - wurde der MNT mehrmals durchgeführt, wodurch Aussagen über die Variabilität der MN-Induktion in einzelnen Personen gemacht werden können. Die wiederholten Versuche sind in den Abb. 10 und 11 dargestellt, wiederholte Experimente sind durch benachbarte gleichfarbige Säulen gekennzeichnet. Aus dem Kollektiv der 22 Kontrollen wurden 11 Frauen wiederholt im MNT untersucht. Bei 8 Frauen ist ein gute Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu erkennen, bei 3 der Frauen variieren die Werte relativ stark (Differenzen ~100 MN /1000 BNC).

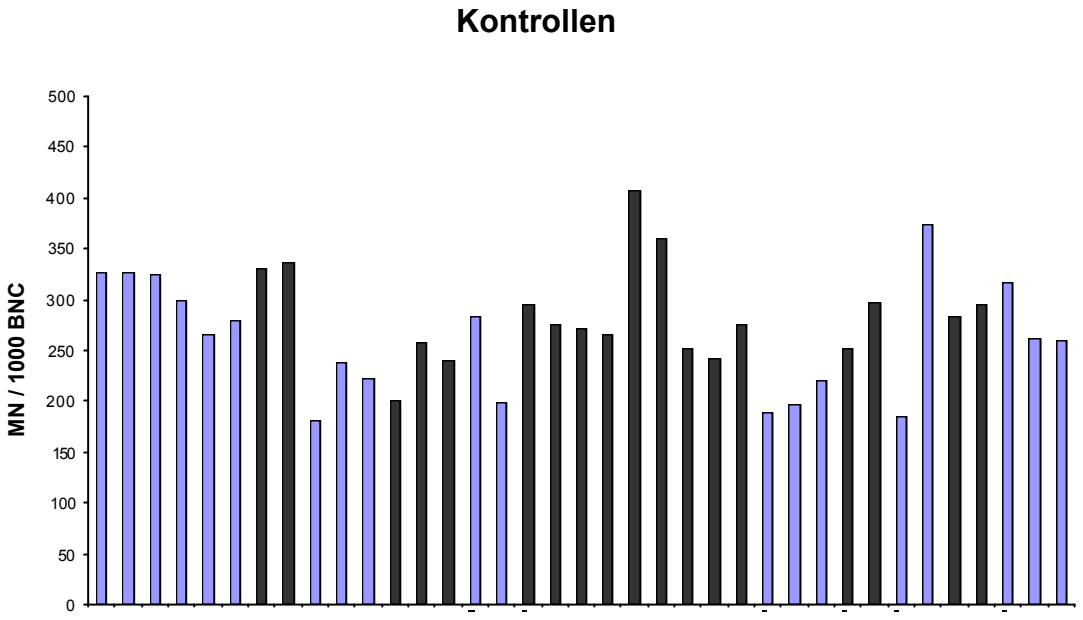



Abb. 10: Induzierte MN-Frequenzen der Kontrollpersonen nach Bestrahlung mit 2 Gy. Von 11 der 22 Probanden wurden Experimente wiederholt. Wiederholte Experimente sind durch benachbarte Säulen gleicher Farbe dargestellt.

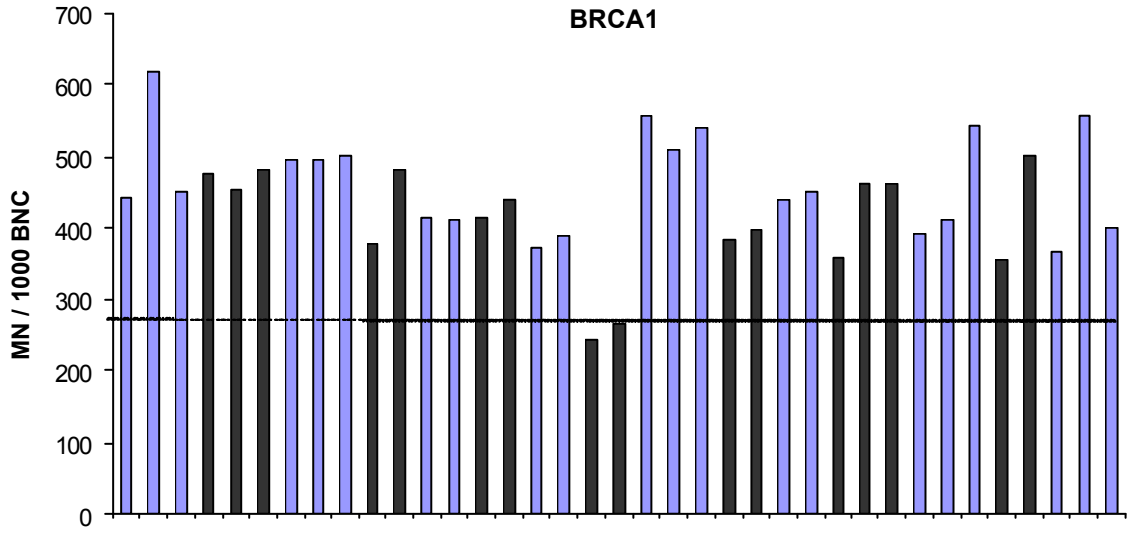



Abb. 11: Induzierte MN-Frequenzen der Frauen mit *BRCA1*-Mutation nach Bestrahlung mit 2 Gy. Von 15 der 24 Probanden wurden Experimente wiederholt. Wiederholte Experimente sind durch benachbarte Säulen gleicher Farbe dargestellt. Die gestrichelte Linie zeigt den Mittelwert der Kontrollgruppe an.

Betrachtet man die induzierten MN-Werte der Frauen mit *BRCA1*-Mutation im Einzelnen, so erkennt man eine große Variabilität, die Werte umspannen einen Bereich von 244 bis 619 Mikronuklei / 1000 BNC (Abb. 11). Wiederholte Experimente sind auch hier durch benachbarte gleichfarbige Säulen gekennzeichnet. Es ist bei 9 der 15 Frauen eine gute Reproduzierbarkeit zu sehen, während sich bei sechs Frauen eine starke intraindividuelle Variabilität zeigt. Eine Patientin wies eine MN-Häufigkeit unterhalb des Mittelwertes der Kontrollgruppe (gestrichelte Linie) auf, was in einem Wiederholungsexperiment verifiziert werden konnte.

#### 3.1.1.2 Einfluss von Koffein auf die Induktion von Mikronuklei durch γ-Strahlung

Koffein verkürzt oder eliminiert den strahlungsinduzierten $G_2$-Arrest in normalen Zellen. Es wurde nun untersucht, ob Lymphozyten mit Mutation im *BRCA1*-Gen anders auf eine Koffein-Behandlung nach Bestrahlung reagieren, als intakte Lymphozyten. Koffein wurde den Zellen direkt nach Bestrahlung für die gesamte Dauer des MNT zugegeben. Nach Bestrahlung der Lymphozyten mit 2 Gy ist bei allen Probanden ein starker Anstieg der MN-Frequenz zu verzeichnen. Bei zusätzlicher Inkubation mit 1 mM Koffein, wird bei drei von vier Kontrollpersonen eine Erhöhung der MN-Induktion deutlich (Anstieg um 68 bis 135 MN). Die Frauen mit *BRCA1*-Mutation zeigen eine Reduktion der MN-Frequenz (Reduktion um 17 - 69 MN) im Vergleich zur MN-Induktion nach Bestrahlung. Wird den Lymphozyten Koffein zugegeben ohne vorherige Bestrahlung, so ist im MNT keine erhöhte Induktion von MN zu erkennen, weder bei Patientinnen noch bei Kontrollen (Abb. 12).

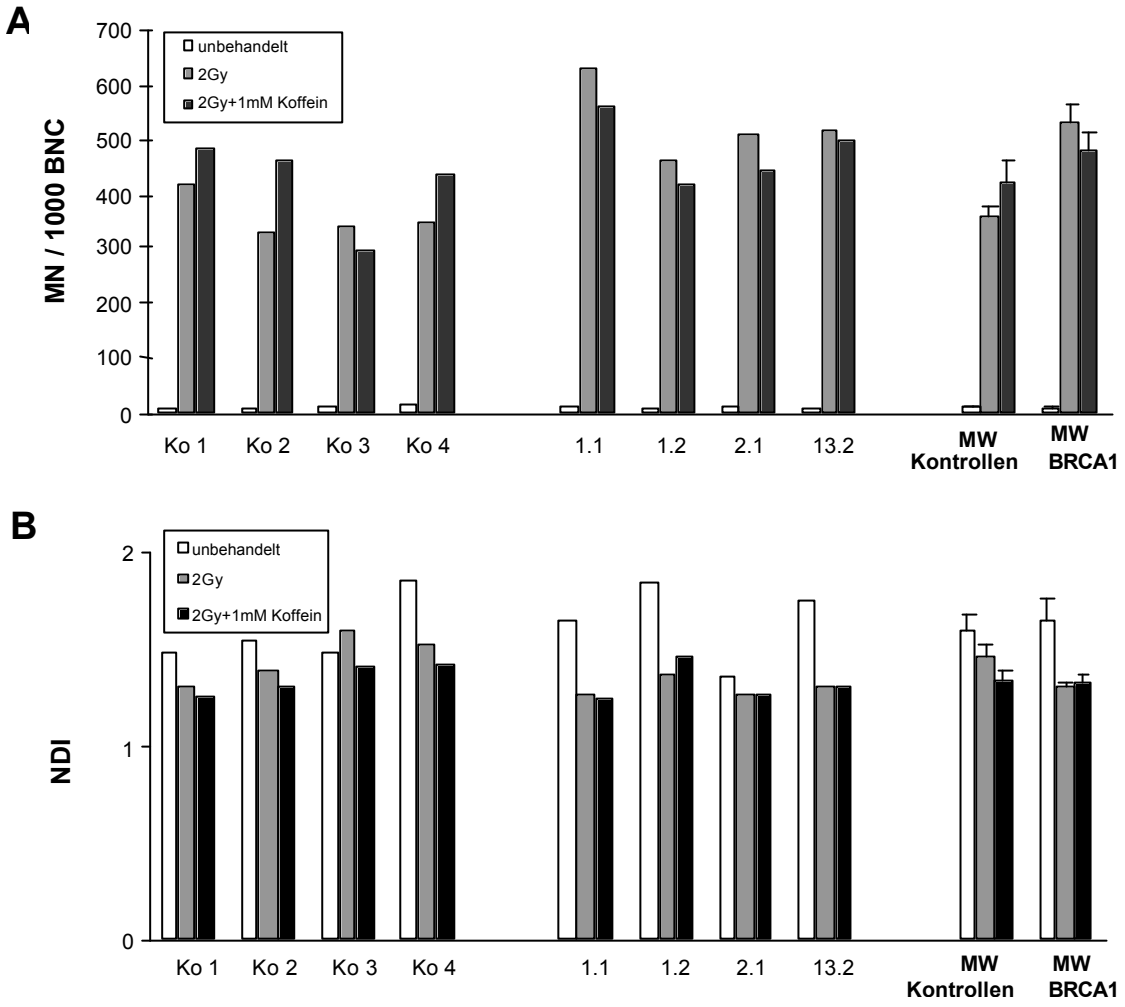



Abb. 12: (A) Effekt von Koffein (1mM) auf bestrahlte Lymphozyten von vier Frauen mit *BRCA1*-Mutation und vier Kontrollpersonen. Absolute Mikronukleus(MN)–Frequenzen und (B) Kernteilungsindex (NDI) von Einzelpersonen und Mittelwerte der beiden Kollektive +/-SEM.

### 3.1.1.3 Induktion von Mikronuklei durch $H_2O_2$

Bei Betrachtung der MN-Induktion nach Bestrahlung konnte im direkten Vergleich in fast allen Fällen diskriminiert werden zwischen Frauen mit Mutation im *BRCA1*-oder *BRCA2*-Gen und Kontrollen. Nun wurde untersucht, ob eine Behandlung mit Wasserstoffperoxid ($H_2O_2$) eine Unterscheidung zwischen Frauen mit *BRCA1*-Mutation im Vergleich zu Frauen mit *BRCA2*-Mutation erbringen kann. Diese Substanz wurde gewählt, da dem *BRCA2*-Gen eine Rolle in der Reparatur von Doppelstrangbrüchen zugeschrieben wird. Da $H_2O_2$ keine Doppelstrangbrüche erzeugt, kann somit untersucht werden wie spezifisch der Defekt im *BRCA2*-Gen für DSB ist. Es wurden Frauen mit *BRCA1*- und *BRCA2*-Mutation im MNT untersucht.

In Abb. 13 ist die MN-Induktion nach Behandlung mit 2 mM $H_2O_2$ dargestellt. Die dunklen Säulen zeigen die induzierten Mikronuklei der Frauen mit *BRCA1*-Mutation, die hellen Säulen zeigen die Werte der parallel mitgeführten Kontrollen. Die Säulen sind entsprechend der Versuchsdurchführung paarweise angeordnet. Man erkennt bei dem Kontrollkollektiv eine recht geringe MN-Induktion zwischen einem und 7 MN / 1000 BNC. Bei dem Patientenkollektiv finden sich Werte von 9 bis 19 MN. Es ist bei allen Patientinnen eine erhöhte MN-Frequenz im Vergleich zu parallel mitgeführter Kontrolle zu erkennen. Die schraffierten Säulen zeigen die Mittelwerte von Kontrollen und Frauen mit *BRCA1*-Mutation. Es ist ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen erkennbar (p=0,0025).

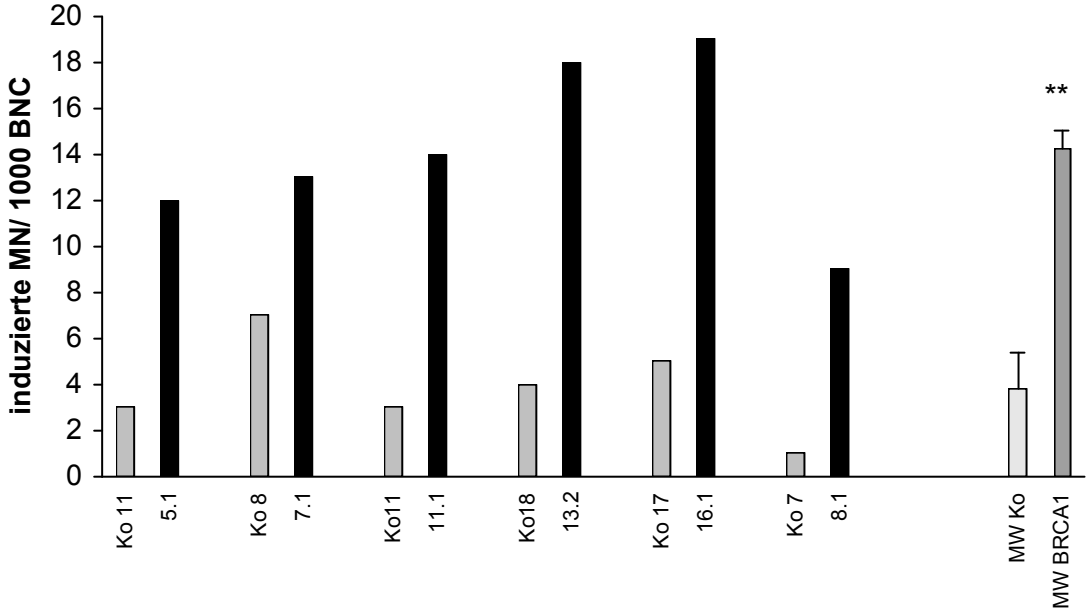



Abb. 13: Effekt von 2 mM $H_2O_2$ auf die Mikronukleus (MN)-Frequenz in Lymphozyten von sechs Frauen mit einer *BRCA1*-Mutation und sechs parallelen Kontrollen. Induzierte MN der Einzelpersonen und Mittelwerte der beiden Gruppen +/- SEM. ** $p < 0,01$

Untersucht man den Effekt von $H_2O_2$ auf die MN-Induktion in Frauen mit *BRCA2*-Mutation, so erkennt man auch hier eine erhöhte Induktion von MN verglichen mit parallelen Kontrollen (Abb. 14). Die Werte schwanken recht stark, bei den Kontrollen in einem Bereich von einem bis 12 MN, bei den BRCA2-Frauen von 12 bis 26 MN, jedoch zeigt der direkte Vergleich eine Erhöhung um mindestens 11 MN / 1000 BNC in allen vier Fällen. Dieser Effekt wird auch bei dem Vergleich der Mittelwerte von Kontrollpersonen und *BRCA2*-Mutationsträgern deutlich, wo ein signifikanter

Unterschied (p=0,0078) zu sehen ist. Es ist zu erkennen, dass sowohl Zellen mit *BRCA1*-Mutation wie auch Zellen mit *BRCA2*-Mutation eine erhöhte Sensitivität gegenüber $H_2O_2$ zeigen. Eine Unterscheidung zwischen BRCA1-Patientinnen und *BRCA2*-Patientinnen ist jedoch nach $H_2O_2$-Behandlung genauso wenig möglich, wie nach γ-Strahlung.

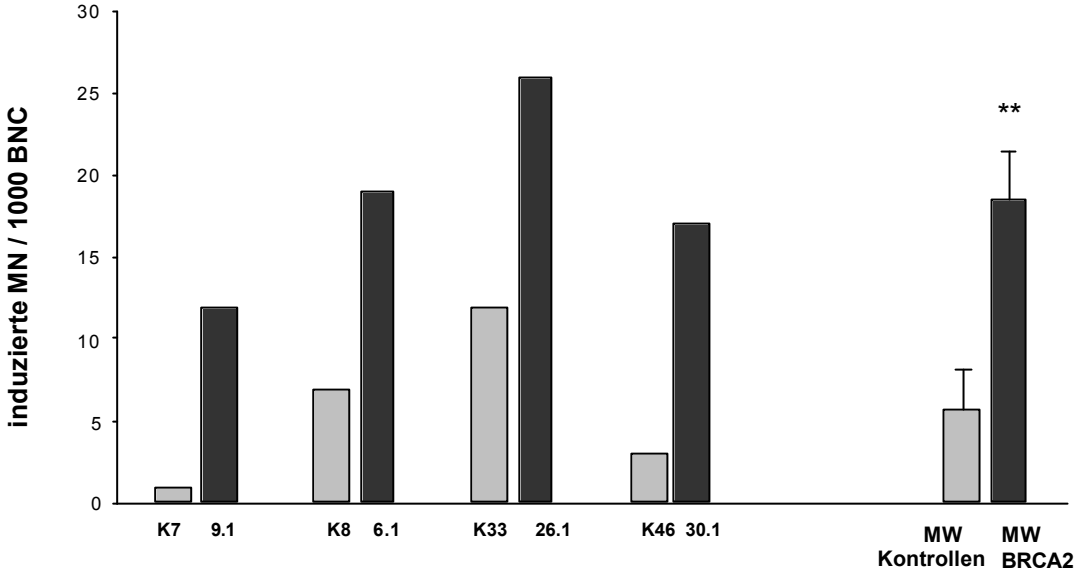



Abb. 14: Effekt von 2 mM $H_2O_2$ auf die Mikronukleus (MN)-Frequenz in Lymphozyten von vier Frauen mit einer *BRCA2*-Mutation und vier parallelen Kontrollen. Induzierte MN der Einzelpersonen und Mittelwerte der beiden Gruppen +/- SEM. ** p < 0,01

### 3.1.1.4 Induktion von Mikronuklei durch Cytostatika

Die bislang dargestellten Ergebnisse zeigen, dass Frauen mit einer Mutation im *BRCA1*- oder *BRCA2*-Gen nach γ-Strahlung oder Behandlung mit $H_2O_2$ eine höhere MN-Induktion aufweisen als Frauen ohne Mutation. Nun wurde untersucht, ob auch eine Behandlung von Lymphozyten mit verschiedenen Cytostatika mit unterschiedlichem Wirkmechanismus zu einer erhöhten MN-Frequenz führt. Die untersuchten Cytostatika induzieren verschiedene Arten von DNA-Schäden (DNA-DSB, Alkylierungen, DNA-Crosslinks), die in einer Zelle durch unterschiedliche Reparaturmechanismen erfasst und repariert werden. Das Radiomimetikum Bleomycin (BLM) wurde in einem Experiment mit 5 Patientinnen und 5 Kontrollen

untersucht. In Abb. 15A ist der Mittelwert der induzierten MN-Frequenzen gezeigt. BLM erzeugte einen konzentrationsabhängigen Anstieg der MN-Häufigkeit. Im Vergleich zu den Kontrollen sind die MN-Frequenzen der BRCA1-Frauen nach Behandlung mit 2 µg/ml leicht erhöht, nach Behandlung mit 5 µg/ml ist eine signifikant verstärkte Induktion (p=0,026) erkennbar. Werden die Werte der Patientinnen mit der jeweils parallel mitgeführten Kontrolle verglichen, zeigt jeder der 5 Patientinnen Mutagensensitivität gegenüber Bleomycin im MNT.

Die Substanz Cisplatin (CDDP), welche DNA-Crosslinks verursacht, führte ebenfalls zu einer deutlichen MN-Induktion in allen untersuchten Blutproben (5 Patientinnen, 5 Kontrollen), wie in Abb. 15B zu sehen ist. In Frauen mit einer heterozygoten *BRCA1*-Mutation zeigte sich ein stärkerer Effekt als in den Kontrollen. Der Unterschied war in der höheren Konzentration von 20 µM CDDP signifikant größer (p= 0,0002). Auch hier zeigte jede untersuchte Patientin im Vergleich zu der parallel mitgeführten Kontrolle eine erhöhte Sensitivität.

Mit dem bifunktionell alkylierenden Cytostatikum 1,3-bis(2-chlorethyl)nitrosurea (BCNU) wurden 7 Frauen mit heterozygoter *BRCA1*-Mutation im Vergleich zu 7 Kontrollen untersucht (Abb. 15C). Obwohl eine beachtliche Schwankungsbreite in der Induktion von MN festzustellen war, führte BCNU in allen Patientinnen zu einer verstärkten MN-Induktion. Die Unterschiede in der induzierten MN-Frequenz zu den Kontrollen war in der niedrigen Konzentration signifikant höher (p=0,0331), in der höheren Konzentration wurde beinahe statistische Signifikanz erreicht (p=0,061).

Blutkulturen von 5 Patientinnen und 5 Kontrollen wurden für 2 h mit Cyclophosphamid (CP) in der Anwesenheit von S9-Mix behandelt. Die Ergebnisse sind in Abb. 15D zusammengefasst. Es ist zu erkennen, dass die MN-Frequenzen in Patientinnen mit *BRCA1*-Mutation deutlich erhöht sind. Trotz einer gewissen Variabilität zwischen den verschiedenen Proben, wurde in beiden CP-Konzentrationen ein signifikanter Unterschied zu der Kontrollgruppe gefunden (100 µM CP: p=0,0209; 200 µM CP, p=0,0329).

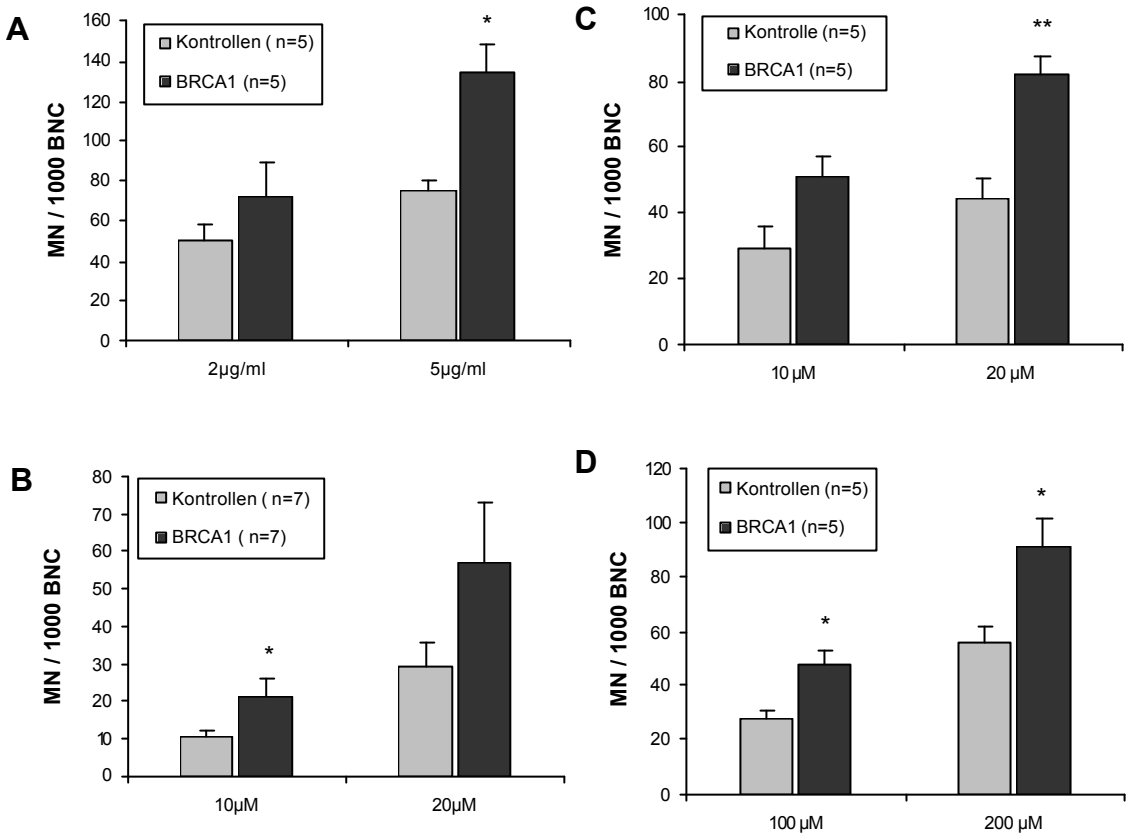



Abb. 15: Effekt der Cytostatika (A) Bleomycin, (B) Cisplatin, (C) BCNU und (D) Cyclophosphamid auf die Mikronukleus (MN)-Frequenzen in Lymphozyten von Frauen mit einer *BRCA1*-Mutation und parallelen Kontrollpersonen. Mittelwert +/- SEM. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Bei der Induktion von MN durch die beiden mitotischen Spindelgifte Vincristin (VCR) und Taxol (TAX), wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen Patientinnen und Kontrollen gefunden. Blutproben von vier Patientinnen wurden mit VCR behandelt (Abb. 16A). Bei drei der Patientinnen war im direkten Vergleich mit paralleler Kontrolle eine leicht erhöhte MN-Frequenz gefunden worden, jedoch war die Differenz zu gering um von Mutagensensitivität sprechen zu können. In beiden Konzentrationen zeigte sich keine statistische Signifikanz der Unterschiede. Mit TAX wurden 6 Patientinnen und 5 Kontrollen behandelt (Abb. 16B). Eine Patientin wurde aus der Zusammenfassung ausgeschlossen, da sie einen extrem erhöhten Kontrollwert zeigte und keine MN-Induktion nach Behandlung mit TAX auftrat. Unter den 5 untersuchten Frauen zeigte sich lediglich bei einer Patientin in beiden Konzentrationen eine leicht erhöhte MN-Frequenz im Vergleich zur parallelen

Kontrolle. In einer anderen Patientin zeigte sich eine Erhöhung in der niedrigeren Konzentration, in einer anderen in der höheren Konzentration. Man kann an den Mittelwerten erkennen, dass es keine signifikant erhöhte MN-Induktion in Patientinnen verglichen mit den Kontrollen gibt. Der Mittelwert für 20 nM Tax liegt bei den Frauen mit Mutation sogar etwas niedriger.

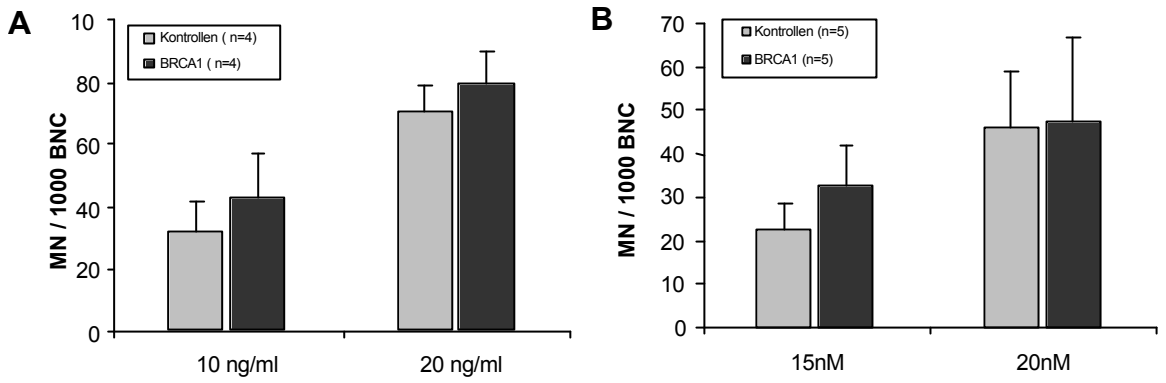



Abb. 16: Effekt von (A) Vincristine und (B) Taxol auf die Mikronukleus(MN)-Frequenzen in Lymphozyten von Frauen mit *BRCA1*-Mutation und von parallelen Kontrollen. Mittelwert +/- SEM.

Es ist also eine Sensitivität der Lymphozyten von Frauen mit *BRCA1*-Mutation im MNT gegenüber den DNA-schädigenden Substanzen BLM, CDDP, BCNU, CP zu erkennen, während nach Behandlung mit den Spindelgiften VCR oder TAX kein solcher Unterschied auftrat. In den Kernteilungsfrequenzen (NDI) wurde zwischen Patientinnen und Kontrollen nach Behandlung mit den verschiedenen Cytostatika kein signifikanter Unterschied gefunden. Unterschiede in der Mutagensensitivität aufgrund von cytotoxischen Wirkungen sind daher auszuschließen.

#### 3.1.1.5 Analyse von Mikronuklei mit Hilfe von Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung

Es ist bekannt, dass die Induktion von MN durch die Spindelgifte Vincristin und Taxol hauptsächlich auf einem aneugenen Effekt beruht. Um herauszufinden, ob die Ursache der MN-Induktion durch Vincristin und Taxol in Zellen mit *BRCA1*-Mutation dieselbe ist wie in Zellen ohne Mutation, wurden spontane und induzierte MN mit Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) untersucht. Es wurde hierzu eine Centromer-DNA-Sonde verwendet, die an den Centromeren aller Chromosomen

bindet. In Abb. 17 ist eine binukleäre Zelle mit Hybridisierungssignal im MN gezeigt. Man nimmt an, dass dieser MN ist durch Fehlverteilung eines ganzen Chromosoms entstanden ist, da ein Centromersignal darin zu erkennen ist. Ist in dem MN kein Signal zu erkennen, so deutet dies auf Entstehung des MN durch einen Chromosomenbruch hin. In Tab. 4 ist der Centromergehalt der MN von 5 Patientinnen und von 5 Kontrollen durch FISH-Analyse nach Behandlung mit 15 nM Taxol im Vergleich zu Bestrahlung mit 2 Gy Gamma-Strahlung zusammengefasst. In unbehandeltem Blut liegt der Anteil der Centromer-positiven MN in Patientinnen und Kontrollen bei etwa 40 - 50%. Gamma-Strahlung induzierte MN durch klastogene Effekte und reduzierte den Anteil Centromer-positiver MN auf etwa 10% in Lymphozyten mit *BRCA1*-Mutation wie auch in Kontrollen. Die MN-Induktion von Taxol basiert hauptsächlich auf einen aneugenen Effekt ohne grundsätzlichen Unterschied bei Patientinnen und Kontrollen. In beiden Fällen zeigten etwa 75% der analysierten MN ein Signal in der FISH-Analyse, was auf die Anwesenheit eines ganzen Chromosoms hindeutet. Diese Ergebnisse wurden bestätigt durch Behandlung von Lymphozyten einer Patientin und einer Kontrolle mit Vincristin. Auch hier lag der Anteil der Centromer-positiven MN bei etwa 80% in beiden Kulturen.

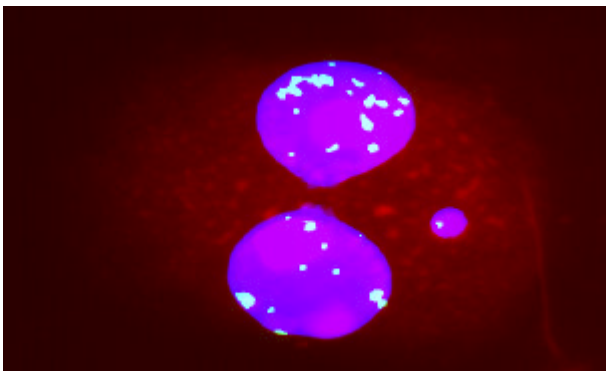


Abb. 17: Zelle einer Kontrollperson nach FISH auf ein MNT-Präparat mit einer pan-Centromerprobe. Es ist ein MN mit Hybridisierungssignal zu erkennen, was einen Centromer-positiven MN erkennen lässt.

Tab. 4: Anteil Centromer-positiver MN (cen + MN) der durch Gamma-Strahlung und Taxol induzierten MN nach Analyse mittels FISH

| Behandlung | Kollektiv | analysierte MN | % cen+ MN |
|---|---|---|---|
| unbehandelt | Kontrollen | 139 | 46,33 |
| unbehandelt | BRCA1 | 268 | 41,83 |
| bestrahlt (2 Gy) | Kontrollen | 600 | 12,67 |
| bestrahlt (2 Gy) | BRCA1 | 551 | 9,33 |
| Taxol (15 nM) | Kontrollen | 286 | 77,17 |
| Taxol (15 nM) | BRCA1 | 215 | 73,67 |

### 3.1.1.6 Induktion von Schwesterchromatidaustauschen (SCE) durch Cytostatika

Zwei der bereits im MNT untersuchten Cytostatika wurden auf Effekte im SCE-Test untersucht. In Abb. 18 sind zunächst die spontanen SCE-Frequenzen von Kontrollen und Patientinnen dargestellt. Es wurden fünf Patientinnen und vier Kontrollpersonen untersucht. Die Daten des Kontrollkollektivs basieren auf nur vier verschiedenen Blutproben, da zwei Patientinnen parallel zu einer Kontrollperson untersucht wurden. Die basalen SCE-Frequenzen (ohne Behandlung) variierten bei den Kontrollpersonen zwischen 5,4 und 8,8; bei den Patientinnen lagen sie zwischen 5,5 und 9,6. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Mittelwerten der beiden Gruppen (7,2 ± 0,7 bei den Kontrollen, 6,4 ± 0,8 bei den Patientinnen).

In Abb. 19 sind die Ergebnisse für Cisplatin (CDDP) und BCNU dargestellt. Eine Behandlung der Zellen mit CDDP führt zu einem konzentrationsabhängigen Anstieg der SCE-Frequenz in Patientinnen und Kontrollen (Abb. 19A). Es wurde in keiner der getesteten Konzentrationen ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen gefunden. Dies zeigte sich auch für die Behandlung mit BCNU (Abb. 19B). Es konnte somit mit dem SCE Test als genetischem Endpunkt keine Mutagensensitivität gegenüber CDDP oder BCNU in Lymphozyten mit einer heterozygoten *BRCA1*-Mutation festgestellt werden.

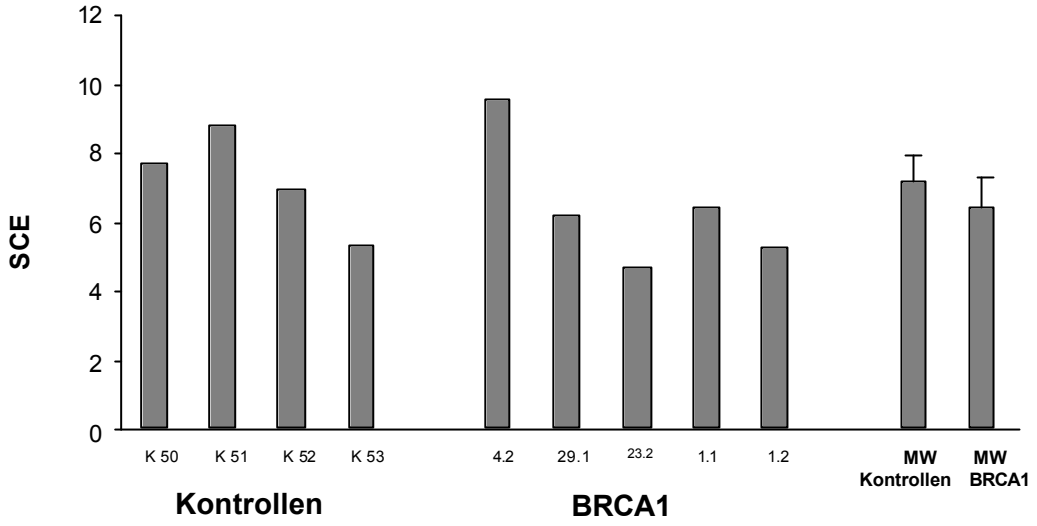



Abb. 18: Basale SCE-Frequenzen von Frauen mit *BRCA1*-Mutation und von Kontrollpersonen. Es sind Einzelwerte der Individuen und Mittelwerte der beiden Gruppen ± SEM dargestellt.

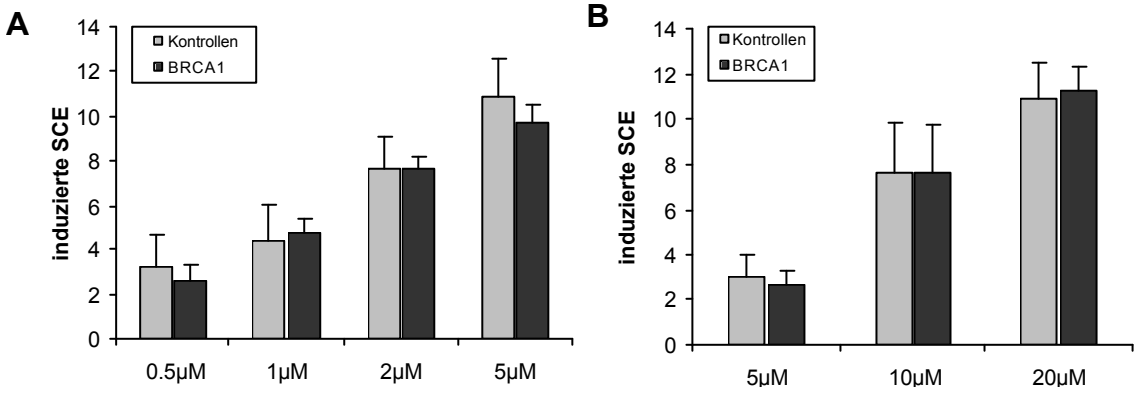



Abb. 19: Effekt von Cisplatin (A) und BCNU (B) auf die SCE Frequenzen in Lymphozyten von Frauen mit BRCA1-Mutation (n=5) und parallel untersuchten Kontrollen (n=4). Mittelwert +/- SEM.

### 3.1.2 Mutagensensitivität im Comet-Assay

Um die biologische Basis der Mutagensensitivität besser zu verstehen, wurden Lymphozyten bisher mit verschiedenen DNA-schädigenden Substanzen im MNT untersucht. Nun soll die im MNT beobachtete Strahlensensitivität mit den Effekten von Strahlung im Comet-Assay verglichen werden. Es wurde sowohl die Schadensinduktion als auch die Reparatur der DNA-Schäden untersucht.

#### 3.1.2.1 Comet-Assay bei pH 13

Es bot sich die Möglichkeit von einigen der bereits im MNT untersuchten Probanden Blutproben zu erhalten. Es konnten daher 6 Kontrollpersonen, 5 Frauen mit *BRCA1*-Mutation und 3 Frauen mit *BRCA2*-Mutation mit der alkalischen Version des Comet–Assay bei pH 13 untersucht werden Es wurde hierzu der Parameter Tailmoment verwendet, der sowohl Wanderungslänge wie auch Menge der gewanderten DNA umfasst. In Abb. 20 ist die absolute DNA Migration ohne und mit Bestrahlung aufgezeigt. Die spontane DNA-Migration zeigte Tailmomentwerte um 0,3, nach Schadensinduktion wurde ein Tailmoment von 2 erreicht. Man erkennt in diesem Diagramm nach Bestrahlung geringfügig höhere Werte bei den Mutationsträgern, jedoch ist dieser Unterschied nicht statistisch signifikant.

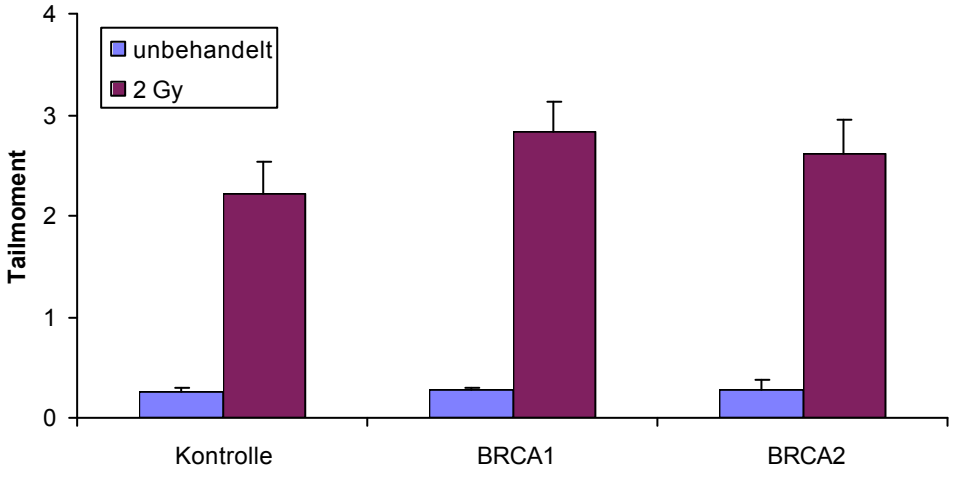



Abb. 20: DNA-Migration (Tailmoment) von unbehandelten Lymphozyten und nach 2 Gy Gamma-Strahlung im Comet-Assay bei pH 13. Mittelwerte von Frauen mit *BRCA1*-Mutation (n=5), mit *BRCA2*-Mutation (n=3) und Kontrollen (n=6), +/- SEM.

In Abb. 21 ist der Effekt von Strahlung auf die DNA-Migration der Einzelpersonen wie auch die Mittelwerte der drei Probandengruppen dargestellt. Als Maß für die Schäden wurde hier das induzierte Tailmoment dargestellt. Es zeigt sich eine große Variabilität der Effekte zwischen den einzelnen Individuen. Die Mittelwerte weisen auf eine höhere Sensitivität der BRCA-Mutationsträger hin, aber die Differenzen erreichen auch hier keine statistische Signifikanz.

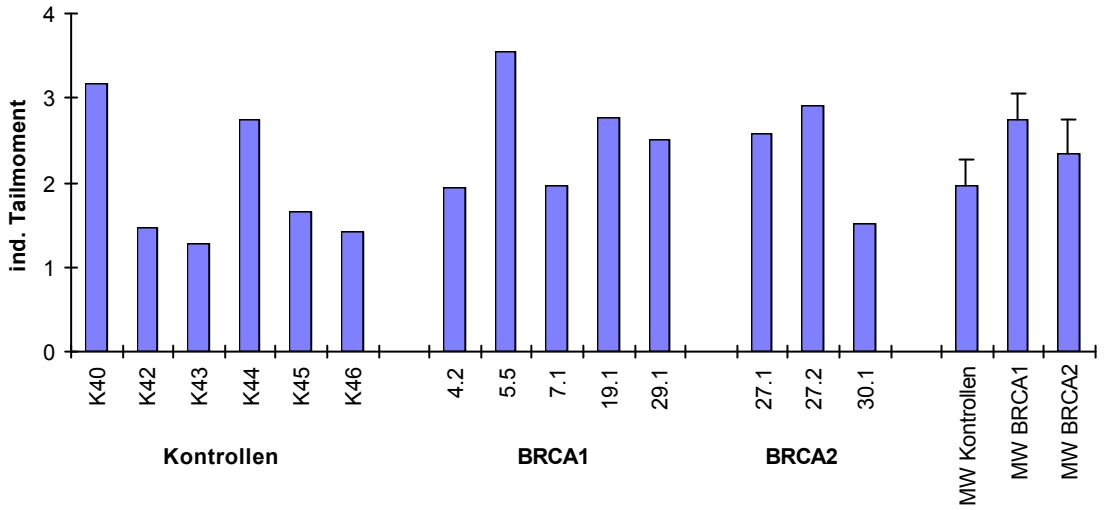



Abb. 21: Effekt von 2 Gy Gamma-Strahlung auf Lymphozyten von Frauen mit *BRCA1*- und *BRCA2*-Mutation und Kontrollen im Comet-Assay bei pH 13. Dargestellt sind das induzierte Tailmoment der Einzelpersonen und die Mittelwerte der drei Gruppen+/-SEM.

Mit dem Comet-Assay kann nicht nur die Induktion von DNA-Schäden gemessen werden, es kann auch die DNA-Reparaturkapazität von Zellen untersucht werden. Die Reparaturkapazität wird im Allgemeinen durch die Verringerung von DNA-Effekten mit der Zeit bestimmt. In folgendem Diagramm ist die Reparatur von Kontrollen, *BRCA1*- und *BRCA2*-Mutationsträgern zusammengefasst (Abb. 22). Es können keine grundlegenden Unterschiede in der Reparaturkapazität strahlen-induzierter Schäden festgestellt werden. Bei allen drei Gruppen ist nach etwa 15 min 50 % der induzierten DNA-Schäden repariert. Es können mit dem Comet-Assay nur Aussagen über den Zeitverlauf der Reparatur gemacht werden. Die Genauigkeit der erfolgten Reparatur kann mit diesem Test nicht untersucht werden.

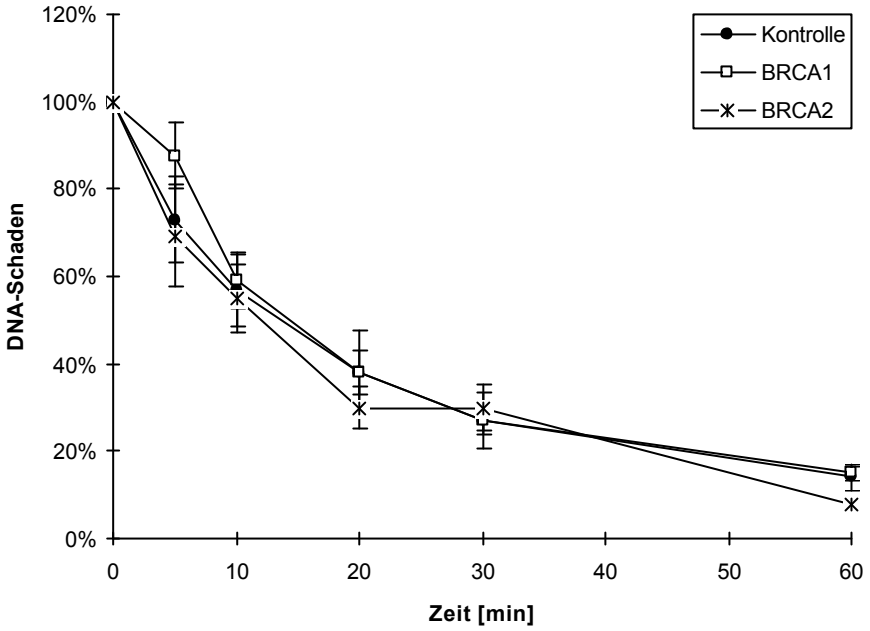



Abb. 22: Reparaturkinetik von strahleninduzierten Schäden im Comet-Assay bei pH 13 an Blutproben von Frauen mit einer *BRCA1*- (n=5) oder *BRCA2*-Mutation (n=3), und Kontrollen (n=6). +/-SEM.

### 3.1.2.2 Comet-Assay bei pH 9

Neben der alkalischen Version des Comet-Assays wurde 1997 von Singh und Stephens eine Version des Comet-Assay bei einem pH Wert von 9 eingeführt. Es findet in dieser Version keine Detektion alkalilabiler Stellen und Einzelstrangbrüche statt, stattdessen zeigt sich eine höhere Spezifität für DNA-Doppelstrangbrüche (DSB). Es wurden zunächst Validierungsexperimente an Vollblut und V79-Zellen durchgeführt. Die Zellen wurden bestrahlt, und es wurden Objektträger in doppelter Ausführung hergestellt. Ein Präparat wurde im Comet-Assay bei pH 13, das andere Präparat wurde im Comet-Assay bei pH 9 eingesetzt. Nach Durchführung des alkalischen Comet-Assays ist zu sehen, dass mit zunehmender Dosis an Gamma-Strahlung ein rapider Anstieg der DNA-Migration (Tailmoment) stattfindet, bei V79-Zellen in stärkerem Maße als in Blutzellen (Abb. 23 und 24). Bei Vollblut ist ab einer Dosis von 10 Gy im alkalischen Comet-Assay (pH 13) keine Messung des Tailmoments mehr möglich, da die Zellen zu stark geschädigt sind. In der pH 9-Version des Comet-Assays ist mit zunehmender Dosis an Strahlung ebenfalls ein Anstieg der DNA-Migration zu beobachten, jedoch in weitaus geringerem Maße als bei einem pH-Wert von 13. Bei einer Dosis von 15 Gy wird in Vollblut etwa ein

Tailmoment von 3 erreicht, im alkalischen liegt das Tailmoment schon bei einer Dosis von 8 Gy bei Werten um die 12 (Abb. 24).

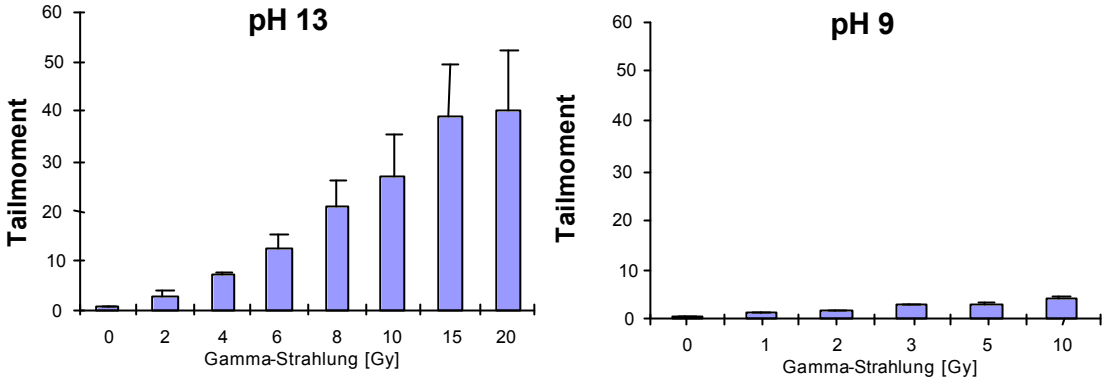



Abb. 23: Induktion von DNA-Migration mit Gamma-Strahlung im Comet-Assay bei pH 13 und pH 9. Es wurden je drei Experimente an V79 Zellen durchgeführt. Mittelwert ± SEM.

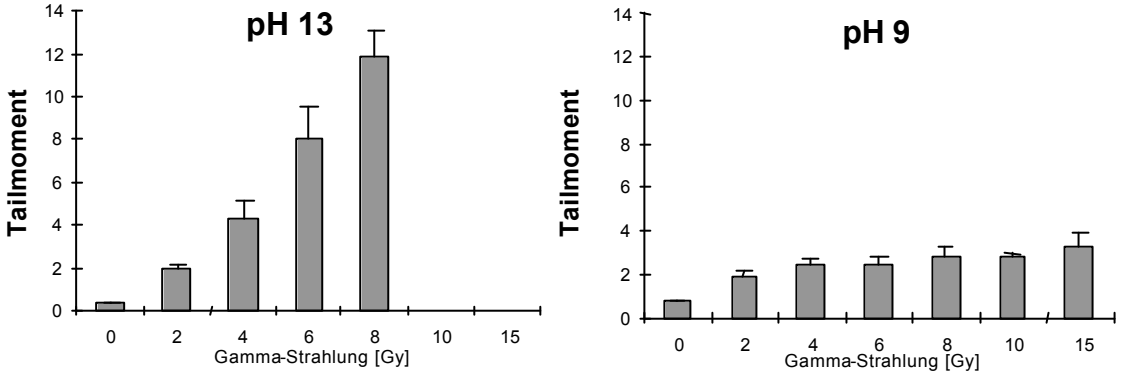



Abb. 24: Induktion von DNA-Migration mit Gamma-Strahlung im Comet-Assay bei pH 13 und pH 9. Es wurden je drei Experimente an Vollblut durchgeführt. Mittelwert ± SEM.

Die im Folgenden gezeigten Experimente mit der pH 9-Version des Comet-Assays wurden parallel zu den Experimenten bei pH 13 durchgeführt. Es wurde in beiden Versionen des Comet-Assay Blut derselben Patientinnen verwendet. In Abb. 25 sind die absoluten DNA-Effekte nach 2 Gy Strahlung dargestellt. Die basalen Werte liegen bei allen drei Probandengruppen bei etwa einem Tailmoment von 0,7. Bei dem Kollektiv der Patientinnen liegen die Mittelwerte sowohl bei Frauen mit *BRCA1*- wie auch mit *BRCA2*-Mutation geringfügig höher als die der Kontrollpersonen, jedoch ist kein signifikanter Unterschied zu erkennen.

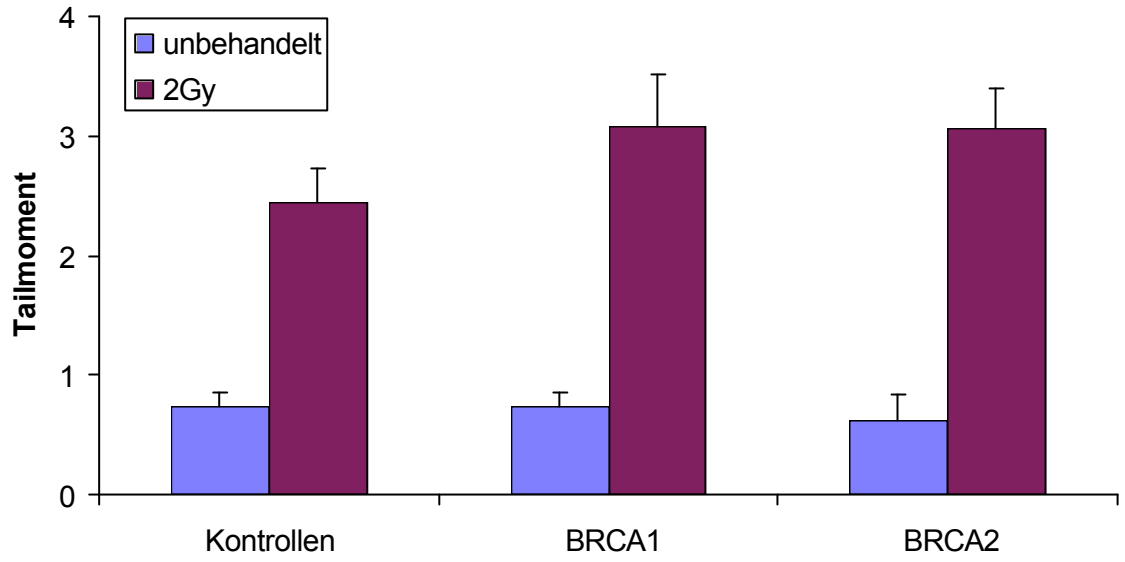



Abb. 25: DNA-Migration (Tailmoment) von unbehandelten Lymphozyten und nach 2 Gy Gamma-Strahlung im Comet-Assay bei pH 9. Mittelwerte von Frauen mit *BRCA1*-Mutation (n=5), mit *BRCA2*-Mutation (n=3) und Kontrollen (n=6), +/- SEM.

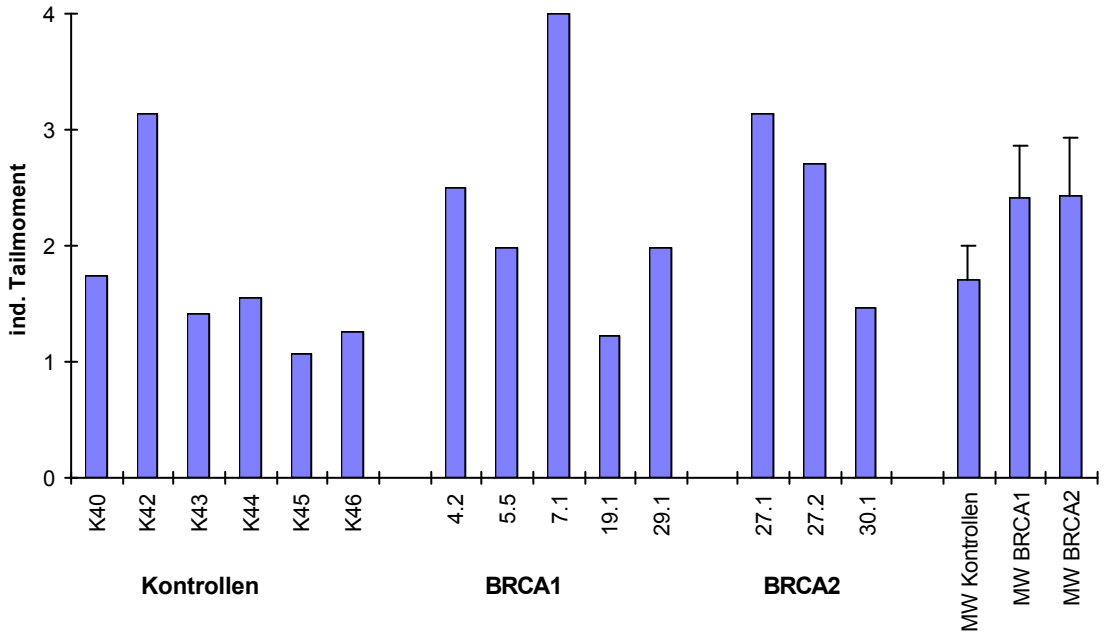



Abb. 26: Effekt von 2 Gy Gamma-Strahlung auf Lymphozyten von Frauen mit *BRCA1*-Mutation und *BRCA2*-Mutation und Kontrollen im Comet-Assay bei pH 9. Dargestellt sind das induzierte Tailmoment der Einzelpersonen und die Mittelwerte der drei Gruppen ± SEM.

In Abb. 26 ist das induzierte Tailmoment der Einzelpersonen wie auch die Mittelwerte der drei Probandengruppen dargestellt. Es zeigte sich auch hier eine große Variabilität der Effekten zwischen den einzelnen Individuen. Die Mittelwerte weisen auf eine höhere Sensitivität der BRCA-Mutationsträger hin, aber es ist kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen zu erkennen. Im Unterschied zum MNT kann auf individueller Ebene keine Mutagensensitivität nachgewiesen werden.

Die Reparatur der DNA-Schäden nach 2 Gy Bestrahlung erbringt auch bei einem pH-Wert von 9 keine grundlegenden Unterschiede zwischen den drei Gruppen (Kontrollen, *BRCA1*, *BRCA2*). Die Reparatur der *BRCA1*$^{+/-}$-Zellen scheint etwas später einzusetzen als die der beiden anderen Kollektive, aber ein signifikanter Unterschied ergab sich nicht, da die interindividuelle Variabilität recht groß ist (Abb. 27).

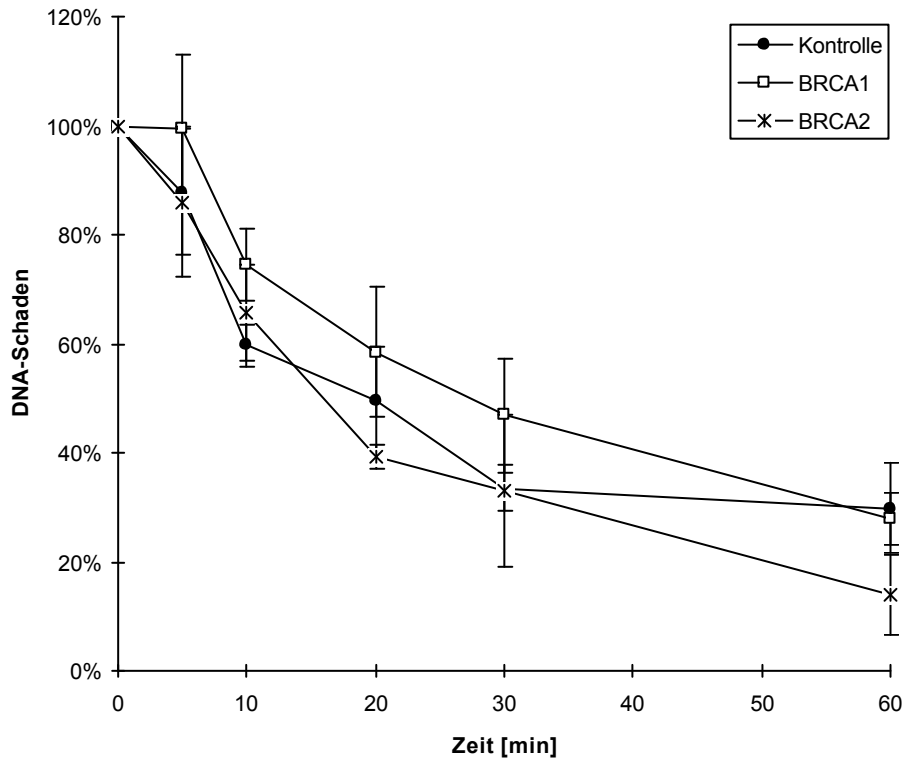



Abb. 27: Reparaturkinetik von strahleninduzierten Schäden im Comet-Assay bei pH 9 an Blutproben von Frauen mit einer *BRCA1*- (n=5) oder *BRCA2*-Mutation (n=3) und Kontrollen (n=6). +/-SEM

## 3.2 Untersuchungen zur Mutagensensitivität von lymphoblastoiden Zelllinien (LCL)

Da Patientenblut für weitreichende Untersuchungen nur begrenzt zu Verfügung steht und Blutkulturen nur eine begrenzte Lebensdauer haben, wäre ein Modellsystem für weitere Studien zur Mutagensensitivität ein bedeutender Gewinn. Lymphoblastoide Zelllinien (LCL) zeichnen sich durch ein relativ stabiles Genom aus und sollten als *in vitro* Modellsystem geeignet sein Es wurden deshalb im zweiten Teil dieser Arbeit sechs LCL für weitere Untersuchungen herangezogen. Drei der Zelllinien tragen eine Mutation im *BRCA1*-Gen, die anderen drei Zelllinien dienten als Kontrollen.

### 3.2.1 Sequenzierung des *BRCA1*-Gens

Um die Mutationen zu bestätigen, bzw. im Falle der Kontrollzelllinien auszuschließen, wurden zwei Regionen des *BRCA1*-Gens (T300G in Exon 5, 5382insC in Exon 20) sequenziert. Wie in Tab. 5 dargestellt, konnten die beschriebenen Mutationen im *BRCA1*-Gen der verwendeten Zelllinien bestätigt und eine eventuelle Verwechslung ausgeschlossen werden.

Tab. 5: Durch Sequenzierung nachgewiesene Mutationen in den untersuchten Zelllinien

| **Zelllinie** | **Mutation** | |
|---|---|---|
| | **T300G (Exon 5)** | **5382insC (Exon 20)** |
| L169 | - | - |
| AG1011 | - | - |
| AG09387 | - | - |
| L661 | + | - |
| L166B | + | - |
| HCC1937BL | - | + |

### 3.2.2 Chromosomenanalyse der LCL

Normale humane Zellen haben einen diploiden Chromosomensatz von 2n=46 Chromosomen. Durch die Transformation mit Viren, in diesem Fall mit dem Epstein-Barr-Virus, kann es zu Instabilitäten im Genom kommen, wodurch

Aneuploidien und chromosomale Rearrangements entstehen können. Zur Bestimmung der Chromosomenzahl wurden jeweils 20 Metaphasen jeder Zelllinie ausgewertet. Um den Anteil polyploider Zellen zu bestimmen, wurden 100 Metaphasen betrachtet. Abb. 28 zeigt exemplarisch zwei homogen mit Giemsa gefärbte Metaphasen einer Kontroll-Zelllinie (A) und einer *BRCA1*$^{+/-}$- Zelllinie (B). In Tab. 6 sind die Chromosomenzahlen aller Zelllinien dargestellt. Bis auf HCC1937BL und L169 hatten die untersuchten Zelllinien überwiegend 46 Chromosomen pro Metaphase.

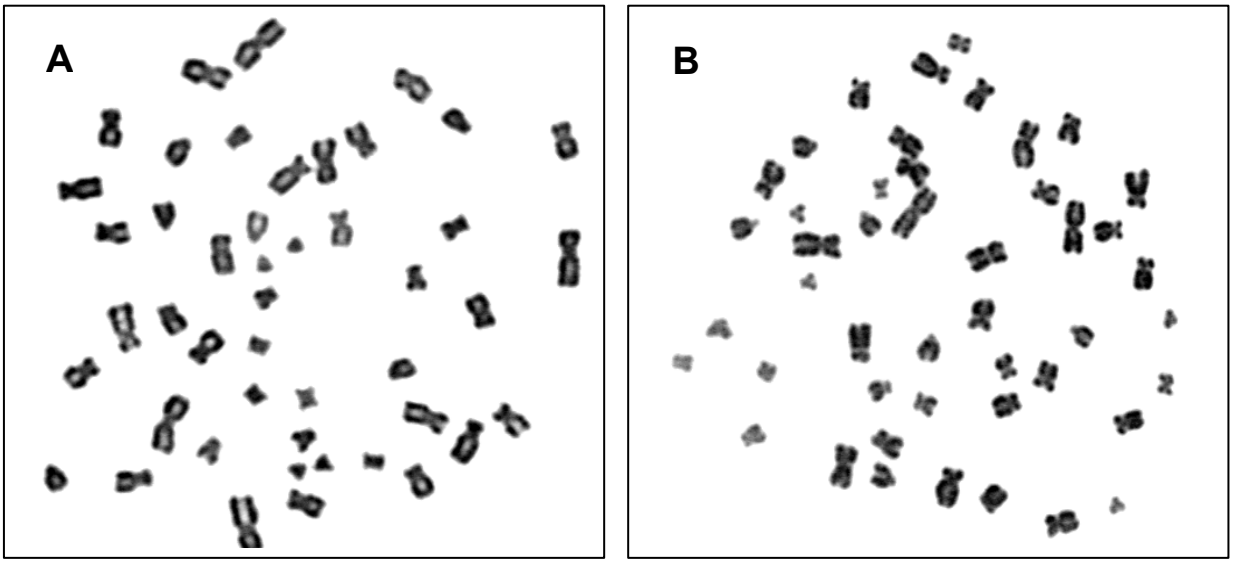



Abb. 28: Giemsa gefärbte Metaphase Präparate der Zelllinien AG1011 (A) und L661 (B)

Abweichungen nach oben und unten von den 46 Chromosomen aus spiegeln die Heteronuklearität permanenter Zelllinien wider, wobei präparationsbedingte Fehler nicht völlig auszuschließen sind. Der Anteil an polyploiden Zellen lag maximal bei 5 %.

Tab. 6: Chromosomenhäufigkeit der sechs lymphoblastoiden Zelllinien

| Zelllinie | Anzahl Chromosomen / Metaphase | | | | | | | Polyploidien |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | = 43 | 44 | 45 | 46 | 47 | = 48 | Æ * | in % ** |
| L169 | | 1 | 1 | 8 | 15 | | 46,5 | 0 |
| AG1011 | | 1 | 4 | 10 | 3 | 2 | 46,1 | 4 |
| AG09387 | | | | 18 | 2 | | 46,1 | 3 |
| L661 | 1 | | 4 | 13 | 1 | 1 | 45,8 | 5 |
| L166B | | | 7 | 18 | | | 45,7 | 1 |
| HCC1937BL | 1 | 3 | 12 | 4 | | | 44,9 | 1 |

*Mittelwert aus 20 Metaphasen
**aus 100 Metaphasen

### 3.2.3 Mutagensensitivität im Mikronukleustest

Da der Mikronukleustest (MNT) in den meisten Fällen eine Diskriminierung zwischen Lymphozyten mit BRCA-Mutation und ohne Mutation ermöglichte, wurden die LCL ebenfalls auf diesen genetischen Endpunkt hin untersucht. Neben Behandlung mit γ-Strahlung und $H_2O_2$-Behandlung wurde auch die Sensitivität gegenüber ENU untersucht. Es wurde wie bei den Experimenten mit Vollblut die Cytochalasin B-Modifikation des MNT verwendet. Für die Auswertung wurden je Experiment 500 binukleäre Zellen (BNC) herangezogen.

#### 3.2.3.1 Induktion von Mikronuklei durch γ-Strahlung

Der Effekt von γ-Strahlung auf die Induktion von Mikronuklei (MN) ist in Abb. 29 dargestellt. Die Abbildung zeigt die mittleren MN-Häufigkeiten in zweikernigen Zellen (MN / 500 BNC) aus je drei unabhängigen Versuchen in den Kontrollzellen (AG1011, AG09387 und L169) und den *BRCA1*$^{+/-}$-Zellen (L661, L166 und HCC1937BL) ohne Bestrahlung und nach Bestrahlung mit 1 Gy und 2 Gy. Es ist in allen sechs Zelllinien ein dosisabhängiger Anstieg der MN-Häufigkeit zu verzeichnen (Abb. 29A). Die spontanen MN-Frequenzen lagen bei den Zelllinien zwischen 8 und 18 MN in 500 zweikernigen Zellen (bzw. 1,6 - 3,6 %). Nach Bestrahlung mit 1 Gy stiegen die MN-Häufigkeiten auf 80 bis 180 MN/500 BNC (16 - 36 %) an, nach Bestrahlung mit 2 Gy auf bis zu 380 MN/500 BNC (76 %). Bei den Kontrollzelllinien AG09387 und AG1011 ist dabei ein auffallend starker Effekt zu beobachten. Die MN-Häufigkeit von L169

liegt in einem ähnlichen Bereich wie die der *BRCA1*$^{+/-}$-Zelllinien (L661, L166B, HCC1937BL).

Mit zunehmender Bestrahlungsdosis wurde auch eine Verlangsamung der Zellproliferation beobachtet (Abb. 29B). Der NDI war in allen Zelllinien dosisabhängig vermindert. Im Durchschnitt sank der NDI der unbehandelten Zellen aus dem Bereich um 1,6 nach Bestrahlung mit 2 Gy auf einen Wert um 1,2 – 1,3. Eine Ausnahme bildet hier die Zelllinie HCC1937BL, bei der schon der NDI der unbehandelten Kontrolle nur 1,5 betrug. Weder MN-Induktion noch NDI lassen Rückschlüsse auf systematische Unterschiede zwischen Zellen mit und Zellen ohne *BRCA1*-Mutation zu.

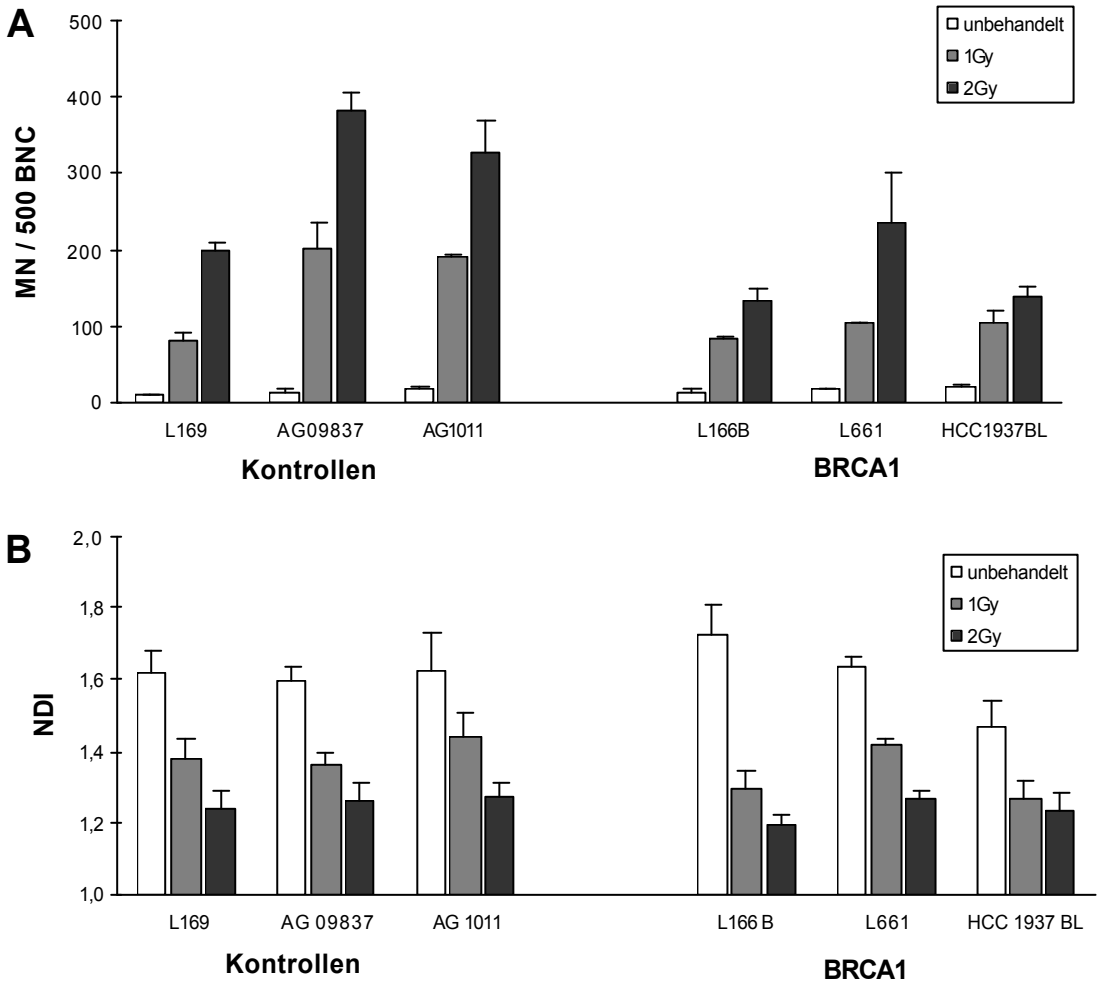



Abb. 29: Effekt von γ-Strahlung auf die (A) Mikronukleus(MN)-Induktion und auf (B) den Kernteilungsindex (NDI) in den untersuchten sechs Zelllinien. Mittelwert aus drei unabhängigen Versuchen +/- SEM

### 3.2.3.2 Induktion von Mikronuklei durch $H_2O_2$

Auch nach $H_2O_2$ Behandlung wurden die sechs Zelllinien vergleichend im Mikronukleustest untersucht. Der Effekt von $H_2O_2$ (10 µM, 20 µM und 40 µM) auf die Bildung von Mikronuklei und auf das Zellwachstum (NDI) ist in Abb. 30 dargestellt. Bei allen Zelllinien ist eine dosisabhängige Zunahme der Mikronukleus-Häufigkeiten zu beobachten (Abb. 30A), die jedoch bei den Kontrollzelllinien erst ab Behandlung mit einer $H_2O_2$-Konzentration von 20 µM auftrat. In den *BRCA1*$^{+/-}$-Zelllinien fand sich schon nach Behandlung mit 10 µM $H_2O_2$ eine erhöhte Induktion von Mikronuklei. Dieser Unterschied zu den Kontrollzelllinien war in allen *BRCA1*$^{+/-}$-Zelllinien (mit Ausnahme von L661) statistisch signifikant. Die basalen MN-Frequenz der LCL lagen bei 11-23 MN / 500 BNC (2-4%). Bei einer Behandlung mit 40 µM wurde eine MN-Induktion bis zu 60 MN /500 BNC (12%) erreicht.

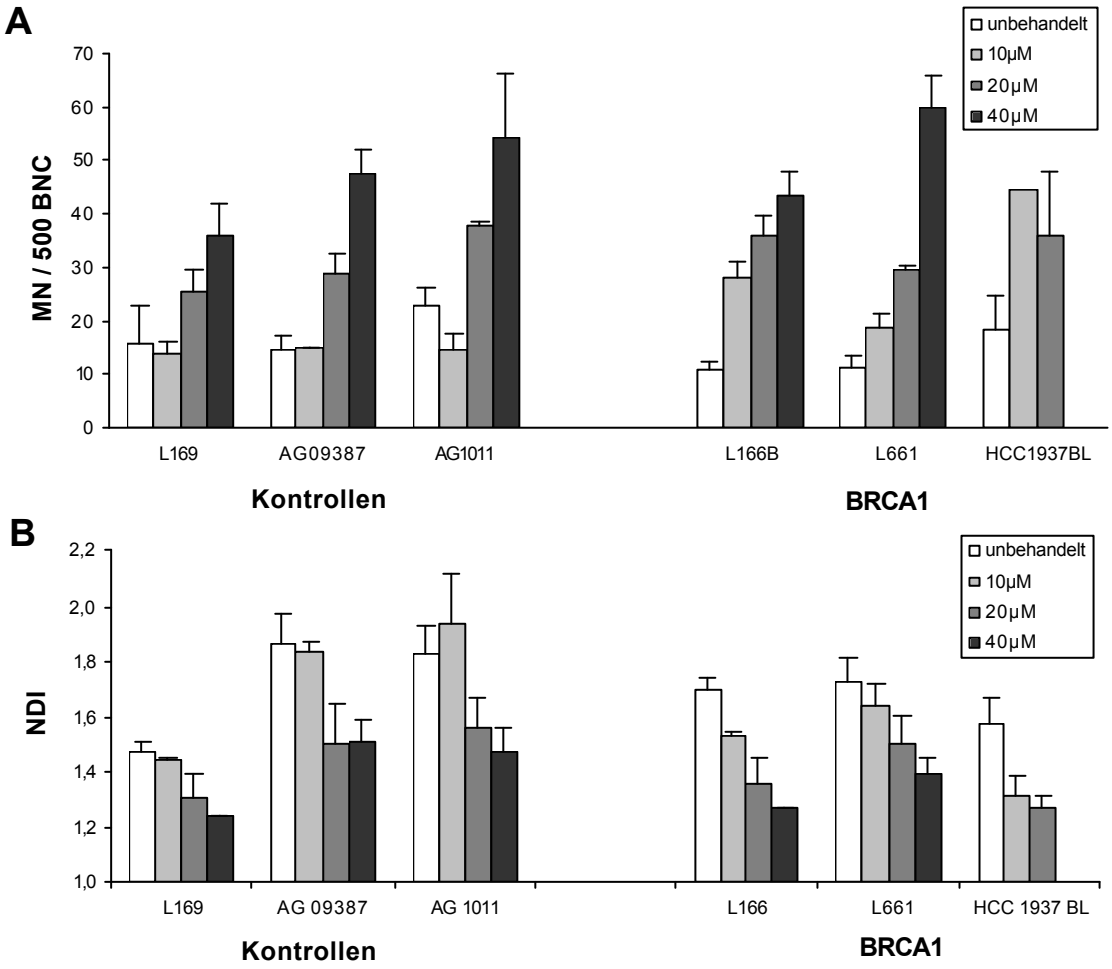



Abb. 30: Effekt von $H_2O_2$ auf die (A) Mikronukleus(MN)-Induktion und (B) den Kernteilungsindex (NDI) in den untersuchten sechs Zelllinien. Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen +/- SEM.

Bei Betrachtung des Kernteilungsindexes (NDI) ist bei allen Zellen mit Zunahme der $H_2O_2$-Konzentration eine Hemmung der Proliferation erkennbar (Abb. 30B). Auch hier tritt die verringerte Proliferation bei den *BRCA1*-heterozygoten Zelllinien schon ab einer Konzentration von 10 µM $H_2O_2$ auf, bei den Kontrollzelllinien ist diese Wachstumshemmung erst ab einer Konzentration von 20 µM zu beobachten. Bei der Zelllinie HCC1937BL war die proliferationshemmende Wirkung von 40 µM $H_2O_2$ so stark, dass keine Auswertung mehr möglich war. Bei allen anderen Zelllinien war ebenfalls eine konzentrationsabhängige Verlangsamung der Zellproliferation zu beobachten, jedoch war die zytotoxische Wirkung geringer.

#### 3.2.3.3 Induktion von Mikronuklei durch ENU

Der Effekt von ENU auf die Induktion von MN und auf den NDI ist in Abb. 31 dargestellt. In den Kontrollzelllinien und in den *BRCA1*$^{+/-}$-Zellen ist mit Zunahmen der ENU-Konzentration eine Erhöhung der MN-Frequenz erkennbar (Abb. 31A). Eine Ausnahme bildet die Zelllinie HCC1937BL. Hier ist nach Behandlung mit der höchsten ENU-Konzentration von 75 µg/ml kein weiterer Anstieg der MN-Häufigkeit zu verzeichnen.

Der NDI lag bei allen untersuchten Zelllinien bei einem Werte über 1,5 ohne vorige Behandlung und fällt in allen Zelllinien nach Behandlung mit ENU auf etwa 1,3 ab. (Abb. 31B). Auch hier bildet die Zelllinie HCC1937BL eine Ausnahme, es ist bei diesen Zellen ein etwas geringerer Kernteilungsindex von 1,2 nach 75 µg/ml ENU zu beobachten. Infolge schlechter Proliferation der Zellen kann es zu reduzierten MN-Häufigkeiten kommen, da Schäden noch nicht als MN exprimiert werden. Systematische Unterschiede zwischen Kontrollzellen und *BRCA1*-heterozygoten Zellen in Bezug auf MN-Induktion und auf Kernteilungsrate sind nicht zu erkennen.

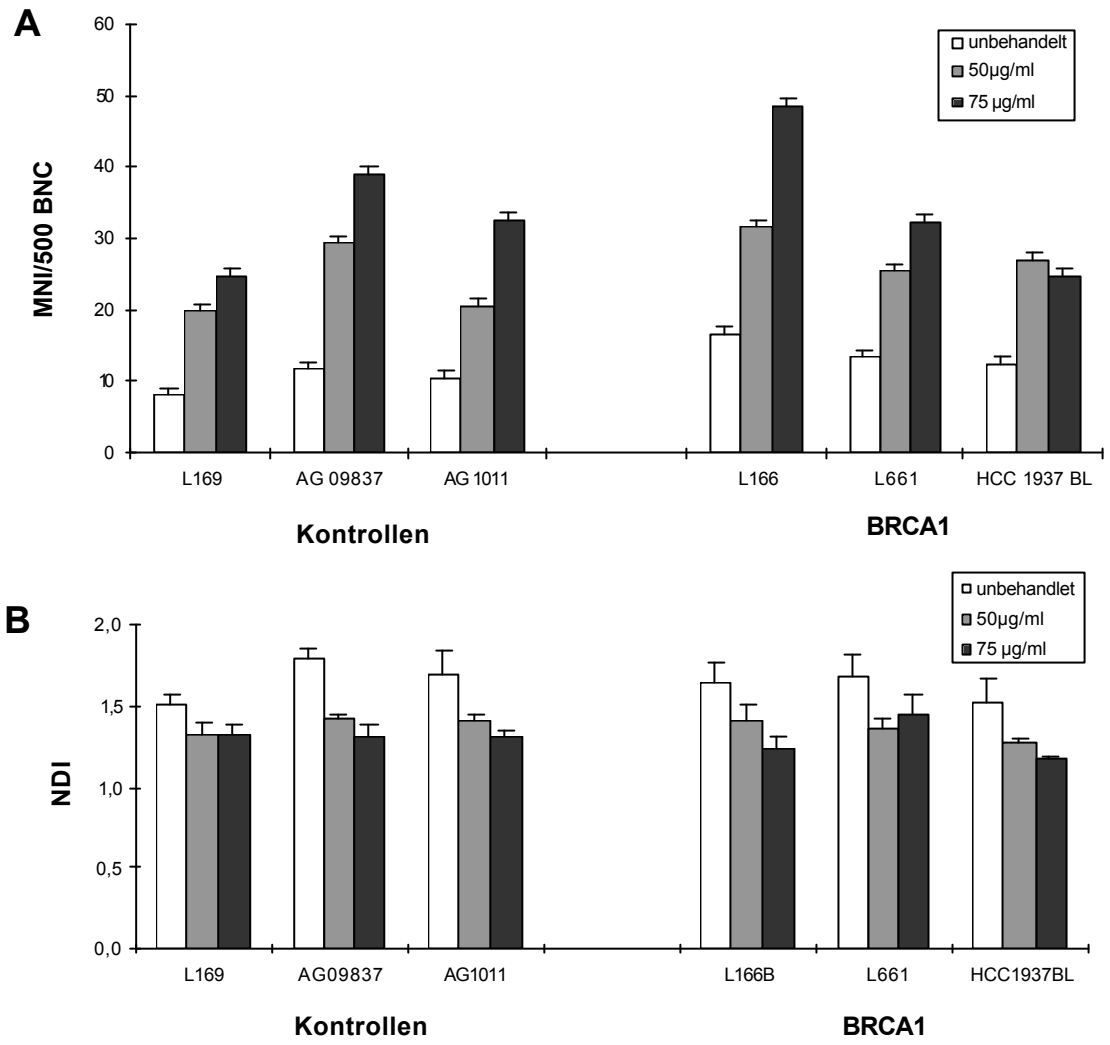



Abb. 31: Effekt von ENU auf die (A) Mikronukleus(MN)-Induktion und (B) den Kernteilungsindex (NDI) der sechs untersuchten Zelllinien. Mittelwert aus drei unabhängigen Versuchen +/- SEM.

### 3.2.4 Toxizitätstests

Die Untersuchungen der LCL im MNT gaben keinen Hinweis auf mögliche Sensitivitätsunterschiede zwischen Zelllinien mit heterozygoter *BRCA1*-Mutation und Kontrollen. Zur toxischen Wirkung von γ-Strahlung wurden nun weitere Experimente mit anderem Endpunkt durchgeführt, um die LCL näher zu charakterisieren.

### 3.2.4.1 Einfluss von g-Strahlung auf Zellwachstum und Vitalität

Um die Zytotoxizität zu untersuchen, wurde zu verschiedenen Zeitpunkten, in parallelen Ansätzen zum MNT, die Zellzahl bestimmt. Diesen Ansätzen wurde kein Cytochalasin B zugegeben. Jeweils 24 und 40 h nach Bestrahlung wurde mit Hilfe eines Zellzählers die Zellzahl in allen sechs untersuchten Zelllinien bestimmt. Der Zeitpunkt 40 h wurde gewählt, weil dies dem Präparationszeitpunkt im MNT entspricht. In Abb. 32 sind die Ergebnisse der Zellzählung nach 40 h dargestellt, wobei der Wert vor Bestrahlung als Basiswert (= 100%, durch die gestrichelte Linie angezeigt) definiert wurde. Die Zellzahlen 24 h nach Bestrahlung sind nicht dargestellt, da sie tendenziell mit den Werten nach 40 h übereinstimmen und somit keine zusätzliche Information liefern. Bei den unbehandelten Kontrollzelllinien ist 40 h nach Kulturansatz bei zweien eine Verdopplung der Zellzahl zu verzeichnen. Bei den *BRCA1*-Zelllinien ist ein Anstieg der Zellzahl auf etwa 140-170% des Basiswertes zu beobachten. Eine Bestrahlung mit 2 Gy hatte immer eine deutliche Verringerung der Proliferationsrate zur Folge, bei den LCL mit *BRCA1*-Mutationen in stärkerem Ausmaß als bei den Kontrollen. Eine Ausnahme bildet die Kontrollzelllinie L169 mit Zellzahlen im Bereich der mutationstragenden Zelllinien. Dieser Effekt war bei Bestrahlung mit 10 Gy noch ausgeprägter. Alle Zelllinien mit Ausnahme der Kontrolle AG1011 wiesen Zellzahlen um 11 bis 23 % geringer als der Basiswert auf. Die große Variabilität der drei Einzelversuche, die sich auch an den großen Fehlerbalken zeigt, macht es jedoch schwer, eindeutige Aussagen zu treffen. Auffallend ist, dass die Kontrollzelllinie L169 in den Toxizitätstests wie auch im MNT nach γ-Strahlung ähnlich reagiert wie die *BRCA1*$^{+/-}$-Zelllinien. Es werden Unterschiede zwischen den einzelnen Zelllinien deutlich, jedoch zeigten sich keine systematischen Unterschiede in LCL mit und ohne *BRCA1*-Mutation.

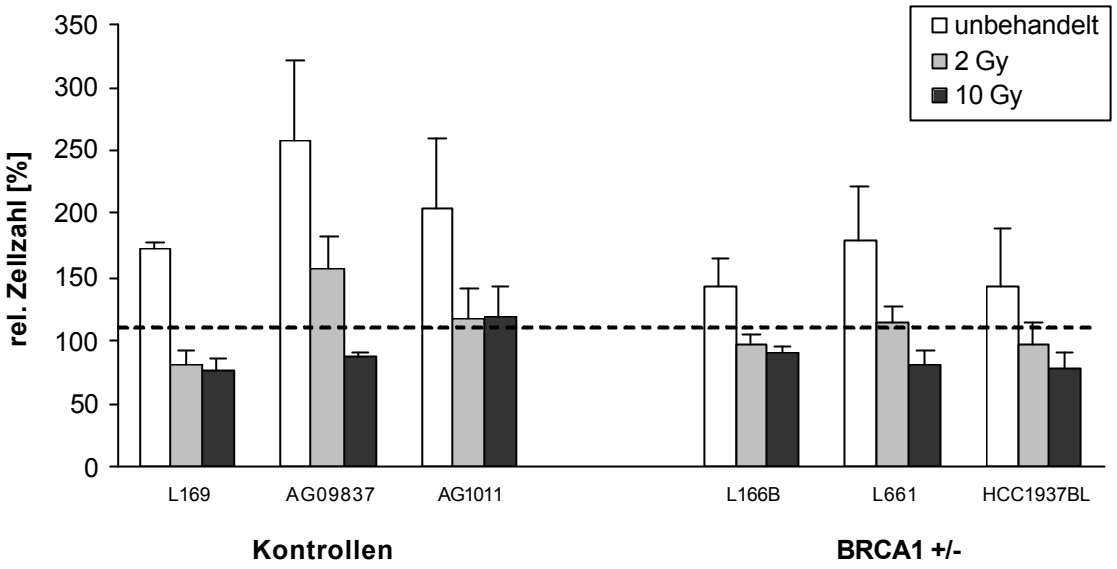



Abb. 32: Reduktion des Zellwachstums der sechs LCL mit und ohne *BRCA1*-Mutation 40 h nach Bestrahlung (2 Gy und 10 Gy). Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten +/- SEM.

Sowohl im MNT, als auch in der Zellzahlbestimmung hatte sich gezeigt, dass γ-Strahlung eine verlangsamte Proliferation in allen LCL bewirkte. Nun wurde zusätzlich die akute Toxizität von γ-Strahlung mit Hilfe einer FDA / Ethidiumbromid-Färbung untersucht. In Abb. 33 ist der prozentuale Anteil lebender Zellen unmittelbar nach Bestrahlung und nach einem Zeitraum von 2 h dargestellt. Die Bestrahlung wurde mit einer Dosis von 2 Gy und von 10 Gy durchgeführt. In vier der untersuchten LCL wurden vor und nach Bestrahlung etwa 70% lebende Zellen detektiert. Eine Ausnahme bildete die Kontrollzelllinie L169 mit einer extrem niedrigen Lebendzellzahl von etwa 60% vor und nach Bestrahlung, wobei die Anzahl der lebenden Zellen nach Bestrahlung eher anstieg. Eine weitere Ausnahme war in der *BRCA1*$^{+/-}$-Zelllinien HCC1937BL zu finden, die mit einer Lebendzellzahl von 80-90% deutlich die vitalste LCL war. In den meisten LCL war nicht direkt nach Bestrahlung eine Verringerung des Anteils lebender Zellen zu detektieren, sondern es zeigte sich erst nach Inkubation von 2 h ein leichter Abfall der Zahl lebender Zellen.

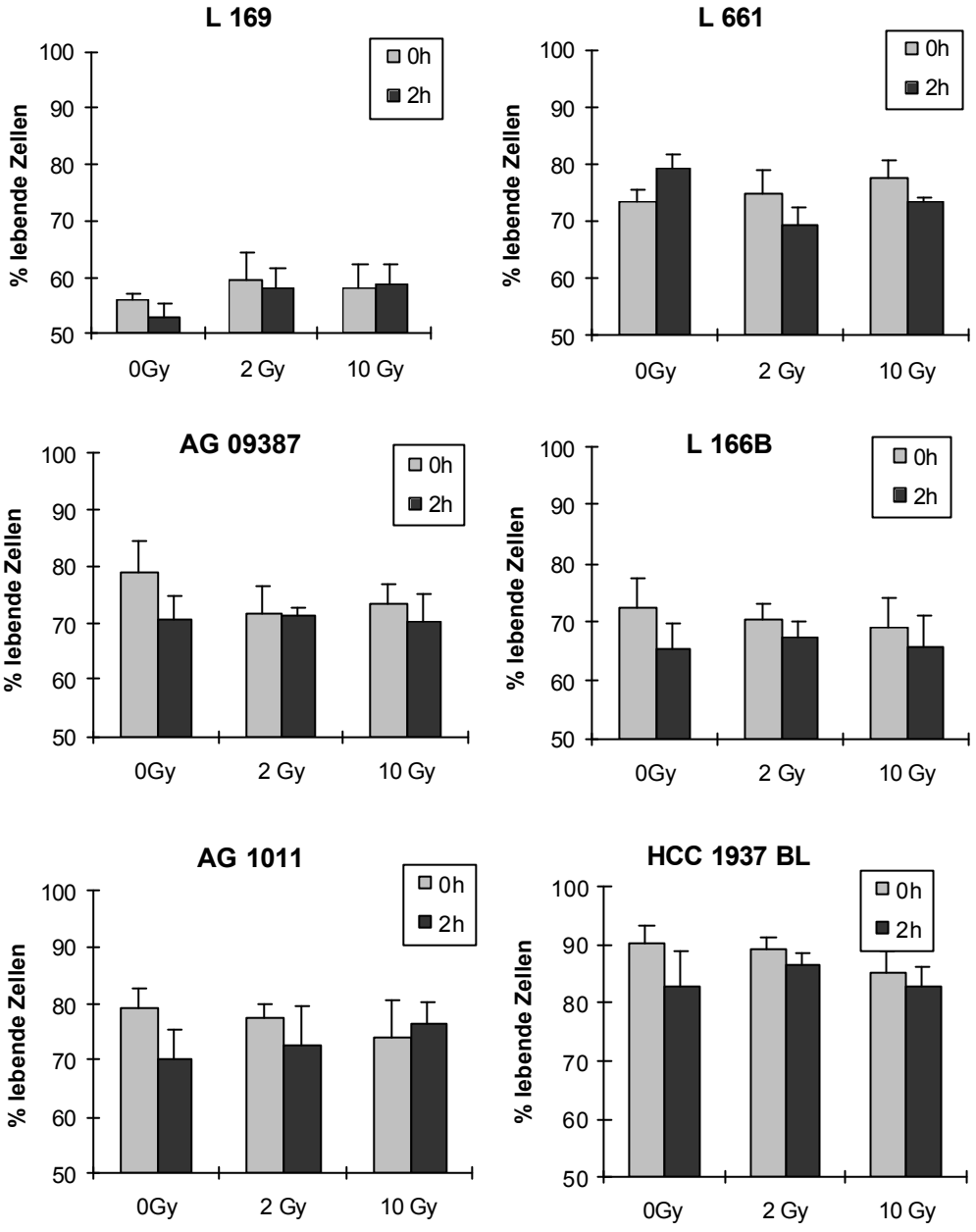



Abb. 33: Prozentualer Anteil lebender Zellen bestimmt mit Hilfe einer FDA / Ethidiumbromidfärbung. Die Zahl lebender Zellen wurden sofort und 2 h nach Bestrahlung mit 2 Gy und 10 Gy bestimmt, Kontrollzelllinien sind links und *BRCA1*$^{+/-}$-Zelllinien sind rechts dargestellt. Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten ± SEM.

### 3.2.4.2 Einfluss von g-Strahlung auf den Zellzyklus

Mit Hilfe des Zellzyklus-Analysegeräts (partec CCA) konnte untersucht werden, ob γ-Strahlung Einfluss auf die Zellzyklusverteilung der LCL hat. Die DNA der Zellen wurde mit DAPI (4,6-Diamidino-2-phenylindol) angefärbt und mittels eines Lasers gemessen. Da die Fluoreszenzintensität proportional zum DNA-Gehalt der Zelle ist, kann die Anzahl der Zellen in den verschiedenen Phasen des Zellzyklus bestimmt werden. Zellen in der $G_1$-Phase haben den einfachen, Zellen in der $G_2$-Phase den doppelten DNA-Gehalt und S-Phase-Zellen haben Werte, die zwischen den beiden Extremen liegen. Für Zellen, die sich in der $G_2$-Phase und kurz vor der Mitose befinden, ist die Fluoreszenz also doppelt so hoch wie in Zellen, die sich in der $G_1$-Phase befinden. In Abb. 34 sind die Ergebnisse exemplarisch für eine Kontrollzelllinie (AG1011) und eine heterozygote *BRCA1*-Zelllinie (L661) dargestellt. Es wurde nach 16 und nach 40 h die Verteilung der Zellen im Zellzyklus bestimmt. Der Zeitpunkt 40 h wurde gewählt, da dies der Dauer eines MNT entspricht.

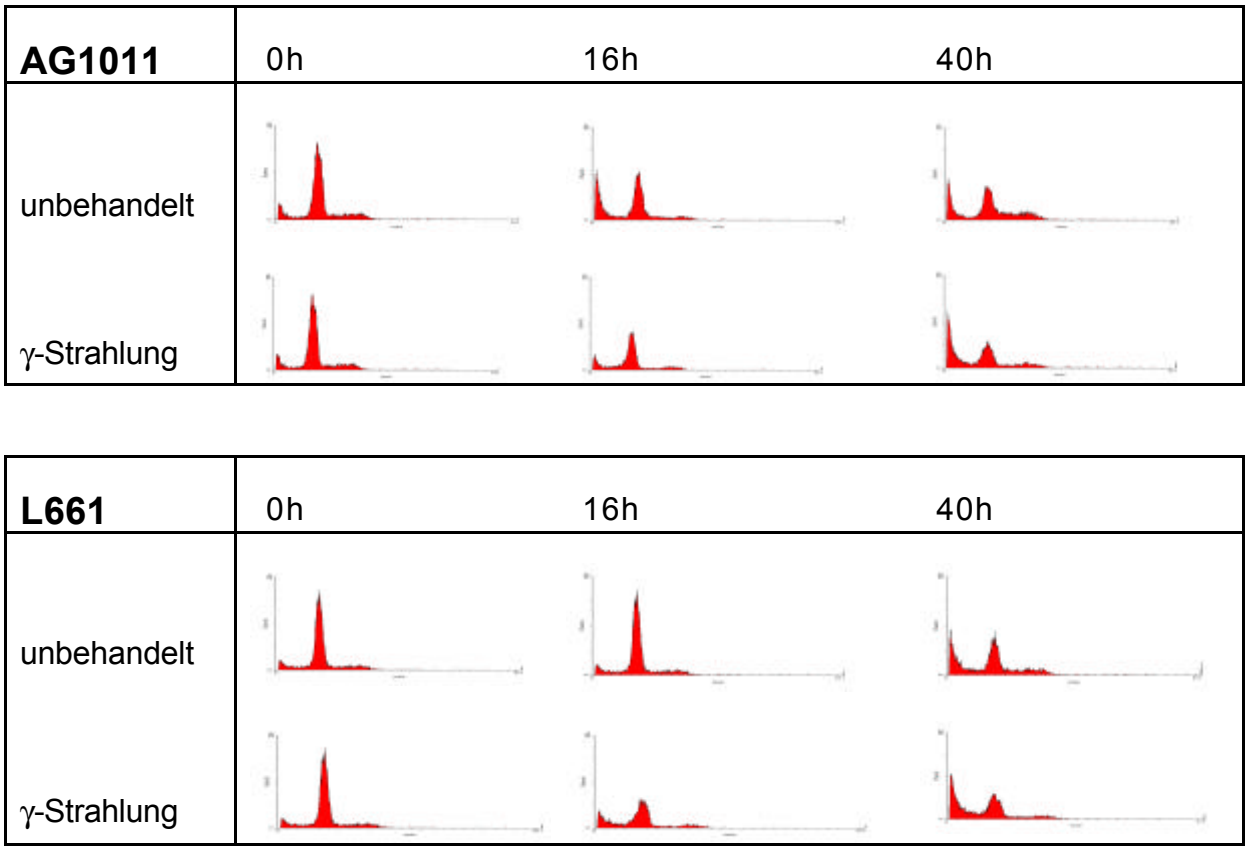



Abb. 34: Zellzyklusverteilung der Kontrollzelllinien AG1011 und der *BRCA1*$^{+/-}$-Zelllinien L661 vor Bestrahlung und 16 und 40 nach Bestrahlung mit 2 Gy.

Mit Hilfe dieser Histogramme kann durch Flächenbestimmung der $G_1$- und $G_2$+M-Gipfel eine prozentuale Zellzyklusverteilung erstellt werden. Diese ist in Tab. 7 dargestellt. Es ist daraus ersichtlich, dass weder systematische Unterschiede zwischen beiden Zelllinien zu erkennen sind, noch dass nennenswerte Unterschiede vor und nach Bestrahlung auftreten. Es ist lediglich ein geringfügig höherer Anteil an toten Zellen in den bestrahlten Proben nach 40 h auszumachen. Nach Bestrahlung ist keine Akkumulation der Zellen in der $G_2$-Phase zu erkennen, sondern lediglich eine Verringerung des Anteils an $G_1$-Zellen. Dieser erniedrigte Anteil an Zellen in der $G_1$-Phase 40 h nach Bestrahlung ist jedoch eher mit dem erhöhten Anteil an toten Zellen zu erklären, als durch ein verzögertes Durchlaufen des Zellzyklus. Die durch die γ-Strahlung induzierten Schäden hatten also keine Blockade im Zellzyklus zur Folge. Auch die Analyse der anderen Zelllinien erbrachte in ersten Experimenten keinen Hinweis auf einen spezifischen Unterschied zwischen Zellen mit und ohne *BRCA1*-Mutation, weshalb auf die vollständige Untersuchung mit Wiederholungsexperimenten verzichtet wurde.

Tab. 7: Zellzyklusverteilung der Zelllinien AG1011 und L661. Es ist der prozentuale Anteil von Zellen in der $G_1$-und $G_2$+M-Phase 16 und 40 h nach Bestrahlung mit 2 Gy dargestellt

| | | **AG1011** | | **L661** | |
|---|---|---|---|---|---|
| *Behandlung* | *Zeit* | *Phase im Zellzyklus* | | *Phase im Zellzyklus* | |
| | | $G_1$ | $G_2$+M | $G_1$ | $G_2$+M |
| unbestrahlt | 0h | 72% | 3% | 76% | 3% |
| | 16h | 68% | 2% | 60% | 2% |
| | 40h | 58% | 3% | 55% | 3% |
| γ-Strahlung | 0h | 72% | 3% | 76% | 3% |
| | 16h | 74% | 3% | 70% | 4% |
| | 40h | 50% | 5% | 60% | 5% |

### 3.2.5 Mutagensensitivität im Comet-Assay

Neben dem MNT wurde der Comet-Assay zu weiteren Untersuchungen herangezogen, da hiermit neben der Induktion von DNA-Schäden auch die Reparatur von Schäden verfolgt werden kann. Zusätzlich zu der alkalischen Version des Comet-Assays bei einem pH-Wert von 13 wurde eine Modifikation des Comet-Assays im neutralen Bereich bei einem pH-Wert von 8,3 durchgeführt. Diese Version ist vergleichbar mit dem Comet-Assay bei pH 9 und weist ebenfalls eine höhere Spezifität für Doppelstrangbrüche auf, wie kürzlich bei Wojewodzka et al. (2002) gezeigt wurde. Diese Version des Comet-Assays verspricht eine deutlichere Diskriminierung als bei einem pH Wert von 9.

#### 3.2.5.1 Effekt von γ-Strahlung und $H_2O_2$ im Comet-Assay bei pH 13

Die Untersuchungen im Comet-Assay nach γ-Strahlung zeigten in allen sechs LCL einen dosisabhängigen Anstieg der DNA-Migration (Abb. 35). Alle Zelllinien zeigten Basalwerte zwischen 0,4 und 0,6. Nach Bestrahlung mit 2 Gy erhielt man in den Kontrollzellen Effekte von bis zu 4,2, in den *BRCA1*-heterozygoten Zellen Effekte von bis zu 3,9. Bei Betrachtung von Kontrollen und Zelllinien mit *BRCA1*-Mutation ist kein systematischer Unterschied zwischen den beiden Gruppen in Bezug auf die DNA-Migration zu erkennen.

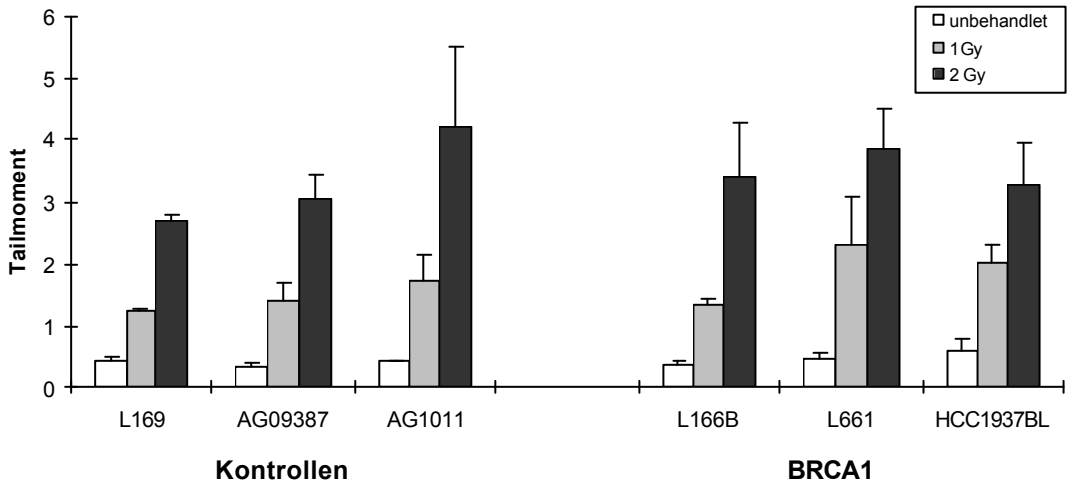



Abb. 35: Effekt von γ-Strahlung auf die Induktion von DNA-Migration (Tailmoment) in Zelllinien ohne Mutation und in Zelllinien mit heterozygoter *BRCA1*-Mutation im Comet-Assay bei pH 13. Mittelwert aus drei unabhängigen Versuchen, ± SEM.

Werden die Zellen mit verschiedenen Konzentrationen $H_2O_2$ (40, 60, 80 µM) behandelt, so ist in allen Zelllinien ein konzentrationsabhängiger Anstieg des

Tailmoment zu beobachten (Abb. 36). Eine Ausnahme bildet die Kontrollzelllinie L169, bei welcher die DNA-Migration nach einer Behandlung mit 40 µM $H_2O_2$ unerwartet stark ansteigt. Dieser deutliche Anstieg bei 40 µM zeigt sich jedoch nur in einem der vier in dieser Abbildung zusammengefassten Versuche. Die Höhe der induzierten DNA-Migration in den einzelnen Zelllinien variierte jedoch von Versuch zu Versuch. Grundlegende Unterschiede zwischen Kontrollzellen und Zellen mit heterozygoter *BRCA1*-Mutation zeigen sich auch nicht nach $H_2O_2$-Behandlung im Comet-Assay. Es wurden in diesen Experimenten ebenfalls zunächst die im MNT genutzten Konzentrationen von 10 und 20 µM $H_2O_2$ getestet, jedoch führte diese Behandlung zu keinem Anstieg der DNA-Migration, weshalb die Zellen in weiteren Experimenten mit höheren Konzentrationen behandelt wurden.

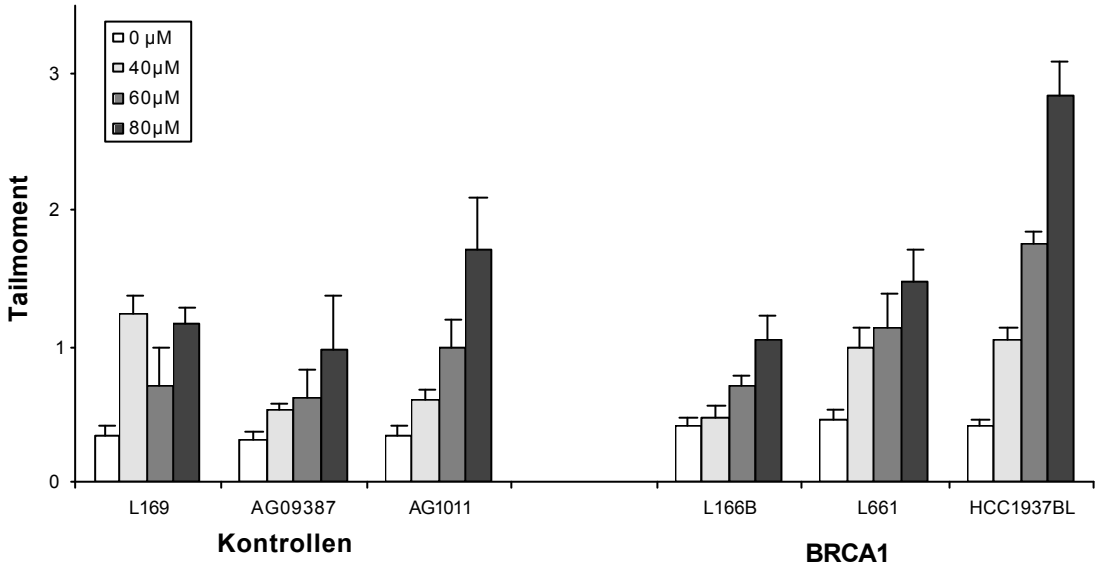



Abb. 36: Effekt von $H_2O_2$ auf die Induktion von DNA-Migration (Tailmoment) ) in Zelllinien ohne Mutation und in Zelllinien mit heterozygoter *BRCA1*-Mutation im Comet-Assay bei pH 13. Mittelwerte aus vier unabhängigen Versuchen, ± SEM.

### 3.2.5.2 Validierung des Comet-Assays bei pH 8,3

Mit dem Comet-Assay bei pH 8,3 steht ein Protokoll zu Verfügung, mit dem hauptsächlich Doppelstrangbrüche nachgewiesen werden können (Wojewodzka et al, 2002). Diese Version des Comet-Assay wurde erst kürzlich publiziert und verspricht eine spezifische Detektion von DSB. Um die Sensititvität und Spezifität zu testen wurden zunächst einige Validierungsexperimente durchgeführt. In Abb. 37

wurde der Einfluss von γ-Strahlung auf die DNA-Migration der Kontrollzelllinie AG1011 in der pH 8,3 Version des Comet-Assay mit der Induktion von DNA-Migration in der alkalische Version des Comet-Assays (pH 13) verglichen. Die Zellen wurden mit Dosen von 2 bis 100 Gy bestrahlt. In der alkalischen Version war lediglich eine Auswertung bis zu einer Dosis von 10 Gy möglich. Die Zelllinie zeigte einen Anstieg von einem Basalwert von 0,3 auf ein Tailmoment von 3 nach Bestrahlung mit 2 Gy, eine Erhöhung auf 8,3 nach 4 Gy, bis zu einem Tailmoment von 30 nach Bestrahlung mit 10 Gy im Comet-Assay bei pH 8,3. Nach Bestrahlung mit höheren Dosen wurden nur noch DNA-Fragmente in der Agaroseschicht gefunden, es war keine Auswertung mehr möglich. In der pH 8,3 Version des Comet-Assays war die Auswertung der Zellen bis zu einer Dosis von 100 Gy möglich. Nach Bestrahlung mit 2 Gy zeigte sich ein Anstieg von einem Basalwert von 0,9 auf ein Tailmoment von 2,7. Nach Bestrahlung mit 10 Gy wurde ein Tailmoment von 4,5 erreicht, was einem Sechstel der Werte im alkalischen Comet-Assay entspricht. Bei Dosen bis 20 Gy ist ein weiterer Anstieg zu beobachten, der dann mit zunehmender Dosis wieder leicht abfällt. Dieses Ergebnis stimmt mit den publizierten Daten von Wojewodzka et al. (2002) sehr gut überein. Es ist deutlich zu erkennen, dass mit der pH 8,3 Version des Comet-Assay weitaus weniger Schäden detektiert werden, als im alkalischen Milieu, was für eine höhere Spezifität spricht.

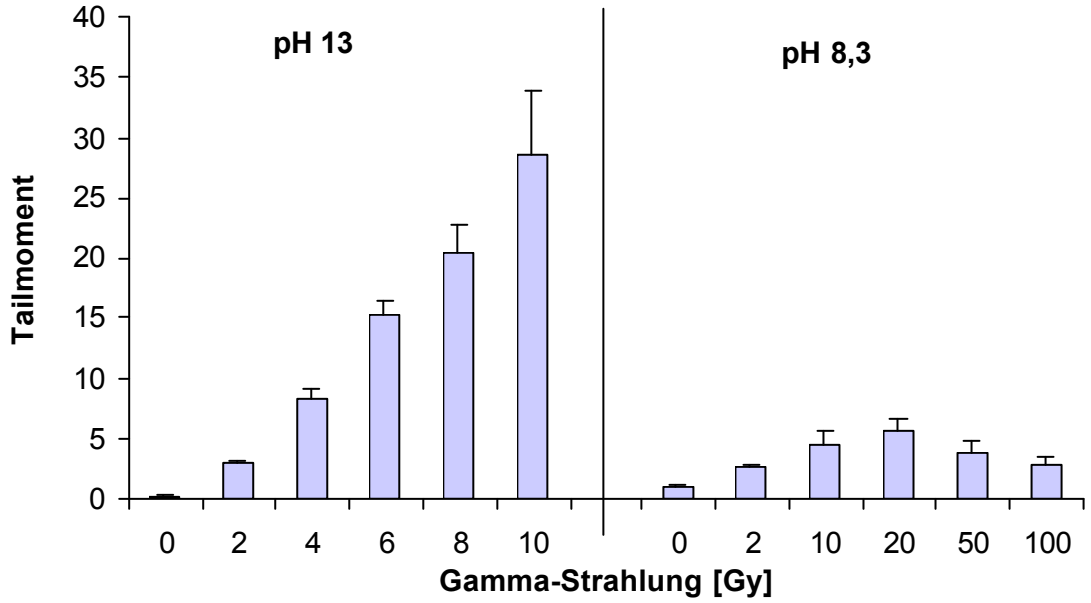



Abb. 37: Effekt von Gamma-Strahlung auf die DNA-Migration (Tailmoment) in einer Kontrollzelllinien (AG1011) im Comet-Assay bei pH 13 (A) und im Comet-Assay bei pH 8,3 (B). Mittelwert aus drei unabhängigen Versuchen, ± SEM.

Des Weiteren wurde der Einfluss von $H_2O_2$ auf die DNA-Migration im neutralen Comet-Assay untersucht. Da $H_2O_2$ primär Einzelstrangbrüche der DNA verursacht, dürfte eine neutrale Version des Comet-Assays, die erhöhte Sensitivität für Doppelstrangbrüche aufweist, keine oder nur geringfügige DNA-Migration nach $H_2O_2$ Behandlung anzeigen. In Abb. 38A ist der Effekt von $H_2O_2$ auf die Kontrollzelllinie AG1011, in Abb. 38B der Effekt von $H_2O_2$ auf die *BRCA1*-heterozygote Zelllinie HCC1937BL dargestellt. Die untersuchten Zelllinien zeigen in beiden Versionen des Comet-Assays einen konzentrationsabhängigen Anstieg der DNA-Migration. Bei einem pH von 13 ist ein Anstieg des Tailmoment von einem Ausgangswert von etwa 0,4 bis zu einem Tailmoment von 3,5 bei beiden Zelllinien zu beobachten. Im Comet-Assay bei pH 8,3 ist mit zunehmender $H_2O_2$-Konzentration nur ein sehr geringer Anstieg zu sehen. Diese DNA-Migration ist erklärbar durch die Induktion von nahe beieinander liegenden Einzelstrangbrüchen aufgrund sehr hoher $H_2O_2$-Konzentrationen. Da diese Experimente eine höhere Spezifität für DSB anzeigten, konnte dieser Test für weitere Untersuchungen eingesetzt werden.

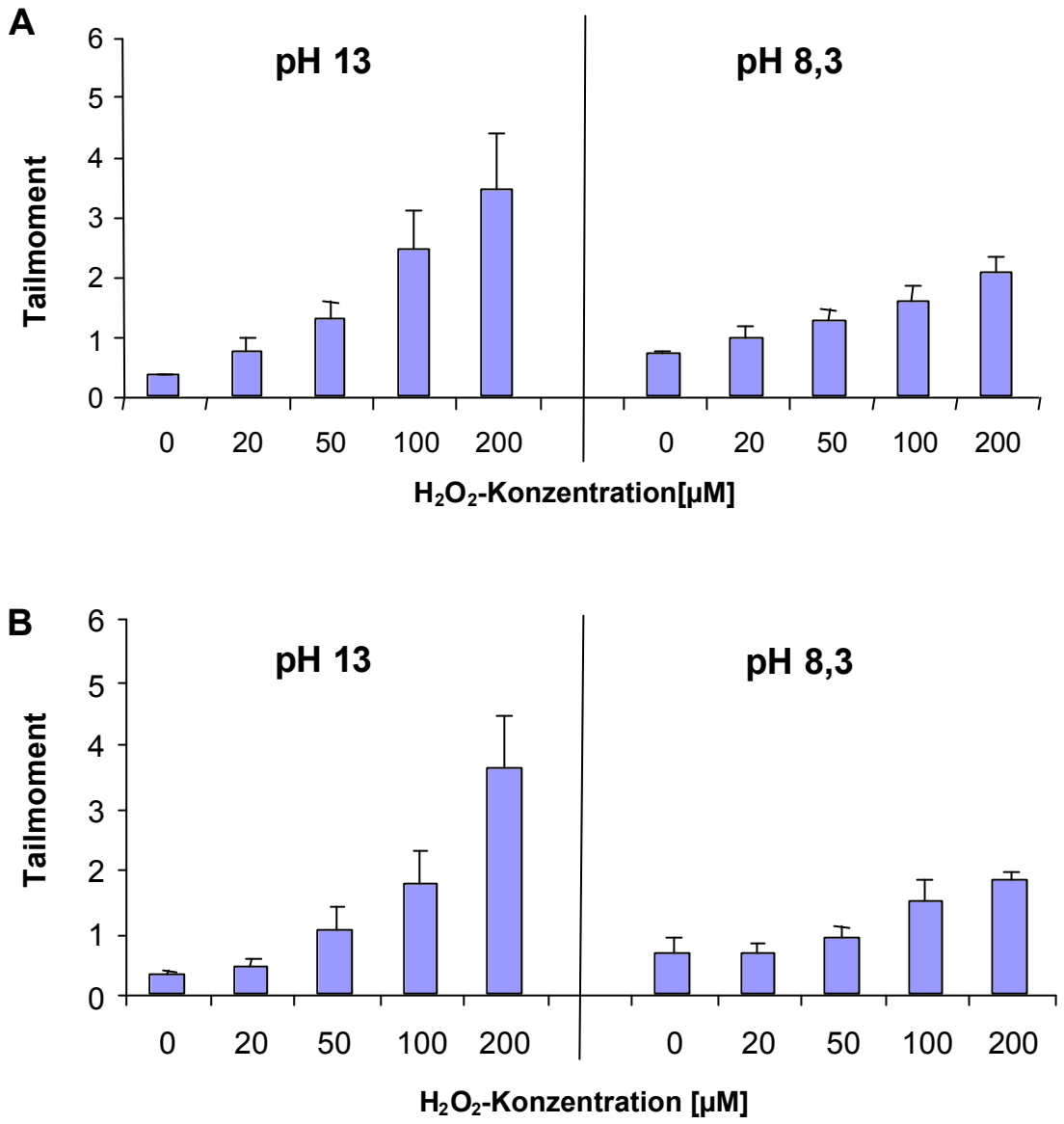



Abb. 38: Dosis-Effekt Beziehung von $H_2O_2$ in (A) der Kontrollzelllinie (AG1011) und (B) der *BRCA1*$^{+/-}$-Zelllinie (HCC1937BL) in der alkalischen Version des Comet-Assay (pH 13) und in der pH 8,3 Version des Comet-Assay. Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen, ± SEM.

### 3.2.5.3 Vergleich von alkalischem und neutralem Comet-Assay nach Induktion und Reparatur von DNA-Schäden durch γ-Strahlung

Es wurde vergleichend die DNA-Migration der sechs LCL in alkalischem und neutralem Comet-Assay untersucht. In Abb. 39 ist die Induktion von DNA-Schäden nach 2 Gy γ-Strahlung dargestellt. In allen untersuchten LCL ist nach Bestrahlung ein deutlicher Anstieg des Tailmoment zu beobachten, im alkalischen Comet-Assay

(Abb. 39A), wie auch im pH 8,3 Comet-Assay (Abb. 39B). Die Effekte zeigen eine recht große Variabilität zwischen den einzelnen Zelllinien, jedoch sind keine Unterschiede in Zellen mit Mutation im Vergleich zu Zellen ohne Mutation erkennbar. Die DNA-Migration nach 2 Gy im neutralen Comet-Assay ist erwartungsgemäß etwas niedriger als im alkalischen, wohingegen der Basalwert sowohl bei Kontrollen wie auch bei *BRCA1*-heterozygoten Zellen bei pH 8,3 mit 0,7 etwa doppelt so hoch liegt wie im alkalischen. Diese Beobachtungen sind noch deutlicher an den Mittelwerten der beiden Gruppen (Abb. 40) zu erkennen.

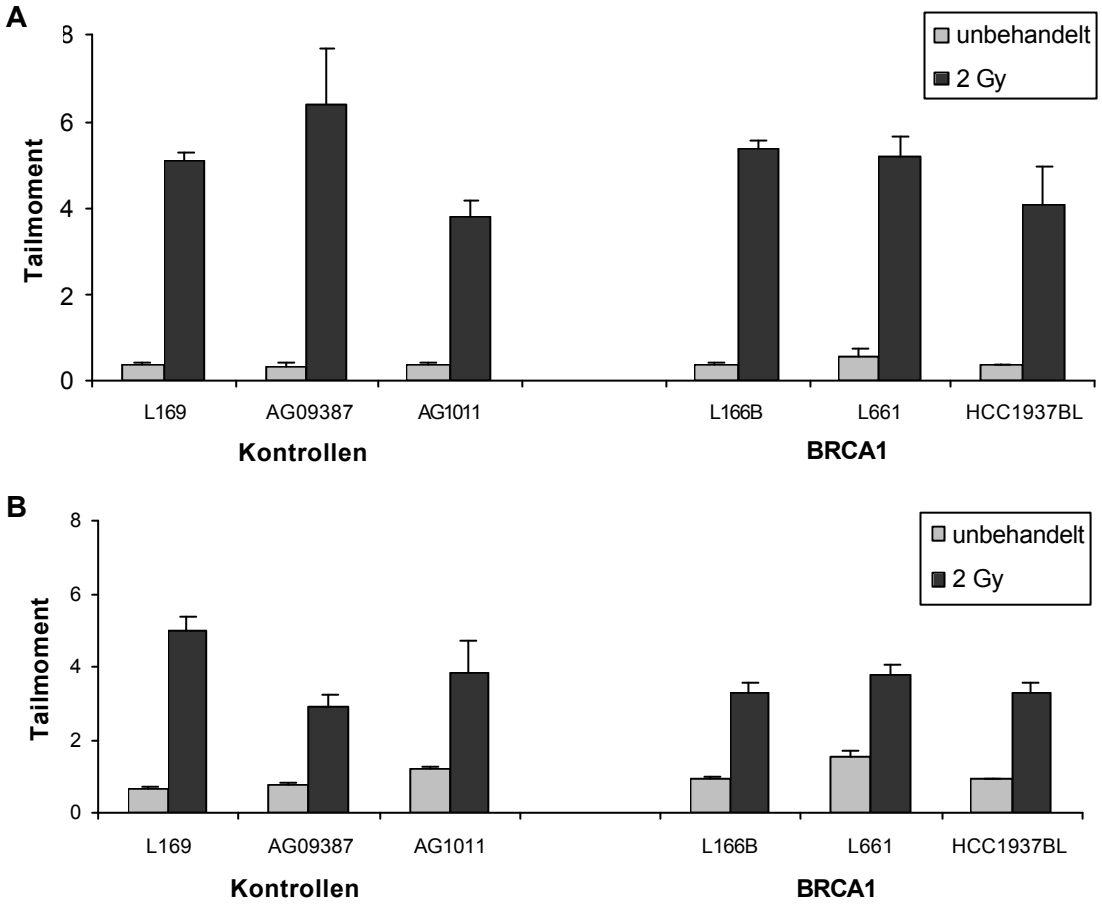



Abb. 39: Effekte von Gamma-Strahlung auf die DNA-Migration (Tailmoment) der sechs verschiedenen Zelllinien (A) im Comet-Assay bei pH13 und (B) im Comet-Assay bei pH 8,3. Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen, ± SEM.

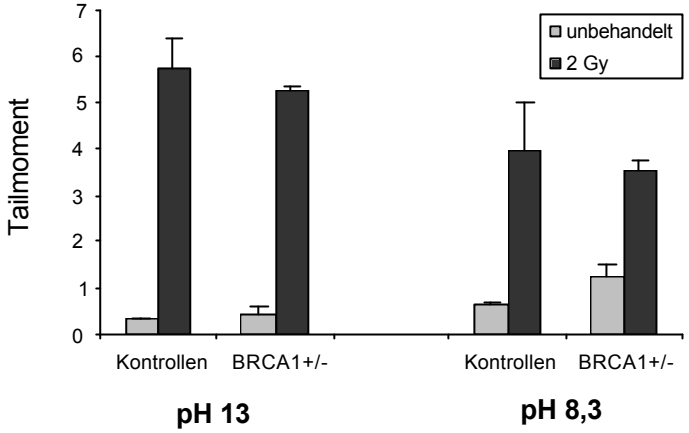



Abb. 40: Effekte von Gamma-Strahlung auf die DNA-Migration (Tailmoment) der sechs Zelllinien im Comet-Assay bei pH13 und im Comet-Assay bei pH 8,3. Mittelwerte der LCL mit und ohne *BRCA1*$^{+/-}$-Mutation aus drei unabhängigen Versuchen ± SEM.

Die Versuche zur Reparaturkinetik wurden nach einer Bestrahlung mit 2 Gy durchgeführt. Die Abnahme der DNA-Schäden wurde während eines Zeitraums von einer Stunde verfolgt, da in dieser Zeit ein Großteil der strahleninduzierten Schäden repariert wird. Abb. 41 zeigt in allen LCL eine Abnahme der initialen Schäden. Im Comet-Assay bei pH 13 sind nach einer Stunde in allen LCL weniger als 10 % Restschäden nachzuweisen (Abb. 41A). Bei der Hälfte der Zelllinien (L169, AG09387, L661) beginnt bereits 5 min nach Schadensinduktion die Elimination der Schäden, bei den anderen drei Zelllinien ist zunächst ein Anstieg der Schäden zu beobachten und erst nach 10 min werden Werte unter dem Initialschaden erhalten. Im Comet-Assay bei pH 8,3 (Abb. 41B) kann derselbe Effekt beobachtet werden. In ebenfalls drei der LCL (AG09387, AG1011, L661) kommt es vor Elimination der DNA-Schäden zunächst zu einem kurzen Anstieg der DNA-Migration. In zwei der Zelllinien wird nahezu eine Verdopplung des Ausgangsschadens erreicht. Erst nach 20 - 30 min wird der Ausgangsschaden wieder unterschritten. Die andere Hälfte der LCL weist in den ersten 10 min ein Schadensniveau um die 90% auf und bereits nach 10 - 20 min ist ein deutlich Abfall der DNA-Effekte zu erkennen. Systematische Unterschiede zwischen LCL mit heterozygoter *BRCA1*-Mutation und Kontrollen sind nicht auszumachen, was nochmals in Abb. 42 zu sehen ist. Hier sind die Mittelwerte der beiden Gruppen (Kontrollen, *BRCA1*$^{+/-}$) dargestellt. Im Alkalischen zeigt sich bei der Gruppe der *BRCA1*$^{+/-}$ -Zelllinien 5 min nach Bestrahlung ein Anstieg der Effekte,

jedoch ist dieser Effekt nicht bei allen Zelllinien mit Mutation zu beobachten, daher kann nicht auf einen mutationsbedingten Unterschied geschlossen werden. Die Abnahme der DNA-Schäden dieser Zellen erfolgt zeitlich 5 min verspätet. Der Kurvenverlauf zeigt ansonsten ein gleiches Erscheinungsbild. Im Comet-Assay bei pH 8,3 verlaufen die Reparaturkinetiken beider Gruppen nahezu identisch (Abb. 42). Nach einer Zunahme des Effekts setzt die Reparatur ein. 60 min nach Schadensinduktion sind 80 % der DNA-Schäden repariert.

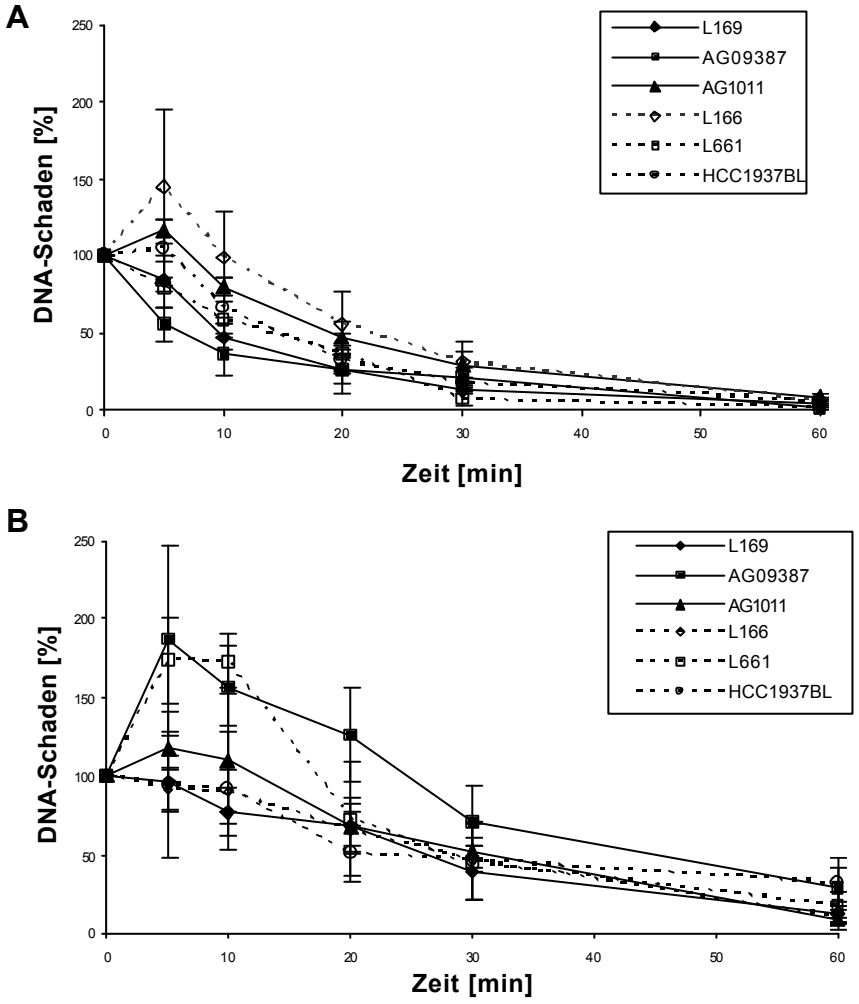



Abb. 41: Reparaturkinetik von strahleninduzierten Schäden (2 Gy) (A) im Comet-Assay bei pH 13 und (B) im Comet-Assay bei pH 8,3 der sechs Zelllinien. In durchgezogenen Linien ist die Elimination der DNA-Schäden der Kontrollzelllinien dargestellt, in gestrichelten Linien die Reparatur der *BRCA1*$^{+/-}$-Zelllinien. Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen ± SEM.

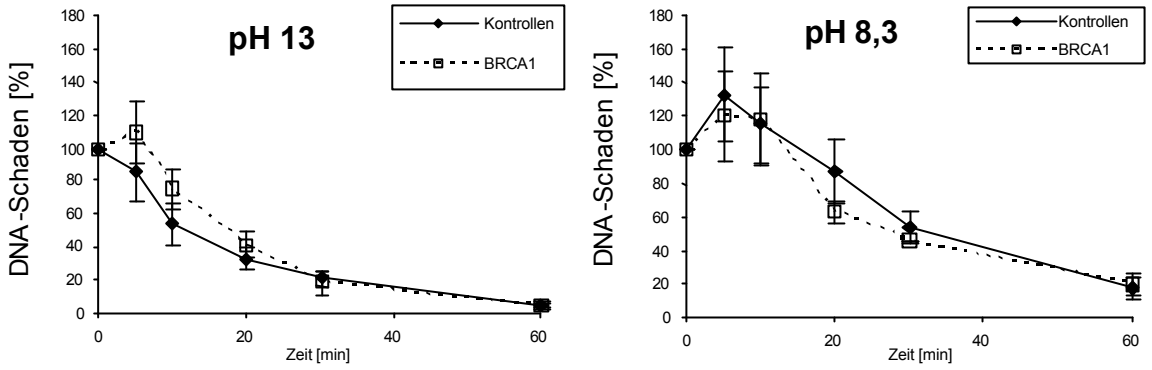
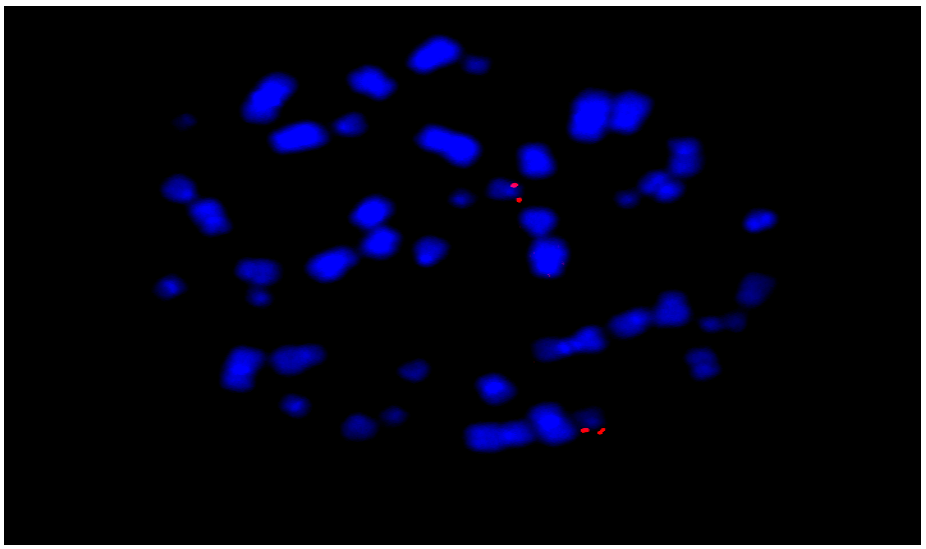



Abb. 42: Reparaturkinetik nach 2 Gy Gamma Strahlung im Comet-Assay bei pH 13 und im Comet-Assay pH 8,3. Es sind die Mittelwerte der drei Kontrollzelllinien den Mittelwerten der *BRCA1*$^{+/-}$-LCL gegenübergestellt. ±SEM.

### 3.2.6 Nachweis genspezifischer Reparatur mittels des Comet-FISH-Assay

Mit Comet-FISH wurde die Schadensinduktion wie auch die Reparatur in zwei spezifischen Genen (NF1 und p53) untersucht. Sonden dieser Genregionen wurden auf ein Comet-Assay-Präparat hybridisiert und es wurden die Fluoreszenzsignale lokalisiert. Liegt das Signal im Bereich des Kometenkopfes, so kann man davon ausgehen, dass diese Genregion nicht geschädigt wurde, ist das Signal im Kometenschweif zu finden, so geht man von einer Schädigung dieses Genbereiches aus. Um die Spezifität der Sonden zu überprüfen, wurde zunächst eine Hybridisierung auf Metaphasechromosomen durchgeführt (Abb. 43).

A



B

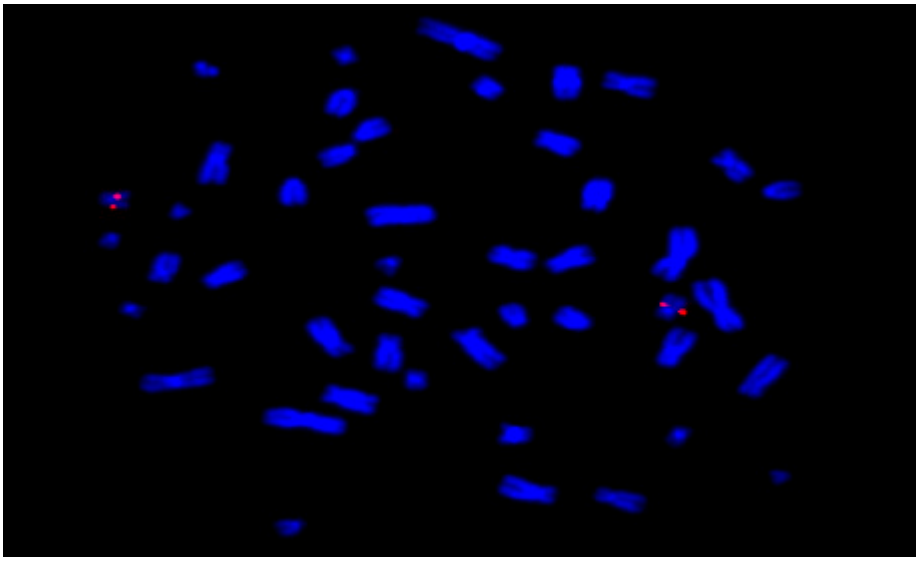


Abb. 43: Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) auf Metaphase Zellen mit einer p53-Sonde (A) und einer NF1-Sonde (B). Die Gene NF1 und p53 sind als rote Signale erkennbar.

### 3.2.6.1 Vergleich von genomweiter Reparatur mit genspezifischer Reparatur

Zur Abschätzung, welche Zeitpunkte der Reparatur zu Untersuchungen mit der Comet-FISH-Methode sinnvoller Weise verwendet werden sollen, wurde eine der LCL (AG09387) mit 5 Gy bestrahlt und die Reparatur wurde über einen Zeitraum von 2 h verfolgt. In Abb. 44A sind die DNA-Schäden bestimmt worden durch Messung des Parameters Tailmoment. Es fließen hierbei sowohl Menge an gewanderter DNA

wie auch die Wanderungslänge der DNA-Fragmente ein. Die zum Zeitpunkt 0 induzierten Schäden wurden auf 100 % gesetzt. Man erkennt, dass 20 min nach Bestrahlung bereits über 80% der Schäden repariert wurden. Nach 30 min sind nur noch 5% der DNA-Schäden nachweisbar. In Abb. 44B ist dieselbe Reparaturkinetik abermals gezeigt, jedoch wurde hier der Parameter „Tailintensität“ zur Bestimmung der DNA-Schäden verwendet. Es wird dabei der Anteil an ausgewanderter DNA in Prozent der gesamten DNA des Kometen ausgedrückt. An dieser Darstellung kann abgelesen werden, dass im Mittel etwa 30 % der DNA der Zellen geschädigt worden sind. Wie auch schon in Abb. 44A erkennbar, sieht man auch hier, dass nach 30 min die induzierten Schäden nahezu vollständig eliminiert wurde.

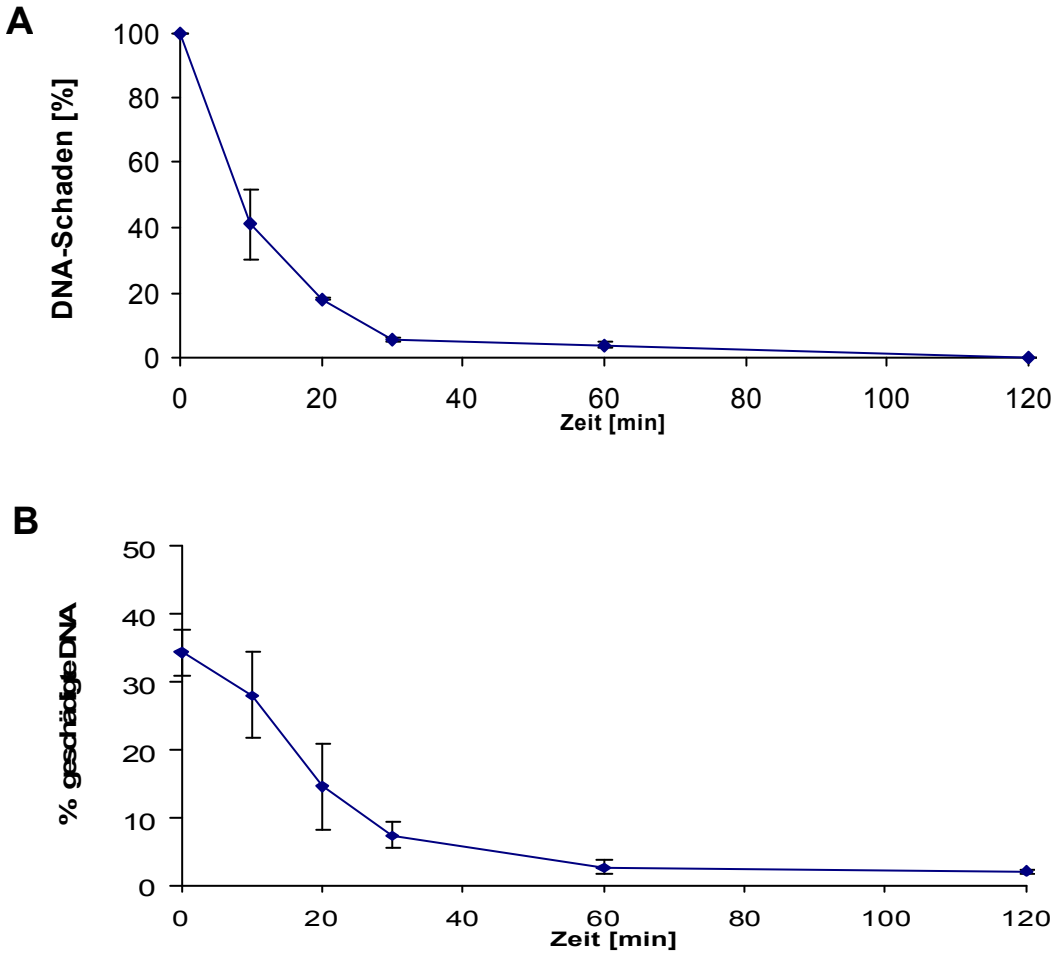



Abb. 44: Reparaturkinetik der Kontrollzelllinie AG09387 nach 5 Gy Bestrahlung über einen Zeitraum von 2 h. (A) Die zum Zeitpunkt 0 induzierten Schäden (gemessen mit dem Tailmoment) wurden auf 100% gesetzt. (B) Der Grad der DNA-Schädigung wurde mit dem Parameter Tailintensität (= Prozent an gewanderter DNA) gemessen. Mittelwert aus zwei unabhängigen Versuchen, ± SEM.

Die genregionspezifische Reparatur wurde an zwei der sechs lymphoblastoiden Zelllinien untersucht. Nach einer initialen Schadenssetzung von 5 Gy, wurden die Zellen direkt nach der Schadensinduktion sowie 10 und 20 min später in den Comet-Assay eingesetzt. Diese Zeitpunkte wurden als ausreichend befunden, da während dieser ersten 20 min ein Großteil der Schäden repariert worden ist.

In Abb. 45 ist das Bild zweier Zellen nach Durchführung des Comet-FISH-Assay gezeigt. Abb. 45A zeigt einen Kometen ohne DNA-Schäden und mit zwei Signalen im Kopfbereich in der nächsten Abbildung ist ein stark geschädigter Komet mit vier Signalen im Bereich des Schweifs zu sehen (Abb. 45B). Die beiden nicht durch Pfeile markierten roten Signale in Abb. 45B, konnten im Mikroskop als Farbkristalle definiert werden.

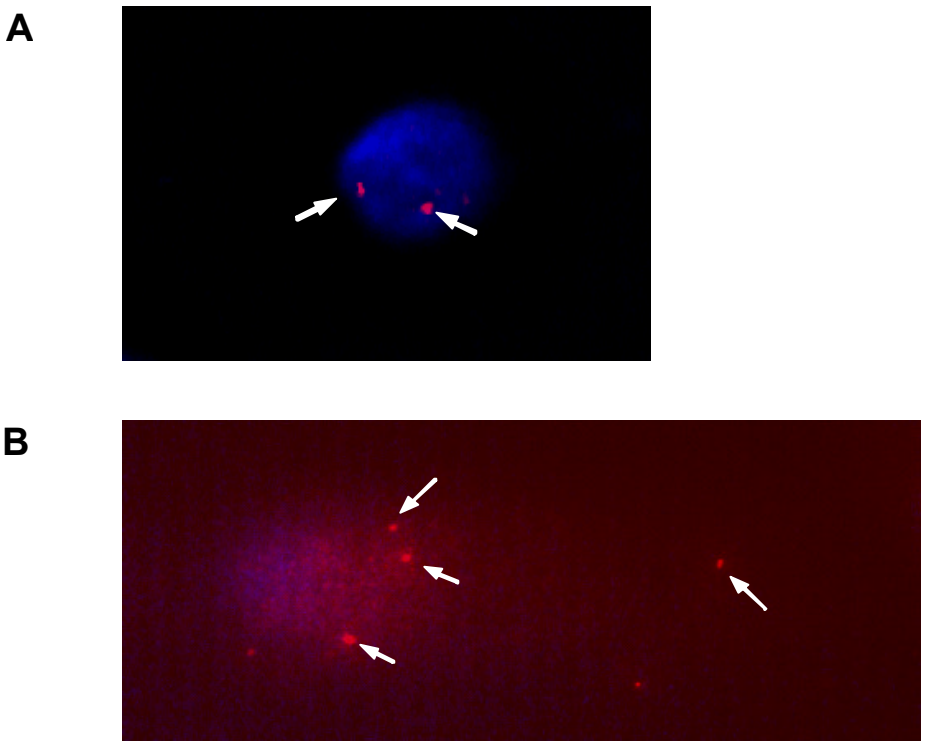



Abb. 45: (A) Komet nach DAPI-Gegenfärbung, ohne Schadensinduktion mit zwei Signalen im Kopfbereich. (B) geschädigte Zelle mit vier Signalen im Bereich des Kometenschweifs.

In folgender Tabelle (Tab. 8) sind die Ergebnisse des Comet-FISH-Assays bei Verwendung der NF1-Sonde dargestellt. Es wurden drei unabhängige Versuche durchgeführt. Es ist aufgelistet, wie viele Zellen für die Auswertung herangezogen werden konnten und wie viele Signale im Durchschnitt pro Zelle im Kopf und im

Schweif zu detektieren waren. Im Durchschnitt wurden pro Zelle etwas mehr als zwei Signale gefunden. Es liegt im Bereich der Möglichkeiten 2 bis 4 Signale pro Zelle zu finden. Vier Signale sind dann detektierbar, wenn die DNA bereits repliziert wurde und die Zelle kurz vor der Teilung steht. Wurden die Zellen geschädigt und danach ein Hybridisierung durchgeführt, so gibt es zwei Möglichkeiten der Schadensdetektion: wurde der Schaden direkt in dem untersuchten Gen gesetzt, so kommt es zur Zunahme der Fluoreszenzsignale, da beide Bruchstücke von der Sonde detektiert werden. Wird der Schaden in der umgebenden Region des untersuchten Gens gesetzt, so kommt es zu einer Wanderung des Signals aus dem Kopfbereich des Kometen in den Schweifbereich. Die Anzahl der Signale wird nicht erhöht. In Versuch 1 und in Versuch 2 war je ein Objektträger nicht auswertbar, da die Agaroseschicht mit den darin befindlichen Zellen während der Hybridisierung instabil wurde und sich ablöste. In Tab. 8 ist die Verteilung der Signale auf Kopf und Schweifbereich der Kometen dargestellt. Von den zumeist zwei detektierten Signalen, in der Tabelle aufgelistet in der Spalte „Signale gesamt“, sind nach Bestrahlung mit 5 Gy (Zeitpunkt 0) bei der Kontrollzelllinie in Versuch 2 (V2) 0,37 und in Versuch 3 (V3) 0,61 Signale im Schweifbereich (Werte in Spalte „Signale/Schweif“) des Kometen lokalisiert. Dies entspricht im Mittelwert 25% der gesamten Signale. Die *BRCA1*$^{+/-}$ Zelllinie zeigte nach Bestrahlung (Zeitpunkt 0) in zwei der durchgeführten Versuche eine deutliche Erhöhung der Signale im Schweifbereich mit 0,9 und 0,69 Im dritten Versuch steigt die Zahl der Signale im Schweif nicht an. Im Mittel sind 30 % der Signale nach Bestrahlung im Schweifbereich lokalisiert. Es ist in beiden Zelllinien keine Zunahme der Gesamtzahl der Signale zu erkennen, was auf eine Schädigung direkt im Bereich der NF1-Sonde zurückzuführen wäre. Die Gesamtzahl der Signale schwankt um den Wert 2, mit Minimum bei 1,43 und Maximum bei 2,81. Die Zelllinien AG09387 und HCC1937BL zeigen in zwei der drei Versuche eine kontinuierliche Abnahme der Signale im Schweif nach 10 und 20 min Reparaturzeit (Zeitpunkt 10 und 20), nachdem zum Zeitpunkt 0 25 bzw. 30% des NF1-Gens geschädigt worden sind.

Tab. 8: FISH-Nachweis der NF1-DNA-Sonde nach 5 Gy γ-Strahlung in zwei der lymphoblastoiden Zelllinien: AG09387 (Kontrollzelllinie), HCC1937BL (*BRCA1*-heterozygote Zelllinie). Es sind die Einzelwerte von 3 Versuchen aufgezeigt.

| Zelllinie | Zeitpunkt | Anzahl Kometen | Signale / Kopf [a] | Signale / Schweif [a] | Signale Gesamt [a] |
|---|---|---|---|---|---|
| V1 | | | | | |
| **AG09387** | unbehandelt | 45 | 1,75 | 0,30 | 2,05 |
| | 0 | * | | | |
| | 10 | 59 | 1,58 | 0,83 | 2,41 |
| | 20 | 50 | 1,70 | 0,54 | 2,24 |
| **HCC1937BL** | unbehandelt | 65 | 1,92 | 0,00 | 1,92 |
| | 0 | 60 | 1,50 | 0,90 | 2,40 |
| | 10 | 50 | 1,42 | 0,34 | 1,76 |
| | 20 | 27 | 2,22 | 0,00 | 2,22 |
| V2 | | | | | |
| **AG09387** | unbehandelt | 24 | 1,96 | 0,04 | 2,00 |
| | 0 | 49 | 1,84 | 0,37 | 2,20 |
| | 10 | 52 | 1,63 | 0,58 | 2,21 |
| | 20 | 51 | 1,96 | 0,53 | 2,49 |
| **HCC1937BL** | unbehandelt | 51 | 2,20 | 0,04 | 2,24 |
| | 0 | 51 | 1,59 | 0,69 | 2,27 |
| | 10 | * | | | |
| | 20 | 55 | 2,02 | 0,27 | 2,29 |
| V3 | | | | | |
| **AG09387** | unbehandelt | 39 | 1,72 | 0,15 | 1,87 |
| | 0 | 49 | 1,16 | 0,61 | 1,78 |
| | 10 | 49 | 1,65 | 0,14 | 1,80 |
| | 20 | 47 | 1,83 | 0,13 | 1,96 |
| **HCC1937BL** | unbehandelt | 47 | 2,60 | 0,21 | 2,81 |
| | 0 | 110 | 1,25 | 0,18 | 1,43 |
| | 10 | 48 | 1,67 | 0,33 | 2,00 |
| | 20 | 28 | 1,50 | 0,11 | 1,61 |

[a] ausgedrückt in Mittelwert der Signale pro Komet.

* keine Auswertung möglich aufgrund technischer Schwierigkeiten

In Tab. 9 sind die Resultate der Hybridisierung mit einer p53-Sonde dargestellt. Es wurden hier nur zwei Experimente durchgeführt. Auch hier liegt die Anzahl der Hybridisierungssignale pro Zelle (Signale gesamt) geringfügig höher als 2. Nach Bestrahlung (Zeitpunkt 0) steigt die Anzahl der Signale in beiden untersuchten

Zelllinien nicht an, was darauf hinweist, dass das p53-Gen nicht direkt geschädigt wurde. Betrachtet man die Lokalisation der Signale, so fällt auf, dass auch der Bereich um das Gen herum nicht sehr häufig geschädigt worden ist. In den Kontrollzelllinien konnten zum Zeitpunkt 0 nach Bestrahlung mit 5 Gy γ-Strahlung 0,2 und 0,27 Signalen im Schweif lokalisiert werden, bei den *BRCA1*-heterozygoten Zellen sind direkt nach Bestrahlung in einem Versuch 0,4 der zwei Signale, im anderen Versuch keines der Signale im Schweifbereich lokalisiert. Es sind in beiden Zelllinien somit direkt nach Bestrahlung nur 11% der p53-Sonde als Signale im Schweif zu finden. Eine kontinuierliche Abnahme der Signale ist nur in einem Experiment bei der Kontrollzelllinie AG09387 zu beobachten.

Tab. 9: FISH-Nachweis der p53-DNA-Sonde nach 5 Gy γ-Strahlung in zwei der lymphoblastoiden Zelllinien: AG09387 (Kontrollzelllinie), HCC1937BL (*BRCA1*-heterozygote Zelllinie). Es sind die Einzelwerte von 2 Versuchen aufgezeigt.

| | Zeitpunkt | Anzahl Kometen | Signale / Kopf [a] | Signale / Schweif [a] | Signale Gesamt [a] |
|---|---|---|---|---|---|
| V1 | | | | | |
| **AG09387** | unbehandelt | 50 | 2,14 | 0,14 | 2,28 |
| | 0 | 50 | 1,92 | 0,20 | 2,12 |
| | 10 | 50 | 1,80 | 0,30 | 2,10 |
| | 20 | 53 | 2,04 | 0,25 | 2,28 |
| **HCC1937BL** | unbehandelt | 52 | 2,08 | 0,31 | 2,38 |
| | 0 | 46 | 1,85 | 0,46 | 2,30 |
| | 10 | 53 | 1,60 | 0,70 | 2,30 |
| | 20 | 51 | 2,10 | 0,14 | 2,24 |
| V2 | | | | | |
| **AG09387** | unbehandelt | 50 | 1,92 | 0,00 | 1,92 |
| | 0 | 50 | 1,76 | 0,27 | 2,03 |
| | 10 | 50 | 1,86 | 0,14 | 2,00 |
| | 20 | 53 | 1,70 | 0,10 | 1,80 |
| **HCC1937BL** | unbehandelt | 52 | 1,93 | 0,00 | 1,93 |
| | 0 | 46 | 1,25 | 0,00 | 1,25 |
| | 10 | 53 | 2,17 | 0,17 | 2,33 |
| | 20 | 51 | 1,96 | 0,02 | 1,98 |

[a] ausgedrückt in Mittelwert der Signale pro Komet.

In der folgenden Abbildung (Abb. 46) wurde die Reparatur des gesamten Genoms mit der Reparatur der beiden spezifischen Genregionen (NF1, p53) verglichen. Zur Bestimmung der globalen Reparatur wurde auch hier der Parameter Tailintensität

verwendet, da so ein besserer Vergleich mit der genregionspezifischen Reparatur möglich ist. In beiden Zelllinien wird der globale DNA-Schaden während eines Zeitraums von 20 min nahezu vollständig eliminiert. Zum Zeitpunkt der Schadenssetzung sind etwa 25 % der DNA in den Kontrollzelllinien und etwa 20% der DNA in der *BRCA1*-heterozygoten Zelllinien geschädigt. Betrachtet man die Hybridisierungssignale der NF1-Region (Abb. 46A und C), so zeigt sich, dass hier direkt nach Bestrahlung in beiden Zelllinien 25% dieser Region geschädigt worden sind. Dies bedeutet, dass diese Region in gleichem Maße geschädigt wurde, wie die restliche DNA. Bei Betrachtung der Reparatur ist zu sehen, dass in der Kontrollzelllinie AG09387 die Anzahl der NF1-Signale im Schweif nach 20 min nur in sehr geringem Maße abnimmt. Zusätzlich ist die Variabilität der drei Versuche recht hoch. Die *BRCA1*$^{+/-}$-Zelllinie HCC1937BL zeigt eine deutlichere Verringerung der Signale in einem Zeitverlauf von 20 min.

Werden die LCL nach Bestrahlung mit 5 Gy mit einer p53-Sonde hybridisiert (Abb. 46B und D), so sind in beiden Zelllinien nur 10 % der DNA dieses Genbereiches geschädigt. Verglichen zu einer globalen Schädigung von 25 bzw. 20% in den AG09387-Zellen und HCC1937BL-Zellen scheint die p53-Region daher weitaus weniger oft betroffen zu sein, als die übrigen Bereiche des Genoms. Dieser geringfügige Schaden wird in den Kontrollzellen in den ersten 20 min nach Schadenssetzung nicht repariert (Abb. 46B). Die HCC1937BL zeigen nach 10 min eine leichte Erhöhung der Signale, die dann nach 20 min auf die Hälfte des Ausgangswertes fallen (Abb. 46D). Die Variabilität der Ergebnisse beider Zelllinien ist recht hoch, was auch an den großen Fehlerbalken erkennbar ist.

Es ist zu erkennen, dass der Bereich des p53-Gens weniger oft geschädigt wurde, als die Region des NF1-Gens. Im Bereich des NF1-Gens wurden in gleichem Maße DNA-Schäden gesetzt wie in der übrigen Gesamt-DNA. Bei Betrachtung der genregionspezifischen Reparaturkapazität der Zelllinien wird ein deutlicher Schadensrückgang nur im NF1-Gen der Zelllinie HCC1937BL beobachtet. Anhand der bisherigen Resultate sind keine Unterschiede zwischen den beiden untersuchten Zelllinien erkennbar.

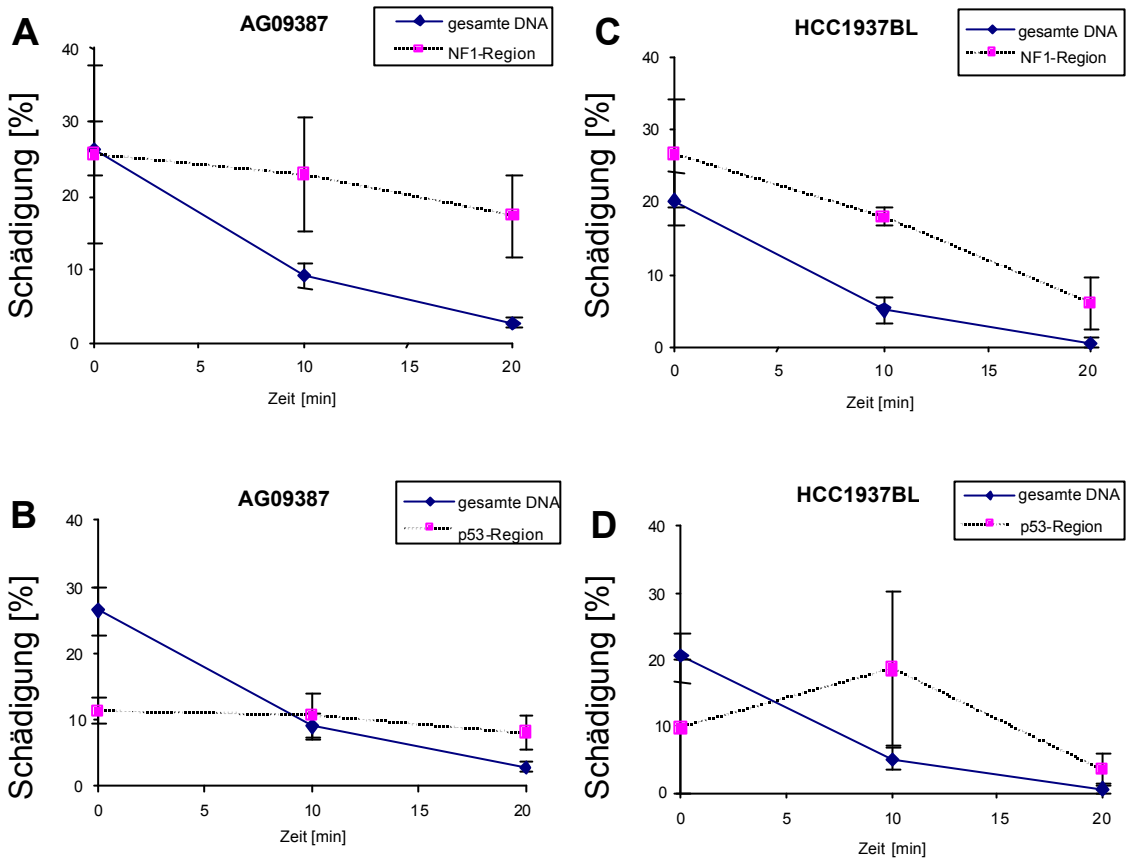



Abb. 46: Vergleich der Reparatur der gesamten DNA-Schäden mit der Reparatur der NF1- und p53-Genregion in einer Kontrollzelllinie (AG09387) (A, B) und in einer *BRCA1*-heterozygoten Zelllinien (HCC1937BL) (C,D). Mittelwerte aus drei (A,C)/zwei (B,D) unabhängigen Versuchen ± SEM.

### 3.2.7 Nachweis von Mutagensensitivität mittels der Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE)

Mit der PFGE wurde die Induktion wie auch die Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen nach γ-Strahlung in den lymphoblastoiden Zelllinien untersucht. Die Zellen wurden in Agaroseblöckchen bestrahlt und danach in ein Gel eingegossen. Durch Anlegen eines elektrischen Feldes mit Wechselstrom kann die geschädigte DNA zur Anode wandern. Der Grad der DNA-Schädigung ist an der Fluoreszenzintensität der zweiten Bande, im folgenden Pseudobande genannt, zu erkennen. Die Fluoreszensintensität kann nach Anfärben der DNA und photographieren des Gels mit Hilfe eines Bildanalysesystems bestimmt werden. In Abb. 47 ist exemplarisch ein Gel einer PFGE dargestellt. Die erste Reihe zeigt eine

Dosis-Effekt-Kurve, wobei die Zellen mit Dosen von 5 bis 50 Gy bestrahlt wurden (Abb. 47A). Es ist eine Verstärkung der Fluoreszenzintensität der Pseudobande mit zunehmender Strahlung zu erkennen. Nach Bestrahlung mit 40 Gy wurde die Reparatur dieser Schäden über einen Zeitraum von 6 h beobachtet (Abb. 47B). Parallel zu einer bestrahlten Zellprobe wurden unbehandelte Zellen ebenfalls 6 h lang beobachtet, um spontane Schäden zu erkennen (Abb. 47C). Die Intensität dieser Bande wurde von den Reparaturwerten abgezogen, um die tatsächliche Reparatur zu erhalten.

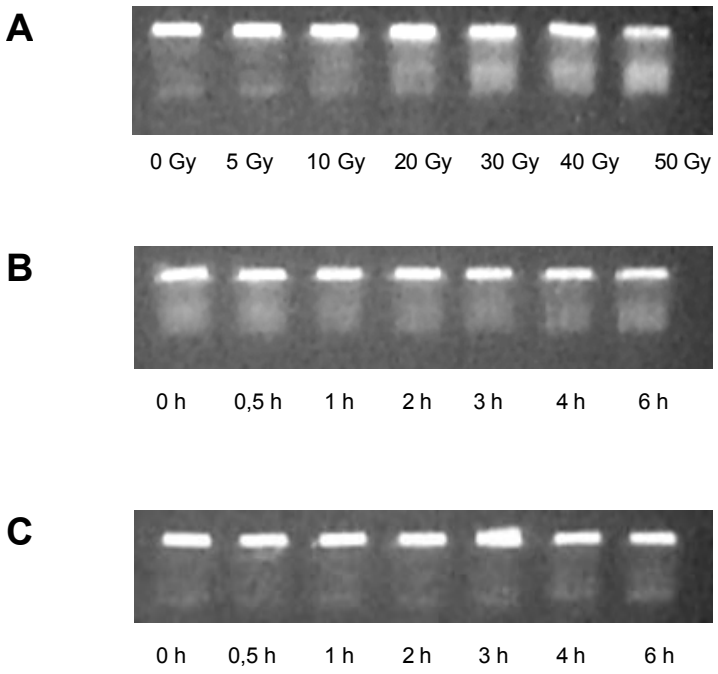



Abb. 47: Induktion von Doppelstrangbrüchen durch verschiedene Strahlendosen (A), sowie Reparatur nach 40 Gy Bestrahlung (B) und Kontrollwert (C) zu verschiedenen Zeiten. Exemplarische Darstellung eines Experiments der Kontrollzelllinie AG09387.

In folgendem Diagramm ist die bereits exemplarisch gezeigte Dosis-Effekt Beziehung aller LCL dargestellt (Abb. 48). Mit zunehmender Strahlen-Dosis ist eine Zunahme der Fluoreszensintensität der Pseudobande zu sehen, was eine Zunahme der DNA-Schäden anzeigt. Systematische Unterschiede zwischen Kontrollzelllinien und *BRCA1*$^{+/-}$-Zelllinien sind nicht zu erkennen. Im Mittelwert liegen die DNA-Effekte der Kontroll-LCL etwas höher als die der *BRCA1*-LCL (Abb. 48B), jedoch kann dieser Unterschied nicht auf das Vorhandensein einer *BRCA1*-Mutation zurückgeführt werden, wie in Abb. 48A an der Variabilität zwischen den Zelllinien zu erkennen ist.

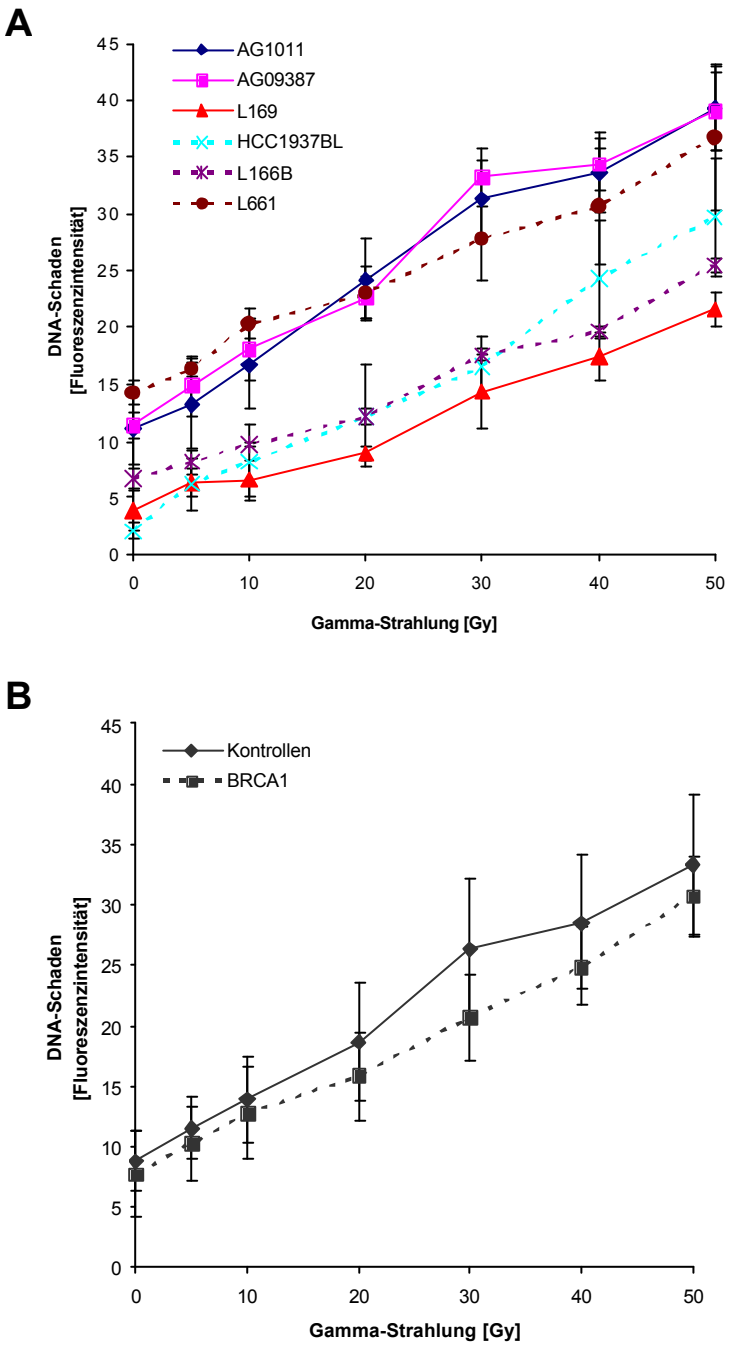



Abb. 48: Effekt von Strahlung auf die Induktion von Doppelstrangbrüchen. In (A) sind die Einzelwerte der sechs LCL dargestellt, in (B) sind die Mittelwerte der Kontrollzelllinien und der *BRCA1*-heterozygoten Zellen dargestellt. Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen ± SEM.

Die Reparatur der DNA-Doppelstrangbrüche ist in Abb. 49 dargestellt. Alle LCL zeigen im Verlauf von 6 h eine Reduktion der DNA-Schäden, erkennbar an verringerter Fluoreszenzintensität der Pseudobande. Bei Darstellung der Mittelwerte

von Kontrollzelllinien und der *BRCA1*-heterozygoten Zelllinien ist eine schnellere Abnahme der DNA-Schäden bei den *BRCA1*$^{+/-}$-LCL zu sehen (Abb. 49B). Betrachtet man jedoch die Einzelwerte der sechs verschiedenen LCL (Abb. 49A), so ist zu erkennen, dass es sich nicht um einen systematischen Unterschied handelt, da nicht alle *BRCA1*-heterozygoten Zelllinien schneller reparieren, als die Kontrollzellen. Während der ersten 3 h nehmen bei den beiden Kontrollzelllinien AG1011 und AG09387 die DNA-Schäden nur langsam ab. Die vier anderen Zelllinien zeigen im Zeitraum von 2 h eine Eliminierung der Schäden um etwa die Hälfte. Bei drei dieser LCL (L169, HCC1937BL und L166B) verringern sich die DNA-Schäden recht kontinuierlich, die Zelllinie L661 jedoch zeigt nach 3 h recht hohe Werte. Dieser Anstieg ist der hohen Schwankungsbreite der drei durchgeführten Experimente begründet. Die hohe Variabilität ist in den restlichen Zelllinien ebenfalls ein Problem, was auch durch die großen Fehlerbalken angedeutet ist. Mit der Methode der PFGE konnten keine systematischen Unterschiede in Induktion und Reparatur von DNA-DSB zwischen Zellen mit und ohne *BRCA1*-Mutation festgestellt werden.

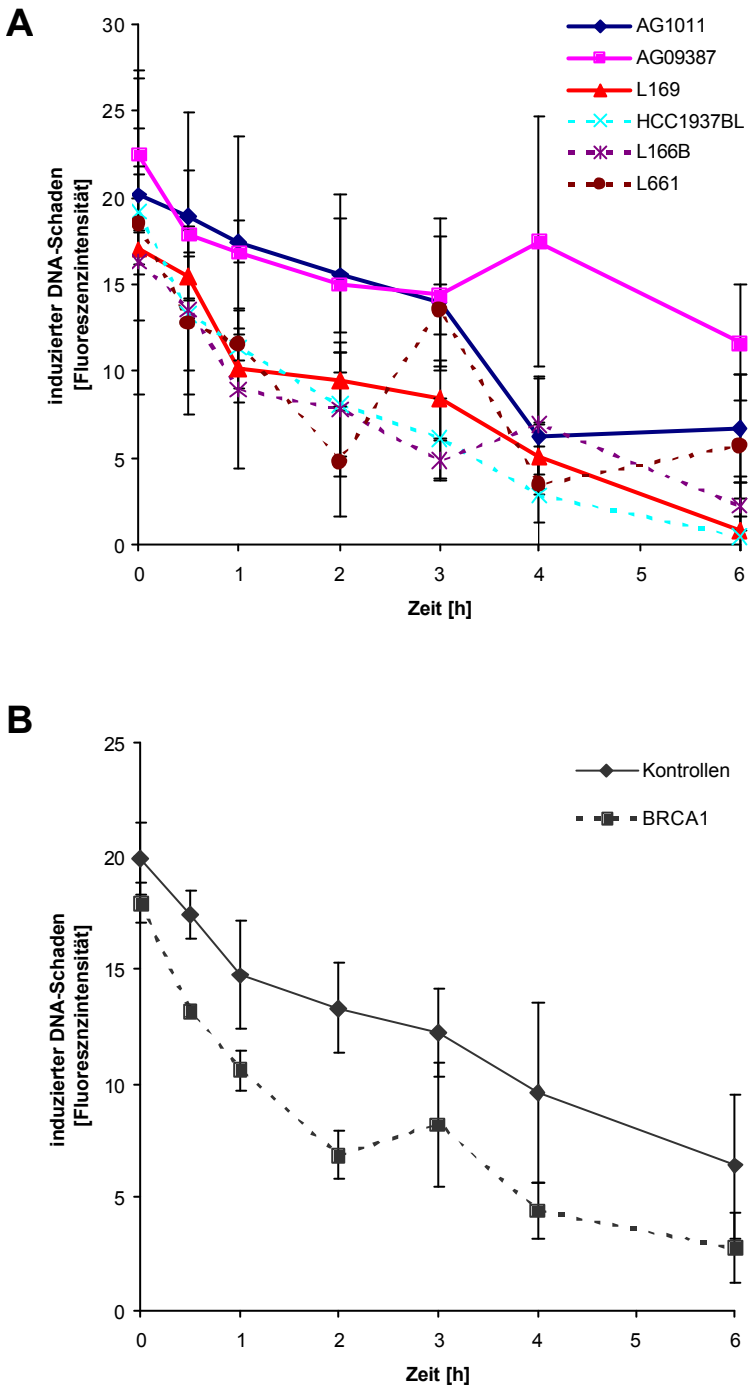



Abb. 49: Reparatur nach 40 Gy über einen Zeitraum von 6 h. In (A) sind die Einzelwerte der sechs LCL dargestellt, in (B) sind die Mittelwerte der Kontrollzelllinien und der *BRCA1*-heterozygoten Zellen dargestellt. Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen ± SEM.

### 3.2.8 Bestimmung der *BRCA1*-Expression mit dem Lightcycler

Die Expression von *BRCA1* wurde mittels quantitativer Realtime-PCR bestimmt. Es wurde dafür der Lightcycler verwendet, mit welchem die relative Menge an amplifizierter DNA direkt aus der Menge an fluoreszierendem SYBR Green I bestimmt werden konnte. Eine relative Expressionsbestimmung war in diesem Falle ausreichend, da überprüft werden sollte, ob in den sechs bisher untersuchten Zelllinien nach Bestrahlung mit γ-Strahlung Unterschiede in der *BRCA1*-Expression auftreten. Die Menge an *BRCA1*-mRNA wurde relativ zu der Menge an mRNA des Haushaltsgen Porphobilinogendesaminase (PBGD) bestimmt. Dieses Gen wurde ausgewählt, da keine Pseudogene bekannt sind und es ebenfalls wie *BRCA1* in recht niedrigen Mengen exprimiert wird. Die zuvor ebenfalls getesteten Haushaltsgene, die als Referenzgene zur Auswahl standen, wie ß-Aktin und GAPDH wurden in lymphoblastoiden Zellen in sehr großer Menge exprimiert, weswegen sie sich als Quantifizierungsstandard ungeeignet erwiesen. Nach der Wahl des Quantifizierungsstandards PBGD wurde die Realtime-PCR für die Amplifikation von *BRCA1* und *PBGD* soweit optimiert, dass nur das gewünschte spezifische PCR-Produkt vervielfältigt wurde.

#### 3.2.8.1 Erstellung von Standardkurven für *BRCA1* und *PBGD*

Um eine Quantifizierung des *BRCA1*-Gens vornehmen zu können, musste für beide Gene eine Standardkurve erstellt werden. Diese wurde jeweils mit einer Verdünnungsreihe aus dem cDNA-Pool (Mischung aus cDNA aller LCL) erstellt. In Abb. 50 ist der Anstieg der Fluoreszenz der verschiedenen DNA-Konzentrationen zu sehen. Ist die DNA-Konzentration gering, so wird ein Fluoreszenzanstieg erst in einem späten Amplifikationszyklus detektiert. Es wurden hier DNA-Konzentrationen in einem Bereich von 1 bis 1:100 eingesetzt.

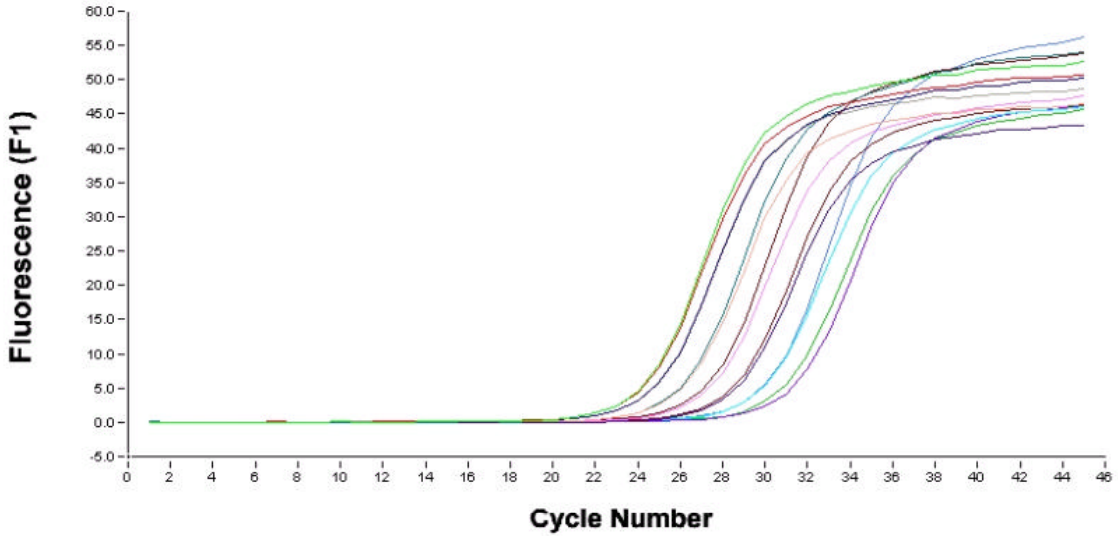



Abb. 50: Anstieg der Fluoreszenz in verschiedenen Realtime-PCR-Ansätzen mit unterschiedlicher DNA-Konzentration. Bei hohen DNA-Konzentrationen erfolgt ein Anstieg in einem frühen Amplifikationszyklus, bei niedrigem DNA-Gehalt ist ein Anstieg erst in einem späten Amplifikationszyklus zu detektieren.

Die Standardkurven für *BRCA1* und *PBGD* sind in Abb. 51 dargestellt. Die Steigung betrug im Falle des *BRCA1*-Gens 3,391 (Abb. 51A), die Steigung der Standardkurve von PBDG lag bei 3,395 (Abb. 51B). Beide Steigungen unterscheiden sich nur um 0,004, was eine optimale Voraussetzung für die Quantifizierung darstellt. Aus den Regressionsgeraden der beiden Standardkurven könne die Konzentrationen von *BRCA1* und *PBGD* berechnet werden, wobei y dem Crossingpoint (CP) und x der Konzentration entspricht.

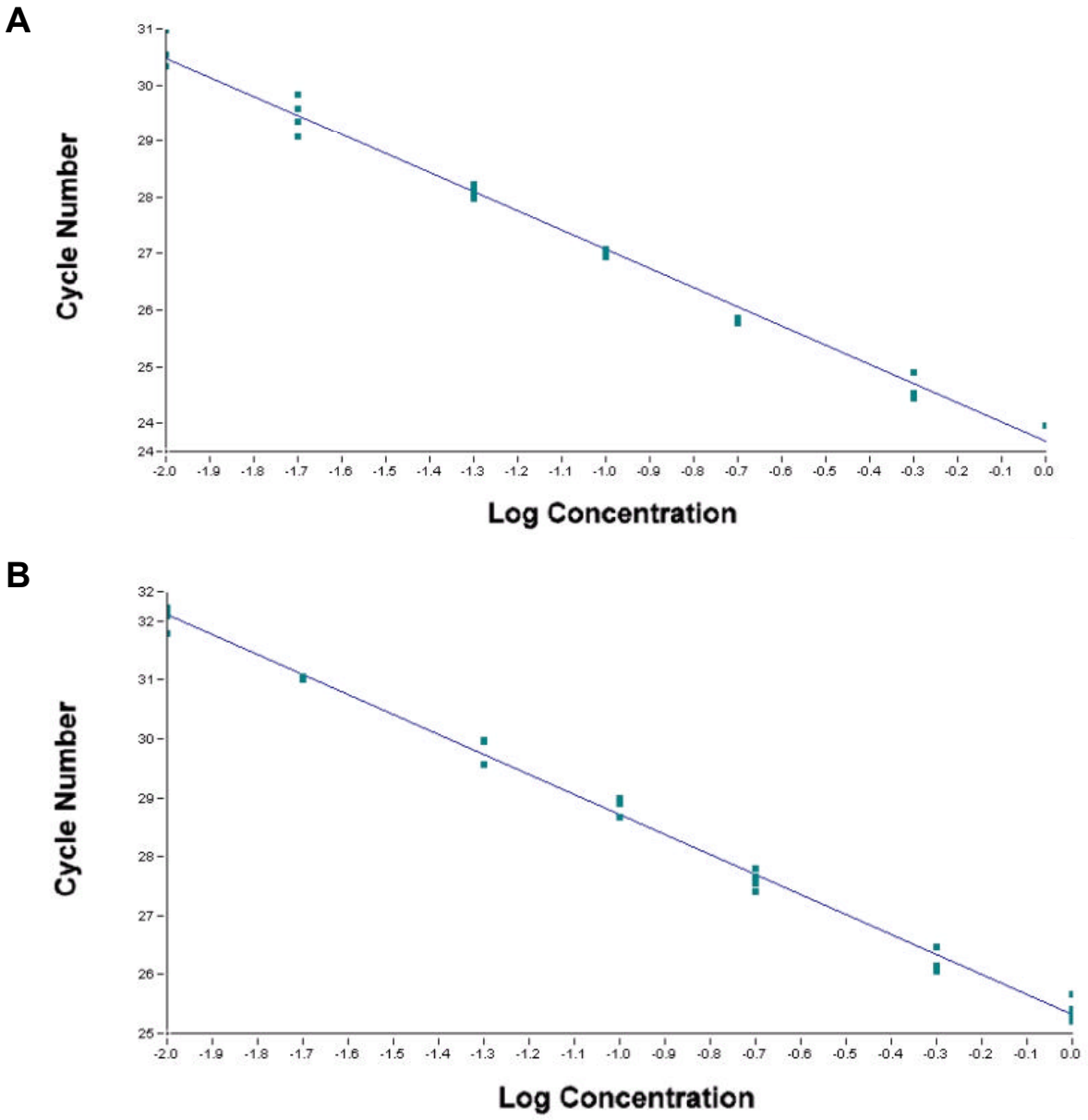



Abb. 51: Standardkurven der Genamplifikationsprodukte *BRCA1*(A) und *PBGD* (B). Es wurden sieben verschiedene DNA-Konzentrationen in vierfacher Ausführung quantifiziert.

Um die Spezifität der PCR-Reaktion zu überprüfen kann jeweils eine Schmelzkurvenanalyse mitgefahren werden. Dabei wird die Temperatur des PCR-Ansatzes schrittweise auf 95°C erhöht. Je nach Länge und GC-Gehalt hat jedes DNA-Fragment einen spezifischen Schmelzpunkt, welcher während der Realtime-PCR gemessen werden kann. In Abb. 52 ist die Schmelzkurve des *BRCA1*-Gens dargestellt. In Abb. 52A ist der Abfall der Fluoreszenz nach Erreichen einer

Temperatur von 88°C zu sehen, in Abb. 52B ist die zweite Ableitung der Schmelzkurve dargestellt, in welcher der Schmelzpunkt als Gipfel zu erkennen ist.

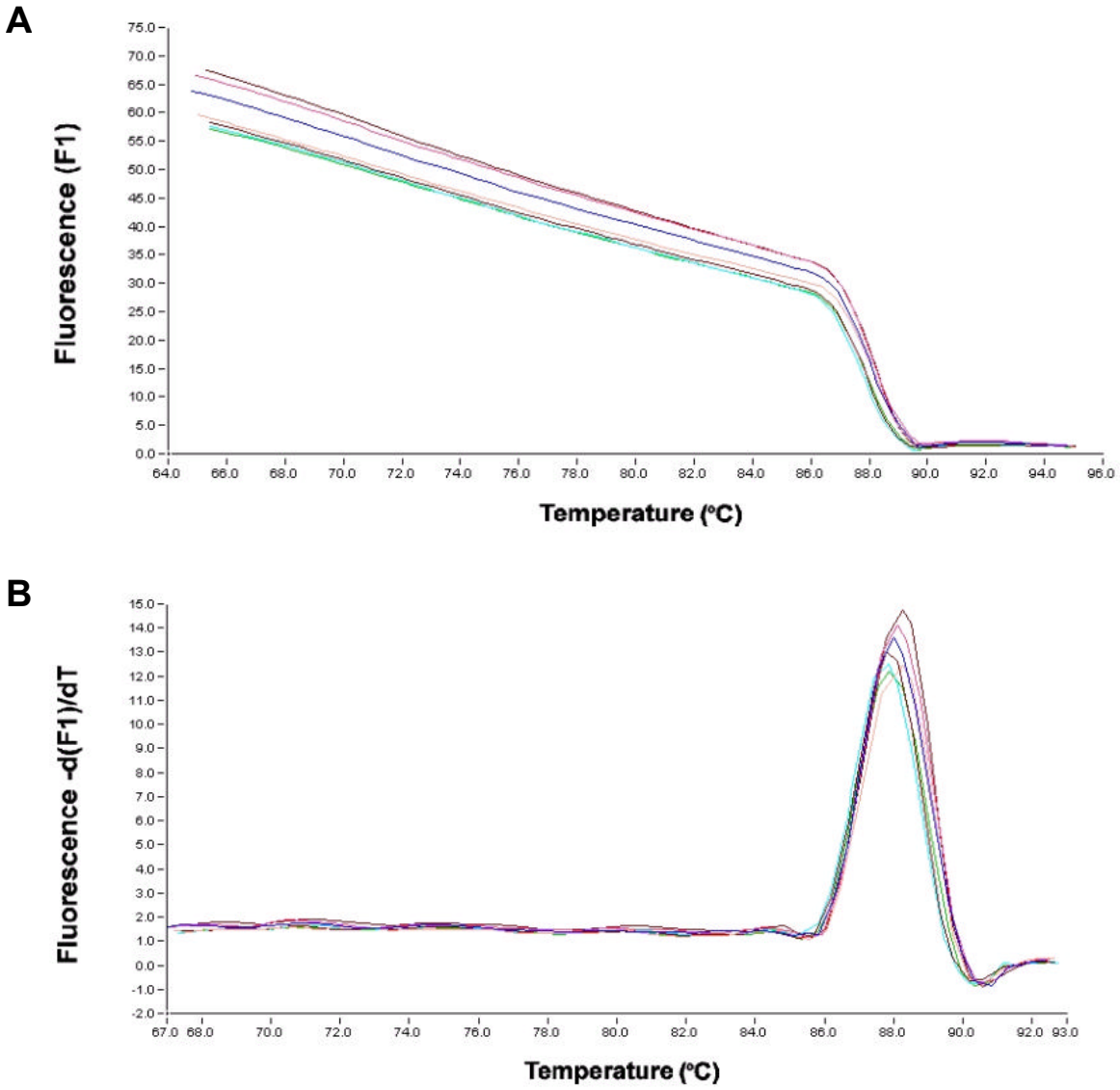



Abb. 52: Darstellung der Schmelzkurvenanalyse des *BRCA1*-Gens. In (A) ist der Abfall der Fluoreszenz bei 88°C zu erkennen, in (B) ist die Ableitung obiger Kurve dargestellt, die Schmelztemperatur kann somit durch Bestimmung des Gipfels abgelesen werden.

### 3.2.8.2 *BRCA1*-Expression nach g-Strahlung

Anhand der erstellten Standardkurven konnte die Menge der *BRCA1*-mRNA der drei *BRCA1*-heterozygoten LCL und der drei Kontrollen bestimmt werden. Als Quantifizierungsstandard diente *PBGD*. Die Expression von *BRCA1* wurde relativ zu der Expression von *PBGD* bestimmt. Mit Hilfe der Schmelzkurvenanalyse konnte

überprüft werden, ob die richtigen Produkte amplifiziert wurden. Da *BRCA1* und *PBGD* in demselben Lightcyclerlauf unter denselben PCR-Bedingungen amplifiziert wurden, sind in der Schmelzkurvenanalyse zwei Gipfel zu erkennen (Abb. 53). Der Gipfel mit Maximum bei 88°C zeigt den Schmelzpunkt des *BRCA1*-Fragments an, den Gipfel mit Maximum bei 90°C erhält man durch Schmelzen des *PBGD*-Fragments.

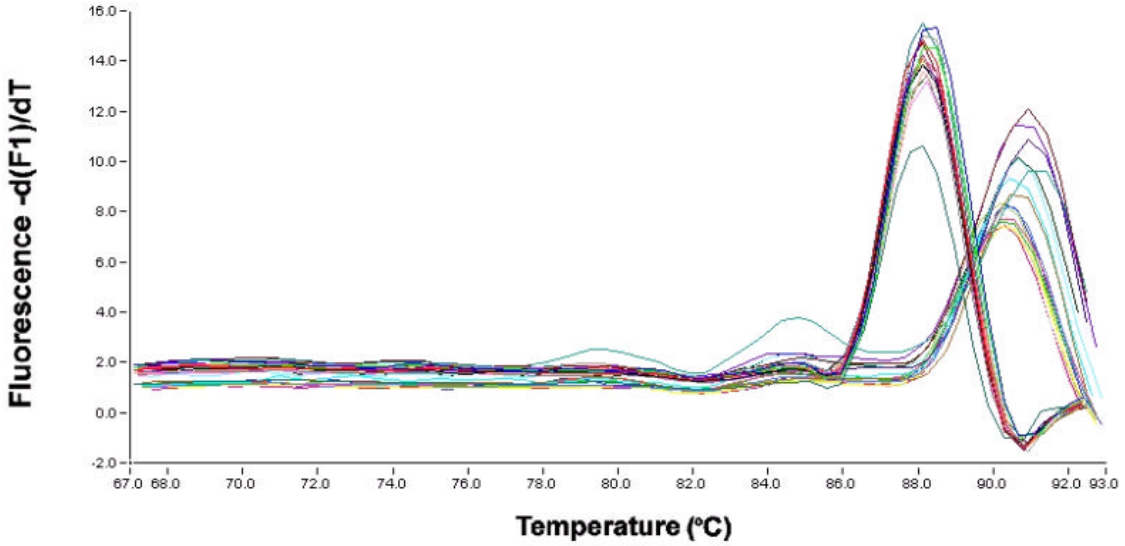



Abb. 53: Schmelzkurvenanalyse aus einem Quantifizierungsexperiment der Zelllinie L169.

Die aus den „Crossingpoints“ errechneten Menge an *BRCA1* in Relation zu der Menge an PBGD in den sechs LCL ist in Abb. 54 graphisch dargestellt. Vor Bestrahlung und zu verschiedenen Zeitpunkten nach Bestrahlung mit 2 Gy (2 h, 8 h und 24 h) wurde aus den sechs Zelllinien RNA isoliert und nach Umschreiben in cDNA in den Lightcycler eingesetzt. Die *BRCA1*-Expression variierte recht stark innerhalb einer Zelllinie wie auch zwischen den verschiedenen Zelllinien. Der Mittelwert der *BRCA1*+/- LCL liegt im Vergleich zu den Kontrollzelllinien etwas niedriger (Abb. 54B), jedoch zeigen die Einzelwerte (Abb. 54A) dass es sich nicht um einen systematischen Unterschied handelt. Acht Stunden nach Bestrahlung zeigt sich bei fünf der sechs LCL eine Reduktion der *BRCA1*-mRNA, jedoch ist dieser Effekt in Kontrollzellen ebenso wie in *BRCA1*-heterozygoten Zellen zu beobachten. In der Zelllinie HCC1937BL ist eine durchgängige Reduktion des mRNA-Gehalts mit zunehmender Zeit nach γ-Strahlung zu erkennen. Aussagen zu *BRCA1*-

mutationsbedingten Expressionsunterschieden in Zellen mit *BRCA1*-Mutation im Vergleich zu Zellen ohne Mutation zeigten sich in diesen Experimenten nicht.

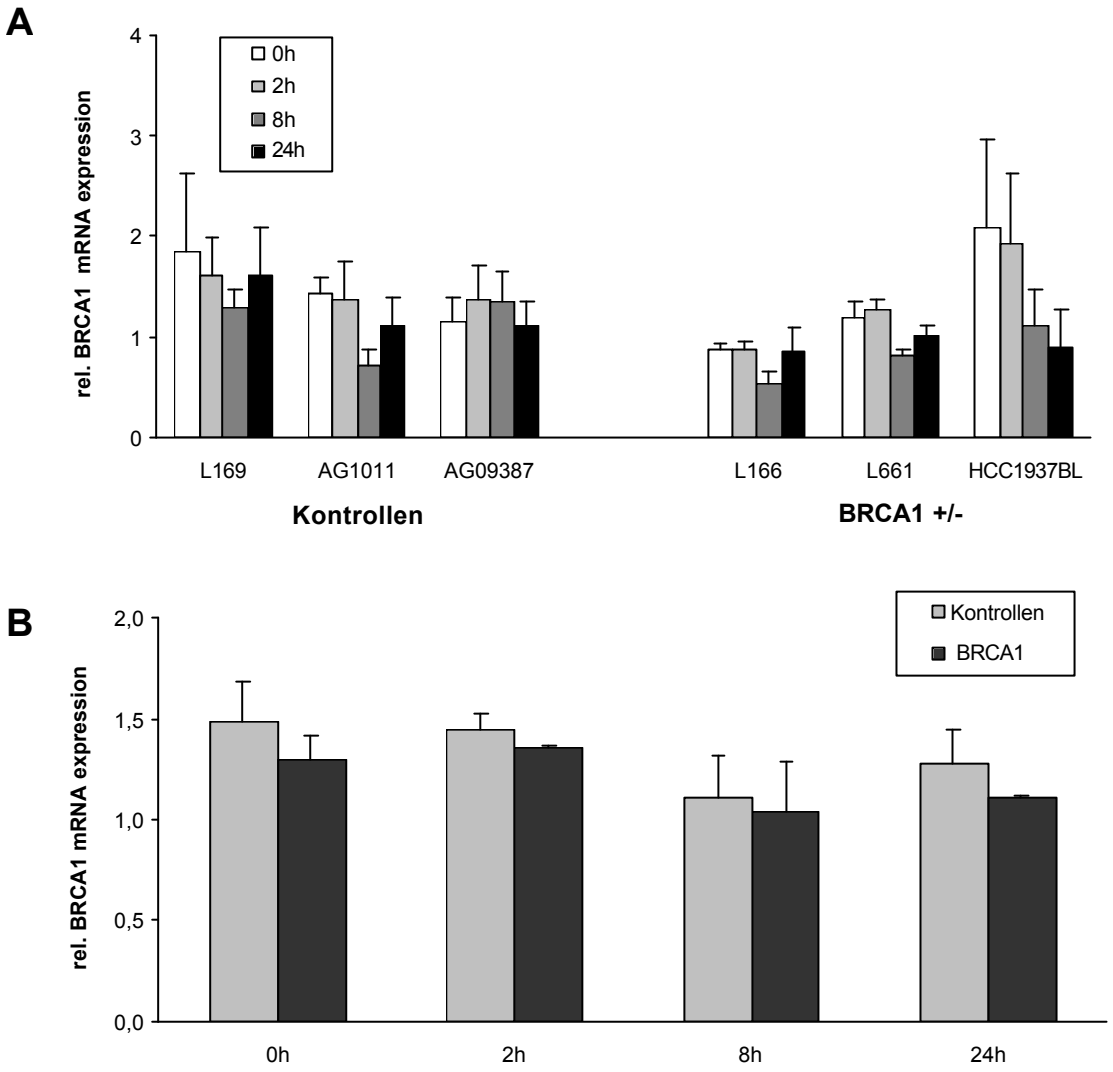



Abb. 54: (A) Relative Expression von *BRCA1*-mRNA der sechs LCL von Kontrollen und von Frauen mit einer *BRCA1*-Mutation zu verschiedenen Zeitpunkten nach γ-Strahlung mit 2 Gy. Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten, ± SEM. (B) Mittelwerte der drei Kontrollzelllinien und der drei *BRCA1*-heterozygoten Zelllinien.

# 4 Diskussion

Um genetische Information ohne Fehler zu übertragen, haben Zellen Mechanismen zum Erhalt der genomischen Stabilität entwickelt. Zellen reagieren auf DNA-Schäden mit einer Aktivierung komplexer Signalwege. Diese bewirken ultimativ einen Zellzyklus-Stopp sowie eine transkriptionelle und post-transkriptionelle Aktivierung von Proteinen, die mit der DNA-Reparatur assoziiert sind. Ist eine Zelle nicht in der Lage auf DNA-Schäden adäquat zu antworten, d. h. Reparaturprozesse oder genetisch kontrollierte Prozesse, die zu einem Absterben der Zelle führen einzuleiten, so resultiert dies in Mutationen, genetischer Instabilität und der Entstehung von Tumoren. Es gibt verschiedene Arten von DNA-Schäden, die auf verschiedene Weise repariert werden, wobei DNA-Doppelstrangbrüchen (DSB) eine besondere Rolle zukommt. DNA-DSB werden durch ionisierende Strahlung, chemotherapeutische Medikamente, endogene reaktive Spezies und mechanischen Stress verursacht, können jedoch auch indirekt aus Einzelstrangbrüchen bei der Replikation hervorgehen. DNA-DSB werden für die Tumorentstehung als besonders kritisch betrachtet, da die Reparatur dieses Schadens schwieriger ist als die Elimination anderer Schäden. Im Gegensatz zu DNA-Schäden, die nur einen DNA-Strang betreffen, ist beim DNA-DSB keine ungeschädigte Kopie der genetischen Information vorhanden, die als Matrize während der Reparatur dienen kann. Die Reparatur eines DNA-DSB erfolgt auf zwei Hauptwegen: entweder durch homologe Rekombination (HR) oder durch Non-homologous-end-joinig (NHEJ). Ist von der geschädigten DNA-Sequenz eine zweite identische DNA-Kopie verfügbar, so wie es nach Replikation der DNA in der S- oder $G_2$-Phase, der Fall ist, so wird die HR bevorzugt, anderenfalls wird auf das NHEJ zurückgegriffen, wobei in adulten differenzierten Zellen zumeist der Weg des NHEJ verwendet wird (Übersicht in Khanna und Jackson, 2001; Hoejmakers, 2001). Die beiden Brustkrebssuszeptibilitätsgene *BRCA1* und *BRCA2* sind an einer Vielzahl zellulärer Prozesse beteiligt. Eine zentrale Funktion scheint jedoch eine Beteiligung an der DNA-DSB Reparatur wie auch an der transkriptionsgekoppelten Reparatur darzustellen (Deng and Brodie, 2000; Scully and Livingston, 2000; Welcsh et al., 2000; Venkitaraman, 2001). Die Kolokalisation von BRCA1 und BRCA2 mit RAD51 (Scully et al., 1997; Wong et al., 1997; Chen et al., 1998) sprechen für eine

Involvierung der BRCA-Proteine in den Mechanismus der HR. Die Beeinträchtigung der HR konnte auch in brca1-defizienten embryonalen Stammzellen der Maus beobachtet werden (Moynahan et al., 1999).

## 4.1 Bedeutung der BRCA-Mutationen für chromosomale Strahlensensitivität

Es wurde in verschiedenen Arbeiten gezeigt, dass ein Teil der Brustkrebspatienten eine erhöhte chromosomale Strahlensensitivität aufweist. In verschiedenen Studien konnten etwa 40% der Frauen mit Brustkrebs als sensitiv gegenüber Strahlung klassifiziert werden (Scott et al., 1998; 1999; Baeyens et al., 2002). Die Untersuchungen dazu wurden mit dem $G_2$-Chromosomenaberrationstest und dem MNT durchgeführt. Diese Arbeiten beschränkten sich auf die Analyse von Brustkrebspatientinnen, ohne möglicherweise vorliegende genetische Prädispositionen zu berücksichtigen. In meiner Arbeit wurde nun untersucht, ob die verstärkte Mutagensensitivität von Brustkrebspatienten mit einer Mutation in einem der beiden Brustkrebssuszeptibilitätsgene *BRCA1* oder *BRCA2* zusammenhängen kann. Die Untersuchung von 24 Frauen mit *BRCA1*- und 9 Frauen mit *BRCA2*-Mutation im Vergleich zu einem Kontrollkollektiv von 22 gesunden Frauen zeigte im MNT bei Betrachtung des Mittelwertes der verschiedenen Gruppen einen signifikanten Unterschied der Frauen mit BRCA-Mutation nach Bestrahlung. Bei Verwendung einer Sensitivitätsgrenze, welche bei dem Mittelwert der Kontrollgruppe plus zweimal der Standardabweichung (MW+2SD) festgelegt wurde (399 MN pro 1000 BNC), können 48% der Frauen als sensitiv bezeichnet werden. Werden nur Frauen mit *BRCA1*-Mutation berücksichtigt, so reagierten 42% davon sensitiv, verglichen mit 5% der Kontrollen. Diese Ergebnisse bestätigen die Befunde von Rothfuss et al. (2000), der ebenfalls herausfand, dass Frauen mit *BRCA1*-Mutation auf eine Behandlung mit ionisierender Strahlung im MNT mit erhöhter Sensitivität reagieren. 58% der *BRCA1*-Patienten wurden nach Behandlung der Zellen mit ionisierender Strahlung als sensitiv klassifiziert. In einer Antwort auf die Studie von Rothfuss et al. (2000) konnten Baria et al. (2001a) jedoch keine erhöhte Sensitivität von gesunden *BRCA1*-mutationstragenden Frauen feststellen. Es wurden hier 9 gesunde Frauen mit *BRCA1*-Mutation mit 5 Kontrollen im $G_2$-Chromosomenaberrationstest verglichen. Die Autoren folgerten in Anbetracht dieser

Ergebnisse, dass mit diesen beiden Testverfahren, dem MNT und dem $G_2$-Assay, verschiedene Arten von Mutagensensitivität detektiert werden können. Baeyens et al. (2002) untersuchten in einer vergleichenden Studie 11 Frauen mit einer BRCA-Mutation mit dem $G_2$-Assay und dem MNT. Nur Präparate von 9 der Frauen konnten aufgrund präparationsbedingter Probleme im MNT ausgewertet werden. Lediglich 4 der untersuchten Frauen trugen eine Mutation im *BRCA1*-Gen, wovon nur 2 in die Datenbasis des MNT einflossen. Im $G_2$-Assay waren 25% dieser Frauen sensitiv, im MNT bei Bestrahlung mit hoher Dosisrate (HDR) 50% und bei niedriger Dosisrate (LDR) 100%. Es wird davon ausgegangen, dass Bestrahlung mit LDR eine bessere Diskriminierung zwischen sensitiven und insensitiven Patienten erlaubt, da den Zellen mehr Zeit für Reparaturprozesse gegeben wird. Die chromosomale Sensitivität von Frauen mit *BRCA1*-Mutation ist mit dem MNT besser detektierbar als mit dem $G_2$-Chromosomenaberrationstest, was dafür spricht, dass das BRCA1-Protein in einen Schutz- oder Reparaturmechanismus involviert ist, der bei Zellen in $G_0$, nicht jedoch bei Zellen in der $G_2$-Phase zum Tragen kommt. Da durch Mutationen in *BRCA1* oder *BRCA2* nicht die Strahlensensitivität aller Brustkrebspatienten erklärt werden kann, kann die Existenz von weiteren Genen mit geringer Penetranz vermutet werden. Diese Vermutung wird dadurch gestützt, dass die meisten der etablierten etiologischen Faktoren für Brustkrebs eine Vielzahl verschiedener DNA-schädigende Substanzen generieren, wie reaktive Sauerstoffspezies, große DNA-Addukte, oxidierte DNA-Basen und Strangbrüche, und daher höchstwahrscheinlich verschiedene DNA-Reparatur-Genotypen und -Phänotypen als Brustkrebs-suszeptibilitätsmarker dienen. Es kann daher ein polygenisches Modell für die Brusttumorigenese angenommen werden (Hu et al., 2002) und verschiedene andere Gene mit geringer Penetranz außer den beiden bekannten Genen *BRCA1* und *BRCA2* könnten für die beobachtete Strahlensensitivität in familiärem Brustkrebs verantwortlich sein.

Betrachtet man in der vorliegenden Studie die Lymphozyten von Frauen mit *BRCA2*-Mutation im Vergleich zu Lymphozyten mit *BRCA1*-Mutation, so sind keine grundlegenden Unterschiede hinsichtlich der Mutagensensitivität zu erkennen. Sowohl nach ionisierender Strahlung wie auch nach Behandlung mit $H_2O_2$ wurde bei Frauen mit *BRCA1*- und *BRCA2*-Mutationen eine erhöhte Sensitivität detektiert. Die mittlere MN-Induktion nach Gamma-Strahlung lag bei *BRCA1*- und *BRCA2*-Frauen

(428 bzw. 465 MN / 1000 BNC) signifikant höher als bei der Kontrollgruppe (283 MN / 1000 BNC). Nach $H_2O_2$-Behandlung wurden insgesamt deutlich weniger Mikronuklei als nach Bestrahlung induziert, jedoch zeigte der direkte Vergleich von Lymphozyten mit *BRCA1*- und *BRCA2*-Mutation mit einer parallelen Kontrolle immer eine deutliche Sensitivität der Zellen mit Mutation. Da sowohl eine *BRCA1*-Mutation wie auch eine *BRCA2*-Mutation eine höhere MN-Induktion zur Folge haben, deutet dies darauf hin, dass in diesen Zellen eine Defizienz in der Reparatur oxidativer Schäden vorliegt. Für Zellen mit *BRCA1*-Mutation wurde dies bereits bei Rothfuss et al. (2000) beschrieben. Dem *BRCA2*-Gen allerdings wurde bisher lediglich eine Funktion in der DNA-DSB-Reparatur zugeschrieben. Die hier erhobenen Daten zeigen jedoch, dass *BRCA2* auch in die Prozessierung oxidativer Schäden involviert ist, da $H_2O_2$ im Gegensatz zu ionisierender Strahlung keine DSB induziert (Ward et al., 1985). Eine Unterscheidung von *BRCA1*- und *BRCA2*-Mutationsträgern ist demnach weder mit ionisierender Strahlung, noch mit $H_2O_2$ möglich. Eine Assoziation zwischen Strahlensensitivität und *BRCA1*- und *BRCA2*-Mutation konnte ebenfalls in einer Studie mit Lymphozyten und Fibroblasten bestätigt werden (Buchholz et al., 2002). Die Lymphozyten wurden im $G_2$-Chromosomenaberrationstest untersucht, während bei Untersuchung der Fibroblasten der Anteil an überlebenden Zellen nach 2 Gy $\gamma$-Strahlung bestimmt wurde. Mit beiden Endpunkten konnte eine deutliche Sensitivität der Zellen mit Mutation festgestellt werden, ein Unterschied zwischen Zellen mit *BRCA1*-(n=6) und *BRCA2*-(n=2) Mutation wurde nicht detektiert. Meine Resultate wie auch die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass BRCA2-heterozygote Lymphozyten dieselbe Mutagensensitivität wie Zellen mit *BRCA1*-Mutation gegenüber ionisierender Strahlung aufweisen. Interessanterweise ist auch BRCA2 in die Reparatur oxidativer Schäden involviert. Eine Unterscheidung zwischen Zellen mit *BRCA1*- und *BRCA2*-Mutation mit dem MNT ist daher nicht möglich.

Werden Experimente für Zellen mit *BRCA1*- und *BRCA2*-Mutation zusammengefasst, was nach eben genannten Befunden als legitim erscheint, so zeigten sich in meinen Untersuchungen 61% der mutationstragenden Frauen im MNT mit HDR-Bestrahlung als sensitiv. Aus der Gruppe der Kontrollen wurden lediglich 5% der Frauen als sensitiv eingestuft. Als Sensitivitätskriterium wurde hierbei die 90ste Percentile gewählt, da dies einen direkten Vergleich mit Baeyens et al. (2002) ermöglicht, in

deren Arbeit die Sensitivität von Zellen mit BRCA-Mutation im $G_2$-Chromosomenaberrationstest und im MNT analysiert wurde. In Untersuchungen im $G_2$-Assay konnten 27% der Frauen, im MNT bei Bestrahlung mit HDR-Strahlung 33% und bei Bestrahlung mit LDR 78% der Frauen als sensitiv eingestuft werden. Die Korrelation zwischen Sensitivität im $G_2$-Assay und Sensitivität im $G_0$-MNT bei Verwendung gleicher Blutproben ist, wie schon bei Baria et al. (2001a) festgestellt wurde, sehr schwach und bestätigt die Vermutung, dass in der $G_0$- und in der $G_2$-Phase verschiedene DNA-Schaden-prozessierende Mechanismen zum Einsatz kommen (Scott et al., 1999). Wurden die Zellen mit LDR bestrahlt (Baeyens et al., 2002), so zeigte sich eine gute Übereinstimmung mit meinen Ergebnissen. 78% der Frauen wurden bei Baeyens et al. (2002) mit dieser Methode als sensitiv klassifiziert, verglichen mit 61% der Frauen in hier erhobenen Daten. In hier durchgeführten Experimenten wurden die Zellen allerdings mit HDR bestrahlt; vergleichende Untersuchungen mit LDR-Strahlung waren bisher nicht möglich. Scott et al. (1998) postulierte eine bessere Diskriminierung strahlensensitiver Brustkrebspatienten mit HDR Bestrahlung, wonach sich 33% der Brustkrebspatienten als sensitiv (>MW+2SD der Kontrollgruppe) erwiesen im Gegensatz zu 15 % der Patienten bei Bestrahlung mit LDR. Bei Wahl eines anderen Sensitivitätskriteriums als der 90sten Percentile vergrößert sich der Anteil chromosomal sensitiver Frauen mit BRCA-Mutation. Da die Lymphozyten von Frauen mit Mutation immer parallel mit Lymphozyten gesunder Frauen untersucht wurden, kann ein direkter Vergleich durchgeführt werden, wie bereits von Rothfuss et al. (2000) vorgeschlagen wurde. Mit dieser Methode der Sensitivitätsbestimmung kann eine mögliche Variabilität des Tests ausgeglichen werden. Es wird hierzu die induzierte MN-Frequenz der parallelen Kontrolle von der induzierten MN-Frequenz der Patientin subtrahiert und eine Differenz von mehr als 100 MN wurde in dieser Arbeit willkürlich als Sensitivitätsgrenze gewählt. Es können so 79% der Frauen mit BRCA-Mutation als sensitiv klassifiziert werden, wobei bei Einzelbetrachtung 79% der *BRCA1*-heterozygoten Frauen und 78% der *BRCA2*-heterozygoten Frauen sensitiv reagieren. Um die intraindividuelle Variabilität der einzelnen Probanden zu evaluieren, wurden von 15 *BRCA1*-Mutationsträgern wie auch von 11 Kontrollen Wiederholungexperimente durchgeführt. Es zeigte sich bei 9 der 15 Patientinnen und bei 8 der 11 Kontrollen eine recht gute Reproduzierbarkeit. Da bei einem Teil der Probanden jedoch auch erhebliche Schwankungen in der Höhe der MN-Induktion zu beobachten waren, scheint der direkte Vergleich von

Lymphozyten mit und ohne Mutation am besten geeignet, um Strahlensensitivität zu detektieren. Methodische Faktoren, die den MNT beeinflussen, können so vermieden werden und die Diskriminierung zwischen Frauen mit und ohne Mutation kann durch Reduktion der Variabilität bei den einzelnen Testdurchführungen verbessert werden. Die Verwendung von HDR-Strahlung zeigte sich in diesen Studien geeignet zum Nachweis von chromosomaler Mutagensensitivität.

Die hier vorliegenden Daten zeigen weiter, dass keine ausgeprägte Korrelation zwischen einer spezifischen BRCA-Mutation und der chromosomalen Mutagensensitivität besteht. Unter den Frauen mit *BRCA1*-Mutation finden sich beispielsweise 2 Frauen aus derselben Familie mit gleicher Mutation (IVS5+1), wovon nur eine der Frauen sensitiv auf Strahlung reagiert. Eine andere Mutation (C4302T) tritt in zwei der untersuchten Familien auf. Alle 3 Frauen einer Familie zeigten keine Sensitivität, ungeachtet dessen, ob ein Tumor vorhanden war oder nicht. Die 3 Frauen der zweiten Familie mit identischer Mutation erwiesen sich alle als sensitiv. Dieser Befund spricht gegen einen kausalen Zusammenhang zwischen einem bestimmten BRCA-Genotyp und der ausgeprägten Strahlensensitivität. Weshalb es Familien gibt, in denen eine bekannte Mutation nicht mit Mutagensensitivität assoziiert ist, bleibt zu klären. Entweder spielen modifizierende genetische Faktoren eine wichtige Rolle oder es besteht möglicherweise kein kausaler Zusammenhang zwischen einer spezifischen BRCA-Mutation und der Mutagensensitivität.

Um den Einfluss des Vorhandenseins eines Tumors auf die Strahlensensitivität zu bestimmen, kann man die gesunden Frauen mit BRCA-Mutation (n=4) betrachten. Es zeigte sich, dass 3 der 4 Frauen mit BRCA-Mutation, jedoch ohne Karzinom, nach dem Kriterium der 90sten Percentile als sensitiv einzustufen sind. Die gesunden Frauen der „insensitiven Familie“ wurden bei dieser Betrachtung ausgeschlossen. Diese Ergebnisse zeigen, dass die dokumentierte Strahlensensitivität der Frauen nicht durch das Vorhandensein eines Tumors bedingt ist. Baria et al. (2001a) untersuchte 9 gesunde Mutationsträger im $G_2$-Assay und konnte keine Mutagensensitivität im Vergleich zu Kontrollen feststellen, was für einen Einfluss des Tumorstatus auf die Sensitivität sprechen würde. Auch Vral et al. (2003) konnten bei Verwendung des MNT keinen signifikanten Unterschied der chromosomalen

Strahlensensitivität zwischen BRCA-mutationstragenden Frauen ohne Tumor (n=12) und der Referenzpopulation gesunder Frauen (n=86) finden. Diesen Befund könnte man auch so interpretieren, dass die BRCA-Mutation allein noch nicht zur Mutagensensitivität führt und ein kausaler Zusammenhang nicht besteht. Die hohe Assoziation zwischen der Anwesenheit einer BRCA-Mutation und dem Auftreten von Mutagensensitivität legt einen direkten Zusammenhang jedoch nahe.

Ein wesentlicher Faktor, der die quantitative Analyse der Mutagensensitivität bei Brustkrebspatienten beeinflussen könnte, stellen vorausgegangene Chemo- oder Strahlentherapien dar. Eine Induktion erhöhter Strahlensensitivität durch eine vorangegangene Therapie konnte jedoch ebenfalls ausgeschlossen werden, da in meiner Studie 3 der 4 Frauen keine Tumorbildung aufwiesen und folglich auch keine Therapie erhalten hatten und doch mit verstärkter Strahlensensitivität im MNT reagierten. Dies wird durch Befunde von Baeyens et al. (2002) mit dem $G_2$-Chromosomenaberrationstest gestützt, die keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der chromosomalen Strahlensensitivität zwischen Gruppen von Patienten mit und ohne Therapie fanden. Auch Roberts et al. (1999) stellten in Brustkrebspatienten vor und nach Therapie keine signifikanten Unterschiede im $G_2$-Assay nach Bestrahlung fest. Während also eine vorausgegangene Therapie keinen grundsätzlichen Einfluss auf die Induktion der Strahlensensitivität zu nehmen scheint, so zeigt die vorliegende Studie jedoch eindeutig eine Auswirkung auf die basalen Chromosomenschäden. Betrachtet man die basalen Mikronukleus-Frequenzen von BRCA-Patienten und Kontrollen in meiner Studie, so erkennt man hier signifikant erhöhte Werte bei Frauen mit BRCA-Mutation. In der Literatur finden sich widersprüchliche Befunde zum Einfluss einer vorausgegangen Therapie auf die basalen Chromosomenschäden. In einigen Studien wurde bei verschiedenen Krebspatienten ohne Strahlen- oder Chemotherapie eine deutlich erhöhte Anzahl spontaner MN nachgewiesen, was als Anzeichen chromosomaler Instabilität gewertet wurde (Duffaud et al., 1997; Venkatachalam et al., 1999; Jagetia et al., 2001), andere Arbeiten konnte hingegen keine Erhöhung der basalen MN-Frequenzen in Krebspatienten feststellen (Fenech et al., 1990; Gantenberg et al, 1991). In vielen Studien wurde allerdings bestätigt, dass durch eine Therapie die Anzahl spontaner MN beeinflusst werden kann (Fenech et al., 1990; Jagetia et al., 2001; Baeyens et al., 2002). Auf die Anzahl spontaner Chromosomenaberrationen

hat eine Therapie scheinbar keinen Einfluss (Baeyens et al., 2002). Es ist demnach nicht vollständig geklärt, ob Brustkrebspatienten eine erhöhte chromosomale Instabilität aufweisen, eine Erhöhung der basalen MN-Frequenzen als Folge einer vorausgegangen Therapie kann jedoch auftreten. Eine signifikante Beeinflussung der strahleninduzierten MN-Frequenzen durch Therapie, Tumorstatus oder BRCA-Genotyp konnte in meiner Arbeit jedoch nicht festgestellt werden.

Die Mutagensensitivität von Brustkrebspatienten wurde in einigen Studien auch mit dem Comet-Assay untersucht (Jaloszynski et al., 1997; Alapetite et al., 1999, Rajeswari et al., 2000; Rothfuss et al., 2000; Nieuwenhuis et al., 2002, Smith et al., 2003). Da zwischen der Klonierungsfähigkeit von Zellen und der Schadensinduktion im Comet-Assay ein Zusammenhang gefunden wurde, scheint es legitim, den Comet-Assay zur Untersuchung der Strahlensensitivität zu verwenden (McKelvey-Martin et a., 1998). Die in meiner Arbeit mit dem Comet-Assay durchgeführten Untersuchungen an Lymphozyten mit BRCA-Mutation zeigten keine erhöhte Induktion von DNA-Schäden der im MNT sensitiven Frauen. Die Reparaturkinetik ließ in allen Probandengruppen eine nahezu vollständige Eliminierung der DNA-Schäden nach 1 h erkennen. Diese Experimente wurden mit der alkalischen Version des Comet-Assays durchgeführt, der allerdings eine Vielzahl verschiedener Schäden erfasst. Da die im MNT festgestellte Mutagensensitivität jedoch aus der defekten Reparatur induzierter DNA-DSB resultiert (Obe et al., 2002), wurde mit einer neutralen Version des Comet-Assays spezifisch die Induktion und Reparatur von DNA-DSB untersucht. Auch hier waren keine Unterschiede in Induktion und Reparatur der DNA-DSB in Lymphozyten mit heterozygoter BRCA-Mutation verglichen mit Lymphozyten gesunder Kontrollen festzustellen. In einigen Studien an Lymphozyten von Brustkrebspatienten konnte allerdings eine gestörte Reparatur induzierter Schäden dokumentiert werden. Alapetite et al. (1999) untersuchten Lymphozyten von 28 Brustkrebspatienten im Comet-Assay, wovon 17 der Probanden eine erhöhte Strahlensensitivität des normalen Gewebes nach Strahlentherapie zeigten. Die durch 5 Gy induzierten Schäden war bei allen Probanden sehr variabel. Für 8 der extrem strahlensensitiven Probanden konnten 1 h nach Schadensinduktion Defizite in der Reparatur strahleninduzierter DNA-Schäden nachgewiesen werden. In einer weiteren Reparaturkinetik, die einen Zeitraum von 2 h überspannte, wurde deutlich, dass der zuvor vermutete Reparaturdefekt vielmehr auf einer verzögerten

als auf einer unvollständigen Reparatur beruhte. Eine Studie von Smith et al. (2003) stellte bei 70 Brustkrebspatienten nach Bestrahlung mit 6 Gy eine erhöhte Schadensinduktion und verringerte Reparaturkapazität im Vergleich zu 70 Kontrollen fest. Auch Jaloszynski et al. (1997) konnten nach Behandlung mit Bleomycin ähnliche Sensitivität von Brustkrebspatienten feststellen. Da die Brustkrebspatienten allerdings in keiner der drei Studien genotypisiert wurden, lassen sich keine Aussagen zu Reparaturdefekten von Frauen mit BRCA-Mutation machen. Von Gaffney et al. (1998) wurden zudem berichtet, dass unter BRCA-heterozygoten Patienten keine Fälle mit verstärkten Gewebsreaktionen nach Strahlentherapie detektiert werden konnten, was die Anwesenheit von BRCA-Mutationen im Kollektiv der Patienten der ersten Studie ausschließen würde. In sämtlichen hier aufgeführten Untersuchungen mit dem Comet-Assay wurde eine sehr große Variabilität zwischen den einzelnen Probanden beschrieben, wenngleich die Differenzen zwischen den Mittelwerten von Kontrollen und Patienten statistische Signifikanz aufwiesen. In Studien, in welchen explizit Lymphozyten mit heterozygoter BRCA-Mutation im Comet-Assay untersucht wurden, konnte keine Korrelation zwischen *BRCA1*- oder *BRCA2*-Mutation und erhöhter Mutagensensitivität gefunden werden (Rothfuss et al., 2000; Nieuwenhuis et al., 2002), was in Übereinstimmung mit hier erhobenen Daten steht. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die im MNT detektierte Mutagensensitivität von Brustkrebspatienten mit BRCA-Mutation im Comet-Assay nicht nachgewiesen werden kann.

## 4.2 Mutagensensitivität und die Funktionen von BRCA1

Die chromosomale Sensitivität wurde meist mit ionisierender Strahlung untersucht. Ionisierende Strahlung induziert hauptsächlich DNA-DSB, welche zur Formation von Chromosomenaberrationen und Mikronuklei führen, wenn sie nicht korrekt repariert werden (Obe et al., 2002). Daher wurde chromosomale Mutagensensitivität meist im Kontext einer beeinträchtigten DNA-DSB Reparatur diskutiert und es wurde vermutet, dass Mutationen in verschiedenen Genen mit geringer Penetranz für die beobachtete Mutagensensitivität in Brustkrebspatienten verantwortlich sind (Scott et al., 1998; 1999; Baeyens et al., 2002). Eine Betrachtung der Mutagensensitivität im Zusammenhang mit *BRCA1*- und *BRCA2*-Mutationen deutete laut bisheriger Ergebnisse auf eine Involvierung der BRCA-Proteine in die DNA-DSB-Reparatur hin.

Es wurde hierbei zunächst eine zentrale Funktion von BRCA1 in der HR angenommen, eine Vermutung, die durch Kolokalisation von BRCA1 mit RAD 51 in nukleären „Foci“ gestützt wurde (Scully et al., 1997). Durch physikalische Interaktion von BRCA1 mit RAD50 wurde jedoch auch eine Involvierung von BRCA1 in den Mechanismus des NHEJ angezeigt (Zhong et al., 1999), was in späteren Experimenten an embryonalen Mausfibroblasten (mouse embryonic fibroblasts, MEFs) verifiziert wurde. In *brca1*-defizienten MEFs konnte keine Beeinträchtigung der gesamten End-joining Aktivität beobachtet werden, jedoch war das fehlerfreie NHEJ um 50% reduziert (Zhong et al., 2002). Neben diesen Studien an MEFs konnte kürzlich auch in LCLs mit heterozygoter *BRCA1*-Mutation ein beeinträchtiges NHEJ nachgewiesen werden (Baldeyron et al., 2002). Während die Geschwindigkeit des NHEJ in Zellen mit *BRCA1*-Mutation nicht signifikant betroffen war, wurde jedoch eine deutlich erhöhte Rate an fehlerhaftem NHEJ festgestellt. Basierend auf vergleichenden Studien mit dem MNT und dem Comet-Assay, hatten Rothfuss et al. (2000) bereits gefolgert, dass eine *BRCA1*-Mutation direkt oder indirekt zu einer gestörten Genauigkeit der DNA-Reparatur in Lymphozyten führt. Es ist noch nicht geklärt, inwieweit der hier beschriebene Defekt in der DNA-DSB-Reparatur zur Formation von MN führt. Möglicherweise beeinflusst BRCA1 beide Reparaturwege, da es den DNA-Reparaturfunktionen übergeordnet ist. Jedoch widerspricht die Involvierung von BRCA1 in das NHEJ früheren Befunden, in welchen gezeigt wurde, dass MEFs mit mutiertem *BRCA1* eine erhöhte Rate an NHEJ aufweisen (Moynahan et al., 1999; Snouwaert et al., 1999). Da die verwendeten MEFs allerdings eine kürzere Isoform des BRCA1-Proteins exprimieren, der lediglich Exon 11 fehlt, ist es vorstellbar, dass diese Isoform das NHEJ aufrechterhält, im Gegensatz zu den zumeist trunkierten Proteinen durch *BRCA1*-Mutationen. Es wurde berichtet, dass BRCA1 zusammen mit anderen DNA-Reparatur-Proteinen einen Komplex an geschädigten Stellen der DNA bildet, um die freien DNA-Enden vor Degradierung zu schützen und somit korrektes End-Joining zu ermöglichen (Paull et al., 2001). Die Assoziation von Wildtyp mit dem RAD50/MRE11/NBS1-Komplex hemmt dessen Exonukleaseaktivität und unterstützt somit die korrekte Ligation der DNA-Enden. Scheinbar sind die geringen Mengen an BRCA1 in heterozygoten Zellen nicht ausreichend, um die Degradierung der freien DNA-Enden bis zum Einsetzten der Reparatur zu verhindern, was zu einem Anstieg des fehlerhaften NHEJ führte. Offensichtlich ist BRCA1 ein multifunktionelles Protein, wobei seine distinkten

Funktionen noch nicht vollständig aufgeklärt sind. Neben seiner Funktion in der DNA-DSB-Reparatur, agiert es zudem in der TCR und bei der Erkennung von anormalen DNA-Strukturen, wie fehlgepaarter DNA und blockierten Replikationsgabeln (Übersicht bei Venkitaraman, 2001; 2002). In Übereinstimmung mit diesen Funktionen zeigten *BRCA1*-heterozygote Zellen nicht nur erhöhte Sensitivität gegenüber ionisierender Strahlung, sondern auch nach Behandlung mit $H_2O_2$, was eine Involvierung von BRCA in die Reparatur oxidativer Schäden anzeigt. Übereinstimmend damit konnte in *brca1*-defizienten embryonalen Mausstammzellen als auch in humanen Tumorzellen ein Defekt in der TCR oxidativer Schäden festgestellt werden (Gowen et al., 1998; Abbott et al., 1999; LePage et al., 2000).
Zur weiteren Charakterisierung der Mutagensensitivität und zum besseren Verständnis der zugrunden liegenden Mechanismen ist es von großem Interesse, den Effekt verschiedener Cytostatika auf die Mikronukleus-Frequenzen in Lymphozyten zu untersuchen.

Es wurde zunächst untersucht, ob eine Kombination aus Koffein und Strahlung einen unterschiedlichen Effekt auf Lymphozyten von Frauen mit *BRCA1*-Mutation im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen hat. Koffein bewirkt bereits in geringen Dosen eine Hemmung der ATM-Kinaseaktivität (Sarkaria et al., 1999; Zhou et al., 2000). Da eine gemeinsame Funktion von BRCA1 und ATM in der Antwort auf DNA-Schäden postuliert wird, wurde hier der Effekt von Koffein auf Lymphozyten mit *BRCA1*-Mutation analysiert. Die Zellen der 4 *BRCA1*-Patientinnen wiesen im Vergleich zu den 4 gesunden Kontrollen auch in diesem Experiment nach Bestrahlung eine höhere Mikronukleus-Häufigkeit auf. Eine kombinierte Behandlung der Lymphozyten mit Strahlung und Koffein brachte einen weiteren Unterschied zwischen diesen beiden Kollektiven zum Vorschein: bei allen Frauen mit *BRCA1*-Mutation war eine Reduktion der Strahlungseffekte zu beobachten, während bei 3 der 4 Kontrollen ein Anstieg der MN-Frequenz zu erkennen war. Frühere Untersuchungen zeigten in LCL denselben Effekt. Koffein erhöhte die Anzahl strahleninduzierter MN in normalen Zellen und in AT-heterozygoten Zellen signifikant, nicht aber in *BRCA1*-heterozygoten Zellen (Speit et al., 2000). Im Gegensatz dazu bewirkte Koffein in einer Studie an Lymphozyten von Krebspatienten mit Nierenkarzinom eine Verstärkung der bleomycininduzierten Schäden (Tzancheva und Komitowski, 1985). Bleomycin ist eine Substanz mit

klastogener Wirkung und verursacht ein Schadensspektrum, welches dem ionisierender Strahlung entspricht, daher wird Bleomycin als radiomimetisch bezeichnet. Die Mutagensensitivität der Probanden wurde in diesen Untersuchungen anhand von chromosomalen Änderungen, Chromosomen- und Chromatidbrüchen bestimmt und man fand heraus, dass die Lymphozyten der Krebspatienten als auch die Lymphozyten von Kontrollpersonen auf eine kombinierte Behandlung mit Bleomycin und Koffein mit verstärkter Mutagensensitivität reagierten. Die Diskrepanz dieser Ergebnisse zu den Resultaten meiner Arbeit zeigen, dass dieser Effekt nicht charakteristisch für alle Tumorerkrankungen ist, sondern deutet auf eine spezifische Reaktion *BRCA1*-heterozygoter Zellen hin. In den *BRCA1*-heterozygoten Lymphozyten ist folglich ein Defekt vorhanden, der in normalen Zellen durch Behandlung mit Koffein imitiert wird. Bebb et al. (1998) untersuchten mit $G_2$-Chromosomenaberrationstest LCLs auf den Einfluss von Koffein auf strahleninduzierte Chromosomenbrüche und stellten fest, dass Koffein die chromosomenschädigende Wirkung in Kontrollzellen und in AT-heterozygoten Zellen verstärkte, nicht jedoch in AT-homozygoten Zellen. Es stellt sich nun allerdings die Frage, warum *BRCA1*-heterozygote Zellen in gleicher Weise wie AT-homozygote Zellen auf eine Behandlung mit Koffein reagieren und die Strahlensensitivität beider Zellarten nicht durch Koffein verstärkt werden kann. Man weiß, dass $\gamma$-Strahlung das Verweilen von AT-Zellen in der $G_2$-Phase des Zellzyklus verlängert. Koffein verkürzt oder eliminiert den strahleninduzierten $G_2$-Stopp in ATM positiven Zellen und hebt den $G_2$-Stopp in AT-Zellen vollständig auf (Hansson et al., 1984; Zampetti-Bosseler und Scott, 1985; Musk und Steel, 1990). Es wurde außerdem gezeigt, dass Koffein die katalytische Aktivität von ATM bereits in sehr geringer Konzentration hemmt und es wurde daher vermutet, dass die Verstärkung des strahleninduzierten Effekts von Koffein auf der Hemmung der Kinaseaktivität von ATM beruht (Sarkaria et al., 1999; Zhou et al, 2000). Eine Erklärung könnte in der strahleninduzierten Phosphorylierung von BRCA1 durch ATM zu finden sein (Cortez et al., 1999; Gatei et al., 2000). Aufgrund dieser Ergebnisse kann man folgern, dass in Zellen mit mutiertem *BRCA1*-Allel phosphoryliertes BRCA1-Protein in zu geringer Menge vorhanden ist, und daher diese Zellen mit erhöhter chromosomaler Sensitivität reagieren. Diese Ergebnisse lassen eine Involvierung von BRCA1 und ATM in komplexere regulatorische Mechanismen der Schadensignalisierung und DNA-Reparatur folgern.

Um zu untersuchen, ob die gefundene Sensitivität von *BRCA1*-heterozygoten Zellen nur auf oxidative Schäden und Strangbrüche begrenzt ist, wurden in dieser Arbeit neben Strahlung und $H_2O_2$ auch verschiedene DNA-schädigende Cytostatika im MNT untersucht. Die verwendeten Cytostatika Bleomycin (BLM), Cisplatin (CDDP), 1,3-bis(2-chlorethyl)nitrosurea (BCNU) und Cyclophosphamid (CP) induzieren durch unterschiedliche Mechanismen Schäden in der DNA, die von verschiedenen Reparaturmechanismen repariert werden. Es zeigte sich, dass die Lymphozyten der Patientinnen deutlich sensitiver auf die Mutagenbehandlung reagierten als die Kontrollen, wobei der Unterschied der beiden Kollektive meist bei der höheren Mutagenkonzentration stärker betont war. Einen solchen Effekt stellte bereits Rothfuss et al. (2000) bei der Verwendung von γ-Strahlung fest, wo durch Behandlung der Lymphozyten mit 2 Gy ein deutlicher Unterschied in der Mutagensensitivität gefunden wurde, nicht jedoch bei Behandlung mit 1 Gy. Bleomycin wird aufgrund seiner radiomimetischen Wirkung häufig anstelle von ionisierender Strahlung zur Untersuchung von Mutagensensitivität verwendet (Berwick und Vineis, 2000). Die hier beobachtete chromosomale Mutagensensitivität der Frauen mit *BRCA1*-Mutation ist daher nicht unerwartet. Auch Roy et al. (2000) konnte in Brustkrebsfamilien eine verstärkte Induktion von Chromosomenaberrationen durch BLM nachweisen. Ein Grund für die Unterschiede in der Höhe der induzierten MN-Frequenz von BLM im Vergleich zu γ-Strahlung kann in der beträchtlichen Größe des BLM-Moleküls und dem dadurch bedingten schlechten Aufnahmevermögen der Zellen zu finden sein. Cisplatin (CDDP) induziert DNA-Schäden durch DNA-Strang-Vernetzungen (Crosslinks) und bewirkte in Lymphozyten mit *BRCA1*-Mutation eine erhöhte chromosomale Sensitivität. Eine bei Husain et al. (1998) beobachtete Resistenz der Brustkrebszelllinie MCF7 gegenüber Cisplatin widerspricht den hier gefundenen Ergebnissen, kann jedoch durch die dort entdeckte Hochregulation der *BRCA1*-Expression in der Zelllinie erklärt werden. Am Mausmodell durchgeführte Untersuchungen zeigten jedoch, dass brca1-defiziente embryonale Stammzellen ebenfalls sensitiv auf eine Behandlung mit CDDP reagieren. *Brca1* bewirkte außerdem nach Behandlung mit CDDP die Ansammlung von Rad51 „Foci“, die in *brca1*-defizienten Zellen nur in marginaler Anzahl beobachtet werden konnten (Bhattacharyya et al., 2000). Da festgestellt wurde, dass brca1 sowohl in der Basenexzisionsreparatur oxidativer Schäden (Gowen et al, 1998), wie auch in der DSB-Reparatur durch homologe Rekombination beteiligt ist

(Moynahan et al., 1999), kann angenommen werden, dass brca1 direkt an der Rad51-Ansammlung an einzelsträngigen DNA-Stellen involviert ist, die durch Induktion von DSB oder an Stellen blockierter Replikationsgabeln bewirkt wird (Bhattacharyya et al., 2000). Im Gegensatz dazu konnte allerdings in *BRCA1*-defizienten Tumorzellen keine Hemmung der schadeninduzierten Rad51 Foci festgestellt werden (Yuan et al., 1999). Eventuell treten beim Menschen auch BRCA1-unabhängige Mechanismen in Kraft, die zur Bildung der RAD51-Foci führen. Auch die Behandlung von Lymphozyten mit BCNU und CP führte zu *BRCA1*-bedingter Mutagensensitivität im MNT.

Die hier verwendeten Cytostatika CDDP, BCNU und CP greifen, anders als Strahlung oder Bleomycin, die DNA durch Alkylierungen und/oder durch DNA-vernetzende Eigenschaften an. Diese Arten von DNA-Schäden werden hauptsächlich durch NER und MMR repariert (Hoeijmakers, 2001). Die überraschende Beobachtung, dass auch eine Behandlung mit diesen Cytostatika in *BRCA1*-heterozygoten Lymphozyten eine verstärkte Bildung von Mikronuklei bewirkte, findet in der kürzlich veröffentlichten Idee, dass BRCA1 Teil des BASC-Komplexes (BRCA1 associated genome surveillance complex) ist eine mögliche Erklärung. Der BASC-Komplex besteht aus vielen verschiedenen Untereinheiten und umfasst die verschiedensten DNA-Reparaturproteine. Sowohl Proteine der DNA-DSB Reparatur und der Mismatchrepartur sind darin enthalten, als auch Proteine, die in die Rekombination involviert sind (Wang et al., 2000; Futaki und Liu, 2001). BRCA1 wird in diesem Multiproteinkomplex eine Rolle in der Koordination zwischen verschiedenen DNA-Reparaturwegen zugeschrieben. Laut diesem komplexem Modell eines „Genomerhaltungskomplexes“ haben BRCA1 und BRCA2 eine übergeordnete, koordinierende Funktion und verschiedene Gene werden von ihnen reguliert. Mutationen in Genen, die in der Hierarchie weiter unten liegen, könnten somit die inhomogenen Ergebnisse in den verschiedenen Studien mit verschiedenen Testverfahren zur Mutagensensitivität erklären.

Nachdem festgestellt wurde, dass verschiedene Cytostatika im MNT eine erhöhte Mutagensensitivität in *BRCA1*-heterozygoten Zellen bewirkten, wurde untersucht, ob BRCA1 ebenfalls in den Mechanismus der intrachromosomalen Rekombination involviert ist. Die hier durchgeführten SCE-Experimente zeigten, dass die

Substanzen CDDP und BCNU in den Lymphozyten aller Probanden eine konzentrationsabhängige Induktion an SCEs bewirken, eine Differenz zwischen Lymphozyten mit und ohne *BRCA1*-Mutation konnte jedoch nicht festgestellt werden. Auch die Basalrate an SCEs ließ keine Unterschiede zwischen Patientinnen und Kontrollen erkennen. Lediglich eine der Patientinnen wies einen Basalwert über dem höchsten Mittelwert der Kontrollen auf. Im Gegensatz dazu berichteten Roy et al. (2000b) von einer erhöhten Basalrate an SCEs in Patienten mit familiärem Brustkrebs. Wenn die Differenz auch gering war, so zeigten doch 9 von 11 Patienten eine mittlere SCE-Frequenz über dem höchsten Mittelwert des Kontrollkollektives. Da jedoch nicht bekannt war, ob und wie viele der Patienten Träger einer *BRCA1*-Mutation waren, ist ein direkter Vergleich mit den hier erhaltenen Ergebnissen nicht möglich. Die erhöhte Sensitivität von Brustkrebspatienten muss nicht im Zusammenhang mit BRCA-Mutationen stehen. Allerdings stellten Cianciulli et al. (1995) bei Untersuchung von 32 Patienten mit multiplen Tumoren sowohl erhöhte spontane SCE-Frequenzen, als auch erhöhte SCE-Frequenzen nach Mitomycin C-Behandlung fest. In dem Kollektiv von 32 Patienten lagen die Basalwerte von 28 Patienten über dem höchsten Mittelwert der 32 Kontrollen. Jedoch erscheint es in diesem Fall plausibel, dass bei der Entstehung multipler Tumore eine genetische Instabilität vorliegt, die zu erhöhten SCE-Frequenzen führt. Meinen Ergebnissen zufolge ist BRCA1 nicht in den spezifischen Mechanismus des Schwesterchromatidaustauschs involviert, und der SCE Test eignet sich daher nicht zur Detektion von Unterschieden hinsichtlich chromosomaler Mutagensensitivität in Lymphozyten mit *BRCA1*-Mutation. Aufgrund der geringen Datenmenge, die zu Brustkrebspatienten mit *BRCA1*-Mutation verfügbar ist, lassen sich noch keine definitiven Schlussfolgerungen über die Anwendung von SCEs als Marker für Mutagensensitivität in Brustkrebsfamilien treffen.

Da gezeigt wurde, dass BRCA1 durch Interaktion mit γ-Tubulin an den Centrosomen lokalisiert ist, wird vermutet, dass BRCA1 während der Mitose direkt an der akkuraten Verteilung duplizierter Chromosomen beteiligt ist (Hsu und White, 1998). Zusätzlich bestätigten Studien an Mäusen diese Befunde, da in embryonalen Mausfibroblasten mit mutiertem brca1 multiple funktionelle Centrosomen gefunden wurden, die zu gestörter Chromosomensegregation und zu Aneuploidien führten (Xu et al., 1999). Es wurden daher Lymphozyten mit *BRCA1*-Mutation mit den

Spindelgiften Taxol (TAX) und Vincristin (VIN) behandlet und auf MN-Induktion hin untersucht. Sowohl bei Patientinnen wie auch bei Kontrollen war eine sehr hohe Variabilität erkennbar, aber es konnte keine Mutagensensitivität als charakteristisches Merkmal von Frauen mit *BRCA1*-Mutation festgestellt werden. Die FISH-Analyse machte deutlich, dass für Patientinnen und Kontrollen Mikronuklei nach demselben Mechanismus gebildet wurden. Es zeigte sich in den Lymphozyten beider Kollektive, dass strahleninduzierte Mikronuklei Centromer-negativ waren, was auf Chromosomenbrüche zurückzuführen ist, während Taxol hauptsächlich Centromer-positive Mikronuklei induzierte, was die Fehlverteilung ganzer Chromosomen anzeigt. Diese Ergebnisse verdeutlichen uns, dass die Mutagensensitivität von Lymphozyten mit einer *BRCA1*-Mutation spezifisch mit DNA-schädigenden Substanzen und Reparaturprozessen assoziiert ist, nicht jedoch mit einer fehlerhaften Chromosomensegregation durch Spindelgifte. Eine Studie, in welcher der Einfluss der *BRCA1*-Expression im Zusammenhang mit Mutagensensitivität untersucht wurde, fand ebenfalls systematische Unterschiede zwischen DNA-schädigenden Substanzen und Spindelgiften. Wurde die *BRCA1*-Expression in Brustkrebszelllinien gehemmt, so war eine Sensitivität gegenüber CDDP feststellbar, nicht jedoch gegenüber VCR und TAX (Lafarge et al., 2001).

Die hier erhobenen Daten zeigen, dass eine Mutagensensitivität von Zellen mit heterozygoter *BRCA1*-Mutation nach Exposition mit verschiedenen Arten von DNA-schädigenden Substanzen auftritt. In Übereinstimmung mit einer zentralen Rolle des BRCA1-Proteins im Erhalt der genomischen Stabilität wurde festgestellt, dass BRCA1 in verschiedene DNA-Reparaturmechanismen involviert ist. Von großer Wichtigkeit ist diese Tatsache insofern, da einige der hier untersuchten Mutagene routinemäßig in der Brustkrebstherapie eingesetzt werden. Möglicherweise haben Frauen mit Brustkrebs, die zusätzlich eine Mutation im *BRCA1*-Gen aufweisen ein höheres Risiko für (Chromosomen-) Mutationen und sekundäre Tumore.

## 4.3 Lymphoblastoide Zelllinien mit *BRCA1*-Mutation als Modell für Untersuchungen zur Mutagensensitivität

Studien zur Mutagensensitivität wurden zumeist an menschlichen Lymphozyten durchgeführt. Jedoch ist in der Praxis Blut von Frauen mit Brustkrebs nicht beliebig oft verfügbar und die Lebensdauer von Lymphozyten in Kultur ist nur beschränkt. Es wäre daher wünschenswert permanente Zellkulturen als Modell zu Studien der Mutagensensitivität und der ihr zugrunde liegenden Mechanismen verwenden zu können. Zellkulturen stellen einen unerschöpflichen Vorrat an Zellen dar, der bestens für die Grundlagenforschung geeignet ist und auch für vergleichende Studien in verschiedenen Laboren herangezogen werden kann. Auf der anderen Seite können jedoch Probleme bei der Etablierung und bei der Langzeitkultivierung die Verwendung von Zelllinien einschränken. Als Folge genetischer Änderungen ist es möglich, dass in Zelllinien manche Eigenschaften primärer Zellen verloren gehen. Einen Ausweg aus diesem Dilemma stellen lymphoblastoide Zelllinien (LCL) dar. LCL sind recht einfach durch Transfektion mit Epstein-Barr-Virus zu etablieren und weisen im Allgemeinen keine größeren genomischen Instabilitäten oder Verluste genetischer Charakteristika auf. Für die Etablierung eines zuverlässigen Modellsystems ist eine detaillierte Charakterisierung der Zelllinien essentiell, bevor sie für mechanistische Studien in der Brustkrebsforschung verwendet werden können. Experimente zur Aufklärung der Funktionen von BRCA1 und BRCA2 wurden bisher meist am Mausmodell oder an Tumorzelllinien durchgeführt. Für brca-defiziente Mauszellen und BRCA-defiziente Tumorzellen konnte eine Hypersensitivität gegenüber Strahlung und anderen Mutagenen nachgewiesen werden (Gowen et al., 1998; Scully et al., 1999; Abbott et al., 1999; Wang et al., 2001). Anhand von lymphoblastoiden Zelllinien sollten nun in dieser Arbeit weitere Untersuchungen zum Mechanismus der Mutagensensitivität durchgeführt werden. Die Ergebnisse zeigten allerdings, dass permanent wachsende LCLs nicht generell als Modell zur Untersuchung von Mutagensensitivität in Frage kommen. Es wurden sechs LCLs, drei mit heterozygoter *BRCA1*-Mutation, und drei Kontrollzelllinien ohne *BRCA1*-Mutation mit ionisierender Strahlung behandelt und im MNT auf die Induktion von Mikronuklei hin untersucht. Alle sechs LCL zeigten einen dosisabhängigen Anstieg der MN-Frequenz, jedoch konnte keine erhöhte Mutagensensitivität der drei LCL mit heterozygoter *BRCA1*-Mutation festgestellt werden. Zwischen den Zelllinien war eine große Variabilität der MN-Frequenzen zu beobachten, jedoch wurde die

höchste MN-Induktion in zwei der Kontroll-LCLs beobachtet. Die *BRCA1*-heterozygoten Zelllinien wiesen zwei verschiedene Mutationen (T300G, 5382insC) auf, die in Familien mit erblichem Brustkrebs häufig auftreten. Auch in unserem Patientenkollektiv waren diese Mutationen zu finden und bei allen diesen Patientinnen wurde im MNT an Lymphozyten chromosomale Mutagensensitivität festgestellt, die allerdings bei Verwendung der LCLs nicht bestätigt werden konnte. Zwei der hier untersuchten Zelllinien zeigten dieselbe Mutation (T300G) wie eine in früheren Studien verwendete Zelllinie (HA166), die auf Strahlung hypersensitiv reagierte (Speit et al., 2000). Die hier charakterisierte Zelllinie L166B wurde aus Lymphozyten derselben Patientin etabliert, zeigte jedoch keine Mutagensensitivität. Die Betrachtung der zytotoxischen Effekte von Strahlung, wie der Anteil lebender Zellen oder das Zellwachstum, konnte keine systematischen Unterschiede zwischen *BRCA1*-heterozygoten LCLs und Kontrollen aufdecken. Im Gegensatz dazu wurden 3 LCL mit *BRCA1*-Mutation in Untersuchungen von Foray et al. (1999) durch Berechnung der 37% Überlebensrate als hypersensitiv gegenüber Strahlung eingestuft. Die Analyse der Zellzyklusverteilung vor und nach Bestrahlung zeigte, dass es sich bei allen Zelllinien ausschließlich um asynchrone Kulturen handelte. Bei keiner der LCLs war eine strahleninduzierte Blockade in der $G_1$- oder $G_2$-Phase des Zellzyklus zu erkennen, wie es zumindest bei den Kontrollzellen zu erwarten gewesen wäre. Die Untersuchung der Expression von *BRCA1* nach Schadensinduktion gab ebenfalls keinen Hinweis auf mutationsbedingte Unterschiede zwischen den verschiedenen LCLs. Die Quantifizierung der *BRCA1*-mRNA ließ zudem erkennen, dass die Menge an Transkript in Zellen mit heterozygoter *BRCA1*-Mutation im Vergleich zu Zellen mit zwei Wildtyp-Allelen von *BRCA1* nicht verringert ist. Dies deckt sich mit den Befunden von Riberias et al. (1997), die nur in Zelllinien, in welchen die Mutation zu einem spezifischen Transkriptverlust des mutierten Allels führte, eine Verringerung der Transkriptmenge feststellen konnte. Bei Verlust des Transkripts wurde etwa die Hälfte an *BRCA1*-mRNA detektiert. Ein direkter Vergleich der Daten ist allerdings nicht möglich, da in meiner Arbeit die Quantifizierung der *BRCA1*-Transkriptmenge in Relation zu einem Haushaltsgen bestimmt wurde. Gegensätzliche Befunde wurden von Baldeyron et al. (2002) erhoben. In drei verschiedenen *BRCA1*-heterozygoten LCL wurde im Westernblot weniger als die Hälfte an Protein detektiert, ungeachtet dessen, welche Mutation die Zelllinie aufwies. Eine Erklärung für die deutlich verringerten Mengen an

Wildtyp Protein könnte sein, dass BRCA1 möglicherweise als Dimer oder in Aggregaten mit anderen Proteinen agiert und eine Assoziation mit mutiertem Protein eine vorzeitige Degradierung bewirkt. Die hier durchgeführten Untersuchungen zeigten eine sehr variable *BRCA1*-Expression der LCLs, jedoch ohne Zusammenhang mit einer *BRCA1*-Mutation. 8 h nach Bestrahlung konnte in fünf der sechs LCL eine Reduktion der Transkriptmenge detektiert werden. In einer der Zelllinien konnte eine kontinuierliche Abnahme der Transkriptmenge im Verlauf von 24 h verzeichnet werden. Die Auswirkung einer Mutagenbehandlung auf die Expression von *BRCA1* wurde bisher nur an Tumorzelllinien durchgeführt, nicht jedoch an LCL. Andres et al. (1998) konnte eine Regulation der *BRCA1*-Expression durch DNA-schädigende Substanzen nachweisen. Eine Behandlung von Brustkrebszellen ohne *BRCA1*-Mutation mit Adriamycin oder UV führte zu einer dosisabhängigen Abnahme von *BRCA1* und *BRCA2*. Durch die Mutagenbehandlung wurde auch die Verteilung der Zellen im Zellzyklus beeinflusst, was ebenfalls eine Ursache für unterschiedliche Expression von *BRCA1* darstellen könnte, jedoch ist die veränderte Expression nachweislich nicht darauf zurückzuführen. Su und Ciftic (2002) stellten ebenfalls eine Regulation der *BRCA1*- und *BRCA2*-Expression durch chemotherapeutische Substanzen fest, allerdings konnte eine deutliche Verringerung der Menge an *BRCA1* nur bei einer Behandlung mit Adriamycin festgestellt werden. Es zeigten sich jedoch ungewöhnliche Zellzyklusverteilungen mit Blockade verschiedener Zellzykluskontrollpunkte bei Behandlung mit verschiedenen Konzentrationen an Adriamycin.

Zu Untersuchungen der Mutagensensitivität von Brustkrebspatienten wurden wiederholt LCLs verwendet (Lavin et al., 1994; Ramsay und Birrell, 1995; Foray et al., 1999; Baldeyron et al., 2002). Lavin et al., (1994) demonstrierten eine erhöhte Strahlensensitivität der LCLs von Brustkrebspatienten. Die Strahlensensitivität manifestierte sich durch eine erhöhte Anzahl an Zellen in der $G_2$-Phase des Zellzyklus durch strahleninduzierte Blockade, wie bereits bei AT-heterozygoten Zellen festgestellt wurde. Bei Betrachtung der detaillierten Ergebnisse dieser Studie fällt jedoch auf, dass unter den LCLs von 108 Frauen mit Brustkrebs lediglich 20 % einen deutlichen Anstieg der Zellen in der $G_2$-Phase 18 h nach Bestrahlung mit 3 Gy zeigten, während auch 8% der Kontrollzelllinien diesen Effekt aufwiesen. Ähnliche Resultate wurden auch bei Ramsey und Birrell (1995) an LCLs, die aus Lymphozyten

von 56 Brustkrebspatienten etabliert wurden, demonstriert. Die Strahlensensitivität der Zellen wurde durch Bestimmung der überlebenden Fraktion an Zellen nach 2 Gy Strahlung geprüft, wobei eine recht hohe Variabilität auftrat. Nur 16 % der LCL von Brustkrebspatienten zeigten größere oder ebensolche Sensitivität wie eine AT-heterozygote LCL. Im Vergleich zu den Untersuchungen der Lymphozyten von Brustkrebspatienten, bei denen im $G_2$-Chromosomenaberrationstest bei Verwendung der 90sten Percentile des Kontrollkollektivs als Sensitivitätsgrenze etwa 40% der Brustkrebspatienten als sensitiv eingestuft wurden (Parshad et al., 1996; Scott et al., 1998; 1999; Baeyens et al., 2002), ist hier der Anteil strahlensensitiver LCLs sehr gering. Dieser niedrige Anteil sensitiver Zellen, verglichen mit den Studien an Lymphozyten kann natürlich auch durch die Methodik beeinflusst sein, aber die Eignung von LCLs als Modell für Untersuchungen der Mutagensensitivität in Lymphozyten kann durch diese Resultate nicht uneingeschränkt unterstützt werden. In nur wenigen Studien wurden LCLs mit heterozygoter BRCA-Mutation verwendet (Foray et al., 1999; Baldeyron et al., 2002). Foray et al. (1999) untersuchten einige LCLs mit heterozygoter *BRCA1*-Mutation (n=5) oder *BRCA2*-Mutation (n=4) auf Strahlensensitivität. Eine heterozygote BRCA-Mutation bewirkte gesteigerte Proliferation, verringerte Überlebensrate und eine höhere MN-Induktion nach Bestrahlung mit $\gamma$-Strahlung. Die MN-Frequenzen wurden allerdings nur für jeweils 2 der Zelllinien mit *BRCA1*- und *BRCA2*-Mutation gezeigt und hinsichtlich der anderen Zelllinien wurde keine Aussage gemacht. Diese Resultate stimmen mit meinen Ergebnissen aus früheren Untersuchungen zur Mutagensensitivität überein, die anzeigten, dass LCLs mit einer Mutation im *BRCA1*-Gen dieselbe Mutagensensitivität aufweisen, wie die im MNT untersuchten Lymphozyten (Speit et al., 2000). Es konnte hier Sensitivität gegenüber $\gamma$-Strahlung wie auch gegenüber $H_2O_2$ festgestellt werden. Jedoch basierten diese Untersuchungen auf nur einer LCL mit heterozygoter *BRCA1*-Mutation (HA166) und eine Kontrollzelllinie. Bei selektiver Auswahl von 2 der hier untersuchten LCLs könnten ähnliche Schlussfolgerungen getroffen werden. Ein Vergleich der Kontroll-LCL L169 mit der *BRCA1*$^{+/-}$-Zelllinie L166 beispielsweise zeigte in diesem Fall eine chromosomale Sensitivität der Zellen mit BRCA-Mutation an. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die zuvor gezeigte Strahlensensitivität *BRCA1*-heterozygoter Lymphozyten in den hier untersuchten LCL nicht festgestellt werden konnte. Die Arbeiten, in denen die Strahlensensitivität von Brustkrebspatienten anhand von LCLs postuliert wurde, sind

daher kritisch zu betrachten, da der Prozentsatz sensitiver Zelllinien sehr gering ist, verglichen mit dem Anteil an sensitiven Frauen aufgrund von Untersuchungen an Lymphozyten. Eine Transformation von Lymphozyten mit EBV scheint in manchen LCL genetische Änderungen zu bewirken, die teilweise zum Verlust ihres zellulären Phänotyps führen.

Vergleichende Untersuchungen von Lymphozyten, EBV-transformierten LCLs und IL-2 stimulierten Lymphozyten im MNT zeigten ebenfalls, dass die Charakteristika transformierter und IL-2-stimulierter Lymphozyten nicht unbedingt mit den Eigenschaften der frisch gewonnenen Lymphozyten übereinstimmen müssen (Baeyens et al.; 2003). Diese vergleichende Studie basierte auf Zellen von 10 Brustkrebspatienten und 10 Kontrollen, wobei die Untersuchung der Lymphozyten eine chromosomale Mutagensensitivität des Patientenkollektivs feststellte, die in den transformierten LCL und in IL-2 stimulierten Lymphozyten nicht detektiert werden konnte. Dies spricht dafür, dass eine EBV-Transformation, wie auch die Kultivierungen von LCLs scheinbar einen großen Einfluss auf die Expression von Mutagensensitivität haben.

Eine Behandlung der LCL mit $H_2O_2$ jedoch, ließ in meiner Arbeit eine verstärkte Sensitivität der 3 LCL mit Mutation im *BRCA1*-Gen erkennen. Bereits sehr niedrige Konzentrationen von $H_2O_2$ bewirkten in den *BRCA1*-heterozygoten Zelllinien eine erhöhte Induktion von MN, während die Kontrollzelllinien bei Behandlung mit diesen Konzentrationen MN-Frequenzen auf basalem Niveau aufwiesen. Dies könnte eine spezifische Sensitivität gegenüber oxidativen Schäden anzeigen, die den LCL trotz genetischer Veränderungen geblieben ist. Oxidative Schäden sind auch Teil der strahleninduzierten Schäden und es ist bekannt, dass Strahlensensitivität in Zellen mit *BRCA1*-Mutation auch auf eine verringerte TCR oxidativer Schäden zurückzuführen ist (Gowen et al., 1998; Abbott et al., 1999; LePage et al., 2000). Bei Bestrahlung der Zellen könnte möglicherweise der Anteil oxidativer Schäden unter der Masse der induzierten Strangbrüche untergehen, weswegen dort keine erhöhte Sensitivität zu erkennen war.

In Übereinstimmung mit meinen Untersuchungen an Blutproben erwies sich der Comet-Assay auch in Experimenten mit LCL als ungeeignet zum Nachweis von

Mutagensensitivität auf Grund einer heterozygoten *BRCA1*-Mutation. Weder in der alkalischen Version noch in der neutralen Version des Comet-Assay zeigten LCL mit einer BRCA Mutation eine höhere Induktion von DNA-Schäden oder eine verlangsamte Reparatur nach Bestrahlung. Da die neutrale Version des Comet-Assay (pH 8,3) eine recht hohe Spezifität für den Nachweis von DNA-DSB hat (Wojewodzka et al, 2002), scheint die Geschwindigkeit der Reparatur von DSB nicht von zentraler Bedeutung für die Mutagensensitivität zu sein. Mit der Methode des Comet-Assay wird jedoch nur die Reparaturkapazität im gesamten Genom gemessen und mögliche Unterschiede zwischen verschiedenen Bereichen des Genoms werden nicht erfasst. Es ist jedoch bekannt, dass z. B. aktiv transkribierte Gene schneller repariert werden als inaktive (Hanawalt et al., 2002). Da für BRCA1 auch eine Funktion in der TCR von DNA-Schäden postuliert wurde (Gowen et al., 1998; Abbott et al., 1999; Le Page et al., 2000), könnte es möglich sein, dass sich der Defekt in *BRCA1*-heterozygoten Zellen nur auf der Ebene unterschiedlich aktiver Genregionen auswirkt. Mit der Comet-FISH-Technik steht ein methodischer Ansatz zur Verfügung, der es erlaubt, Unterschiede in der Induktion und Reparatur bestimmter Genregionen zu erfassen. Das p53-Gen ist eine geeignete Genregion zur Analyse von spezifischer Schädigung und Reparatur, da es während des Zellzyklus aktiv transkribiert wird (Calabretta et al., 1986), und durch verschieden Substanzen, darunter UV und $\gamma$-Strahlung eine Induktion von p53 bewirkt werden kann (McCay et al., 1999). In einigen Studien wurde gezeigt, dass die Reparatur dieser Genregion bevorzugt vor der Reparatur des gesamten Genoms (global genome repair, GGR) durchgeführt wurde (Evans et al., 1993; Ford et al., 1994). Der Comet-FISH-Assay fand jedoch bisher in nur wenigen Studien Anwendung zur Untersuchung der Reparatur individueller Genbereiche (McKelvey-Martin et al., 1998; McKenna et al., 2003a; 2003b). Die Untersuchungen zur genregionspezifischen Reparatur im Vergleich zu GGR wurden hier an einer *BRCA1*-heterozygoten LCL und einer Kontrollzelllinie untersucht. Es zeigte sich nach Schadensinduktion mit 5 Gy, dass etwa 35% der gesamten DNA beider LCL geschädigt wurden. Eine Reparatur dieser DNA-Schäden erfolgte innerhalb der ersten 20 min nach Reparatur. Die Analyse der Hybidisierungssignale der p53-Sonde ließ erkennen, dass nur etwa 10 % der p53-Genregion nach Bestrahlung geschädigt wurden, was durch Wanderung der Hybridisierungssignale in die Schweifregion des Kometen angezeigt wurden. Eine Reparatur dieses Genbereichs war nach 20 min nicht zu erkennen. Die zusätzlich zu

dem p53-Gen untersuchte Region des NF1-Gens zeigte leicht abweichende Ergebnisse. Das NF1-Gen wurde in gleichem Maße wie das gesamte Genom geschädigt und in beiden Zelllinien war eine Reparatur feststellbar. Signifikante Unterschiede zwischen beiden LCLs waren nicht zu finden, da auch die Variabilität der einzelnen Ergebnisse relativ hoch war. Die vergleichsweise geringe Schädigung der p53-Region lässt auf eine geringere Schadensinduktion in diesem Genbereich schließen. Auch bedingt durch die Nähe zur Telomerregion des Chromosom 17 könnte eine bevorzugte Lokalisation des p53-Gens im Kernbereich des Kometen begründet sein. Santos et al., (1997) unterzogen Zellen einer Elektrophorese, wodurch die DNA der Zelle lang gestreckt wurde und das Bild eines Kometen zeigte. Durch Anwendung der Comet-FISH-Technik konnten sie zeigen, dass die Telomere der Chromosomen nach Durchführung einer Elektrophorese bevorzugt in „Knötchen“ entlang der Kernmembran der Zellen zu finden waren, die Centromere der Zellen wurden dagegen entlang der Chromatinfasern im gesamten Kometen lokalisiert. An Blasentumorzelllinien durchgeführte Experimente mit dem Comet-FISH-Assay zeigten nach 5 Gy γ-Strahlung im Gegensatz zu den hier erhobenen Daten eine bevorzugte Reparatur der p53-Genregion (McKenna et al., 2003). Eine signifikant beschleunigte Reparatur des p53-Gens im Vergleich zur GGR war während der ersten 15 min zu erkennen. Nach einer Stunde zeigte sich in beiden untersuchten Zelllinien eine Reduktion der genspezifischen Schäden um 50%, während der Gesamtschaden der Zellen lediglich um 20% verringert wurde. Da nach Strahlung multiple Hybridisierungssignale in den Zellen detektiert wurden, konnte auf eine direkte Schädigung des p53-Gens geschlossen werden. In früheren Experimenten derselben Arbeitsgruppe allerdings wurden in einer anderen Blasenkarzinomzelllinie die Signale des p53-Gens auch nach Bestrahlung fast ausschließlich in der Kopfregion des Kometen detektiert (McKelvey-Martin et al., 1998). Eine direkte Schädigung des Gens konnte nicht festgestellt werden, da meist auch nach Bestrahlung nur 2 Signale detektierbar waren. Die gegensätzlichen Befunde dieser Arbeiten könnten durch die Verwendung unterschiedlicher Zellen begründet sein, jedoch könnten auch methodische Faktoren oder individuelle Subjektivität die Auswertung beeinflussen. Die Hybridisierungseffizienz der Sonde, als auch die Bindungskapazität der zum Fluoreszenznachweis verwendeten Antikörper könnten Einfluss auf die Ergebnisse haben. Es zeigte sich während der Experimente dieser Arbeit, dass die Analyse der Signale einer gewissen Erfahrung bedarf, um

unspezifische Artefakte als solche zu erkennen. Die an den beiden LCL erhobenen Daten ließen erkennen, dass in beiden untersuchten Genregionen keine bevorzugte Reparatur im Vergleich zur GGR stattfand. BRCA-mutationsbedingte Unterschiede waren nicht festzustellen.

Da in keiner Version des Comet-Assay Unterschiede zwischen Zellen mit und ohne BRCA-Mutation zu finden waren, wurde zusätzlich die Methode der PFGE angewandt, einer etablierten Methode zum spezifischen Nachweis von DNA-DSB. In verschiedenen Arbeiten wurden bislang *BRCA1*-defiziente Fibroblasten mit der PFGE auf die Induktion und Reparatur von DNA-DSB untersucht (Abbott et al., 1999; Foray et al., 1999; Scully et al., 1999; Wang et al., 2001). In zwei der Studien wurde kein Defekt in der Reparatur von DNA-DSB in *BRCA1*-oder *BRCA2*-defizienten Zellen dokumentiert (Abbott et al., 1999; Wang et al., 2001), Befunde von Scully et al. (1999) und Foray et al. (1999) wiesen hingegen auf eine gestörte DNA-DSB-Reparatur in *BRCA1*-defizienten Zellen hin. Foray et al. (1999) konnten in Tumorzelllinien wie auch in LCLs mit heterozygoter *BRCA1*- (n=2) und *BRCA2*-(n=3) Mutation eine verringerte Fähigkeit zur DSB-Reparatur feststellen. Die Untersuchung der LCLs zeigte, dass in Zellen mit *BRCA*-Mutation 50 % der initialen Schäden nach 24 h noch unrepariert waren, im Vergleich zu einem Restschaden von 20% bei den untersuchten Kontrollzelllinien.

Die Untersuchung der *BRCA1*-heterozygoten LCLs mit der PFGE konnte in meiner Arbeit keine systematischen Unterschiede finden, die mit einer *BRCA1*-Mutation im Zusammenhang stehen könnten. Die Höhe der induzierten Schäden variierte stark zwischen den einzelnen Zelllinien und auch in der Reparatur der DNA-DSB zeigte sich eine große intraindividuelle Variabilität. In Übereinstimmung mit diesen Experimenten zeigten Nieuwenhuis et al. (2002) sowohl an BRCA-heterozygoten Fibroblasten wie auch Lymphozyten (Kontrollen n=28; *BRCA1* n=18; *BRCA2* n=6), dass die Reparatur strahleninduzierter Schäden in Zellen mit nur einem funktionellen BRCA-Allel nicht verlangsamt war. Es wird aufgrund der großen Variabilität in der DNA-DSB-Reparatur vermutet, dass durch bisher unentdeckte Faktoren, die Veränderungen der Reparaturkapazität aufgrund von Heterozygotie für BRCA maskiert werden. Bezugnehmend auf die ausschließliche Funktion von BRCA1 in der HR, die in früheren Studien angenommen wurde, folgerten die Autoren, dass die

durch BRCA-Mutationen bedingten Defekte in der DNA-DSB-Reparatur nicht detektierbar sind, da das NHEJ der meistgenutzte Mechanismus zur Elimination von DSB in Säugerzellen ist, und somit die Defekte in der HR überdeckt. Es sollte allerdings beachtet werden, dass in der PFGE wie auch im Comet-Assay ausschließlich die Fähigkeit der Zellen zur Ligation von DNA-DSB gemessen wird, eine Aussage über die Genauigkeit der Reparatur kann jedoch nicht getroffen werden. Eine vergleichbare Reparaturkinetik der Zellen mit BRCA-Mutation und ohne BRCA-Mutation steht folglich nicht im Widerspruch zu den Befunden von Baldeyron et al. (2002), die eine erhöhte Rate an fehlerhaftem NHEJ in BRCA-heterozygoten LCL detektieren konnten. Die Effizienz, DSB zu verschließen, war auch in diesen Experimenten in allen LCL vergleichbar. Es ist daher zu vermuten, dass in BRCA-heterozygoten Zellen eine fehlerhafte DNA-Reparatur abläuft. In weiteren Untersuchungen muss noch geklärt werden, ob ein direkter Zusammenhang zwischen diesem Reparaturdefekt und der chromosomalen Mutagensensitivität im MNT besteht.

Insgesamt zeigen die Untersuchungen an LCL, dass trotz einzelner Beobachtungen, die auf eine Mutagensensitivität auf Grund einer BRCA-Mutation hinweisen, dies kein allgemeines Charakteristikum dieser Zelllinien ist. Deshalb sind LCL nur sehr eingeschränkt zur Charakterisierung der chromosmalen Mutagensensitivität geeignet.

# 5 Zusammenfassung

Mutagensensitivität ist ein Merkmal vieler Krebserkrankungen. Auch bei einigen Brustkrebspatienten wurde eine erhöhte chromosomale Strahlensensitivität detektiert. In meiner Arbeit sollte im Mikronukleustest und im Comet-Assay untersucht werden, ob ein Zusammenhang zwischen *BRCA1*- oder *BRCA2*-Mutationen und Mutagensensitivität besteht. Des Weiteren sollten lymphoblastoide Zelllinien (LCL) auf ihre Eignung als Modell zu Untersuchungen der Mutagensensitivität und den zugrunde liegenden Mechanismen untersucht werden.

Die Untersuchung von Lymphozyten *BRCA1*- und *BRCA2*-heterozygoter Frauen im Mikronukleustest ließ eine erhöhte chromosomale Sensitivität erkennen. Sowohl gegenüber ionisierender Strahlung, wie auch nach Behandlung mit $H_2O_2$ wurde dieser Effekt deutlich. Eine Unterscheidung zwischen Zellen mit *BRCA1*- und *BRCA2*-Mutation ist allerdings aufgrund dieser Daten im MNT nicht möglich. Mit dem Comet-Assay konnte weder in der alkalischen Version noch in der neutralen Version ein Unterschied zwischen Zellen mit und ohne BRCA-Mutation hinsichtlich Induktion und Reparatur strahleninduzierter Schäden festgestellt werden. Der Vergleich der Ergebnisse aus Mikronukleustest und Comet-Assay deutet darauf hin, dass in Zellen mit BRCA-Mutation nicht die Geschwindigkeit der Reparatur, sondern die Genauigkeit der Reparatur betroffen ist. Die mit verschiedenen Cytostatika durchgeführten Experimente im MNT ließen eine erhöhte chromosomale Mutagensensitivität der *BRCA1*-heterozygoten Lymphozyten nach Behandlung mit DNA-schädigenden Substanzen erkennen, nicht jedoch nach Behandlung mit Spindelgiften.

Die Untersuchung der BRCA-heterozygoten Lymphozyten im Mikronukleustest bestätigt eine Funktion beider Genprodukte in der Reparatur von DNA-DSB, allerdings deutet die Sensitivität gegenüber $H_2O_2$ auf einen zusätzlichen Defekt in der Reparatur oxidativer Schäden hin, was für BRCA1-heterozygote Zellen bereits angenommen wurde, nicht jedoch für Zellen mit Defekt im *BRCA2*-Gen. Die kürzlich entdeckte Assoziation von BRCA1 mit dem BASC-Komplex, deutet eine zentrale Rolle von BRCA1 im Erhalt der genomischen Stabilität durch Interaktion mit verschiedenen DNA-Reparatur-Mechanismen an. Die im Mikronukleustest durch

verschiedenen Cytostatika hervorgerufene Mutagensensitivität *BRCA1*-heterozygoter Zellen unterstützt diese postulierte Funktion von BRCA1. Da einige der hier untersuchten Cytostatika in der Brustkrebstherapie routinemäßig angewandt werden, sollte beachtet werden, dass Frauen mit einer Mutation im *BRCA1*-Gen möglicherweise ein erhöhtes Risiko für die Entstehung von Mutationen und sekundären Karzinomen durch die Krebstherapie haben.

Die Experimente an Zelllinien zeigten, dass die untersuchten LCL mit einer *BRCA1*-Mutation keine Mutagensensitivität aufweisen im Unterschied zu Lymphozyten mit derselben Mutation. Trotz detaillierter Charakterisierung der 6 verwendeten Zelllinien hinsichtlich Chromosomenzahl, Toxizität, Zellzyklusverteilung und Expression des *BRCA1*-Gens konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen Zelllinien mit und ohne *BRCA1*-Mutation festgestellt werden. Auch mit den Methoden zum Nachweis von DNA-Strangbrüchen, DNA-DSB-Reparatur (neutraler Comet-Assay, Pulsfeldgelelektrophorese) wie auch der Comet-FISH-Methode zum Nachweis von genregionspezifischer Reparatur, konnte kein Unterschied in der Induktion oder der Reparatur strahleninduzierter Schäden nachgewiesen werden. Die Verwendung lymphoblastoider Zelllinien mit *BRCA1*-Mutation als Modellsystem für Untersuchungen zur Mutagensensitivität und den ihr zugrunde liegenden Mechanismen scheint aufgrund der hier erhobenen Daten limitiert zu sein, da eine Transformation von Lymphozyten zum Verlust der Mutagensensitivität führen kann.

# 6 Literaturverzeichnis

Abbott DW, Thompson ME, Robinson-Benion C, Tomlinson G, Jensen RA, Holt JT: BRCA1 expression restores radiation resistance in BRCA1-defective cancer cells through enhancement of transcription-coupled DNA repair. J Biol Chem 274:18808-18812 (1999).

Abrahams PJ, Houweling A, Cornelissen-Steijger PD, Jaspers NG, Darroudi F, Meijers CM, Mullenders LH, Filon R, Arwert F, Pinedo HM, Natarajan AP, Terleth C, Van Zeeland AA, van der Eb AJ: Impaired DNA repair capacity in skin fibroblasts from various hereditary cancer-prone syndromes. Mutat Res 407:189-201 (1998).

Alapetite C, Thirion P, de la RA, Cosset JM, Moustacchi E: Analysis by alkaline comet assay of cancer patients with severe reactions to radiotherapy: defective rejoining of radioinduced DNA strand breaks in lymphocytes of breast cancer patients. Int J Cancer 83:83-90 (1999).

Andres JL, Fan S, Turkel GJ, Wang JA, Twu NF, Yuan RQ, Lamszus K, Goldberg ID, Rosen EM: Regulation of BRCA1 and BRCA2 expression in human breast cancer cells by DNA-damaging agents3. Oncogene 16:2229-2241 (1998).

Baeyens A, Thierens H, Claes K, Poppe B, Messiaen L, De Ridder L, Vral A: Chromosomal radiosensitivity in breast cancer patients with a known or putative genetic predisposition. Br J Cancer 87:1379-1385 (2002).

Baeyens A, Thierens H, De Ridder L, Vral A: A comparison of the cytogenetic response to irradiation of resting peripheral blood lymphocytes, IL-2 stimulated lymphocytes and EBV-tansformed lymphoblastoid cells. Posterpräsentation auf der 33. Jahrestaguung der EEMS in Aberdeen, 24.-28. August 2003.

Baldeyron C, Jacquemin E, Smith J, Jacquemont C, De O, I, Gad S, Feunteun J, Stoppa-Lyonnet D, Papadopoulo D: A single mutated BRCA1 allele leads to impaired fidelity of double strand break end-joining. Oncogene 21:1401-1410 (2002).

Baria K, Warren C, Roberts SA, West CM, Evans DG, Varley JM, Scott D: Correspondence re: A. Rothfuss et al., Induced micronucleus frequencies in peripheral blood lymphocytes as a screening test for carriers of a BRCA1 mutation in breast cancer families. Cancer Res., 60: 390-394, 2000. Cancer Res 61:5948-5949 (2001a).

Baria K, Warren C, Roberts SA, West CM, Scott D: Chromosomal radiosensitivity as a marker of predisposition to common cancers? Br J Cancer 84:892-896 (2001b).

Bebb DG, Steele PP, Warrington PJ, Moffat JA, Glickman BW: Caffeine does not potentiate gamma-radiation induced DNA damage in ataxia telangiectasia lymphoblastoid cells. Mutat Res 401:27-32 (1998).

Berwick M, Vineis P: Markers of DNA repair and susceptibility to cancer in humans: an epidemiologic review. J Natl Cancer Inst 92:874-897 (2000).

Bhattacharyya A, Ear US, Koller BH, Weichselbaum RR, Bishop DK: The breast cancer susceptibility gene BRCA1 is required for subnuclear assembly of Rad51 and survival following treatment with the DNA cross-linking agent cisplatin. J Biol Chem 275:23899-23903 (2000).

Bochar DA, Wang L, Beniya H, Kinev A, Xue Y, Lane WS, Wang W, Kashanchi F, Shiekhattar R: BRCA1 is associated with a human SWI/SNF-related complex: linking chromatin remodeling to breast cancer. Cell 102:257-265 (2000).

Buchholz TA, Wu X, Hussain A, Tucker SL, Mills GB, Haffty B, Bergh S, Story M, Geara FB, Brock WA: Evidence of haplotype insufficiency in human cells containing a germline mutation in BRCA1 or BRCA2. Int J Cancer 97:557-561 (2002).

Burrill W, Barber JB, Roberts SA, Bulman B, Scott D: Heritability of chromosomal radiosensitivity in breast cancer patients: a pilot study with the lymphocyte micronucleus assay. Int J Radiat Biol 76:1617-1619 (2000).

Calabretta B, Kaczmarek L, Selleri L, Torelli G, Ming PM, Ming SC, Mercer WE: Growth-dependent expression of human Mr 53,000 tumor antigen messenger RNA in normal and neoplastic cells. Cancer Res 46:5738-5742 (1986).

Castilla LH, Couch FJ, Erdos MR, Hoskins KF, Calzone K, Garber JE, Boyd J, Lubin MB, Deshano ML, Brody LC, .: Mutations in the BRCA1 gene in families with early-onset breast and ovarian cancer. Nat Genet 8:387-391 (1994).

Chapman MS, Verma IM: Transcriptional activation by BRCA1. Nature 382:678-679 (1996).

Chen J, Silver DP, Walpita D, Cantor SB, Gazdar AF, Tomlinson G, Couch FJ, Weber BL, Ashley T, Livingston DM, Scully R: Stable interaction between the products of the BRCA1 and BRCA2 tumor suppressor genes in mitotic and meiotic cells. Mol Cell 2:317-328 (1998).

Chen JJ, Silver D, Cantor S, Livingston DM, Scully R: BRCA1, BRCA2, and Rad51 operate in a common DNA damage response pathway. Cancer Res 59:1752s-1756s (1999).

Cianciulli AM, Venturo I, Leonardo F, Antoniaci S, Greco C, Lopez M, Gandolfo GM: Mutagen sensitivity and cancer susceptibility in patients with multiple primary cancers. Oncology Reports 2:1021-1025 (1995).

Connor F, Bertwistle D, Mee PJ, Ross GM, Swift S, Grigorieva E, Tybulewicz VL, Ashworth A: Tumorigenesis and a DNA repair defect in mice with a truncating Brca2 mutation. Nat Genet 17:423-430 (1997).

Cortez D, Wang Y, Qin J, Elledge SJ: Requirement of ATM-dependent phosphorylation of brca1 in the DNA damage response to double-strand breaks. Science 286:1162-1166 (1999).

Deng CX, Brodie SG: Roles of BRCA1 and its interacting proteins. Bioessays 22:728-737 (2000).

Duffaud F, Orsiere T, Villani P, Pelissier AL, Volot F, Favre R, Botta A: Comparison between micronucleated lymphocyte rates observed in healthy subjects and cancer patients. Mutagenesis 12:227-231 (1997).

Easton D: Familial risks of cancer. Eur J Cancer 35:1043-1045 (1999).

Evans MK, Taffe BG, Harris CC, Bohr VA: DNA strand bias in the repair of the p53 gene in mormal and xeroderma pigmentosum group C fibroblasts. Cancer Res. 53:5377-5381 (1993).

Fenech M, Morley AA: Measurement of micronuclei in lymphocytes. Mutat Res 147:29-36 (1985).

Fenech M, Denham J, Francis W, Morley A: Micronuclei in cytokinesis-blocked lymphocytes of cancer patients following fractionated partial-body radiotherapy. Int J Radiat Biol 57:373-383 (1990).

Fenech M: The cytokinesis-block micronucleus technique and its application to genotoxicity studies in human populations. Environ Health Perspect 101 Suppl 3:101-107 (1993).

Fenech M: The cytokinesis-block micronucleus technique. In Pfeifer G (Hrsg): Technologies for detection of DNA damage and mutations, Plenum press, New York. 25-36 (1996).

Fenech M: The advantages and disadvantages of the cytokinesis-block micronucleus method. Mutat Res 392:11-18 (1997).

Foray N, Randrianarison V, Marot D, Perricaudet M, Lenoir G, Feunteun J: Gamma-rays-induced death of human cells carrying mutations of BRCA1 or BRCA2. Oncogene 18:7334-7342 (1999).

Ford JM, Lommel L, Hanawalt PC: Preferential repair of ultraviolet light-induced DNA damage in the transcribed strand of the human p53 gene. Mol. Carcinog. 10:105-109 (1994).

Ford D, Easton DF, Stratton M, Narod S, Goldgar D, Devilee P, Bishop DT, Weber B, Lenoir G, Chang-Claude J, Sobol H, Teare MD, Struewing J, Arason A, Scherneck S, Peto J, Rebbeck TR, Tonin P, Neuhausen S, Barkardottir R, Eyfjord J, Lynch H, Ponder BA, Gayther SA, Zelada-Hedman M, .: Genetic heterogeneity and penetrance analysis of the BRCA1 and BRCA2 genes in breast cancer families. The Breast Cancer Linkage Consortium. Am J Hum Genet 62:676-689 (1998).

Friedman LS, Ostermeyer EA, Szabo CI, Dowd P, Lynch ED, Rowell SE, King MC: Confirmation of BRCA1 by analysis of germline mutations linked to breast and ovarian cancer in ten families. Nat Genet 8:399-404 (1994).

Futaki M, Liu JM: Chromosomal breakage syndromes and the BRCA1 genome surveillance complex. Trends Mol Med 7:560-565 (2001).

Gaffney DK, Brohet RM, Lewis CM, Holden JA, Buys SS, Neuhausen SL, Steele L, Avizonis V, Stewart JR, Cannon-Albright LA: Response to radiation therapy and prognosis in breast cancer patients with BRCA1 and BRCA2 mutations. Radiother Oncol 47:129-136 (1998).

Gantenberg HW, Wuttke K, Streffer C, Muller WU: Micronuclei in human lymphocytes irradiated in vitro or in vivo. Radiat Res 128:276-281 (1991).

Gatei M, Scott SP, Filippovitch I, Soronika N, Lavin MF, Weber B, Khanna KK: Role for ATM in DNA damage-induced phosphorylation of BRCA1. Cancer Res 60:3299-3304 (2000).

Gayther SA, Ponder BA: Mutations of the BRCA1 and BRCA2 genes and the possibilities for predictive testing. Mol Med Today 3:168-174 (1997).

Gowen LC, Avrutskaya AV, Latour AM, Koller BH, Leadon SA: BRCA1 required for transcription-coupled repair of oxidative DNA damage. Science 281:1009-1012 (1998).

Haber JE: The many interfaces of Mre11. Cell 95:583-586 (1998).

Hall JM, Lee MK, Newman B, Morrow JE, Anderson LA, Huey B, King MC: Linkage of early-onset familial breast cancer to chromosome 17q21. Science 250:1684-1689 (1990).

Hanawalt PC: Subpathways of nucleotide excision repair and their regulation. Oncogene 21:8949-8956 (2002).

Hansson K, Natarajan AT, Kihlman BA: Effect of caffeine in $G_2$ on X-ray-induced chromosomal aberrations and mitotic inhibition in ataxia telangiectasia fibroblast and lymphoblastoid cells. Hum Genet 67:329-335 (1984).

Helzlsouer KJ, Harris EL, Parshad R, Fogel S, Bigbee WL, Sanford KK: Familial clustering of breast cancer: possible interaction between DNA repair proficiency and radiation exposure in the development of breast cancer. Int J Cancer 64:14-17 (1995).

Helzlsouer KJ, Harris EL, Parshad R, Perry HR, Price FM, Sanford KK: DNA repair proficiency: potential susceptiblity factor for breast cancer. J Natl Cancer Inst 88:754-755 (1996).

Hoeijmakers JH: Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. Nature 411:366-374 (2001).

Howlett NG, Taniguchi T, Olson S, Cox B, Waisfisz Q, Die-Smulders C, Persky N, Grompe M, Joenje H, Pals G, Ikeda H, Fox EA, D'Andrea AD: Biallelic inactivation of BRCA2 in Fanconi anemia. Science 297:606-609 (2002).

Hsu LC, White RL: BRCA1 is associated with the centrosome during mitosis. Proc Natl Acad Sci U S A 95:12983-12988 (1998).

Hu JJ, Smith TR, Miller MS, Lohman K, Case LD: Genetic regulation of ionizing radiation sensitivity and breast cancer risk. Environ Mol Mutagen 39:208-215 (2002).

Husain A, He G., Venkatraman ES, Spriggs DR: BRCA1 up-regulation is associated with repair-mediated resistance to cis-diamminedichloroplatinum. Cancer Res. 58:1120-1123 (1998).

Jagetia GC, Jayakrishnan A, Fernandes D, Vidyasagar MS: Evaluation of micronuclei frequency in the cultured peripheral blood lymphocytes of cancer patients before and after radiation treatment. Mutat Res 491:9-16 (2001).

Jaloszynski P, Kujawski M, Czub-Swierczek M, Markowska J, Szyfter K: Bleomycin-induced DNA damage and its removal in lymphocytes of breast cancer patients studied by comet assay. Mutat Res 385:223-233 (1997).

Kerr P, Ashworth A: New complexities for BRCA1 and BRCA2. Curr Biol 11:R668-R676 (2001).

Khanna KK, Jackson SP: DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. Nat Genet 27:247-254 (2001).

Lafarge S, Sylvain V, Ferrara M, Bignon YJ: Inhibition of BRCA1 leads to increased chemoresistance to microtubule-interfering agents, an effect that involves the JNK pathway. Oncogene 20:6597-6606 (2001).

Langer PR, Waldrop AA, Ward DC: Enzymatic synthesis of biotin-labeled polynucleotides: novel nucleic acid affinity probes. Proc Natl Acad Sci U S A 78:6633-6637 (1981).

Latt SA, Allen J, Bloom SE, Carrano A, Falke E, Kram D, Schneider E, Schreck R, Tice R, Whitfield B, Wolff S: Sister-chromatid exchanges: a report of the GENE-TOX program. Mutat Res 87:17-62 (1981).

Lavin MF, Bennett I, Ramsay J, Gardiner RA, Seymour GJ, Farrell A, Walsh M: Identification of a potentially radiosensitive subgroup among patients with breast cancer. J Natl Cancer Inst 86:1627-1634 (1994).

Le Page F, Randrianarison V, Marot D, Cabannes J, Perricaudet M, Feunteun J, Sarasin A: BRCA1 and BRCA2 are necessary for the transcription-coupled repair of the oxidative 8-oxoguanine lesion in human cells. Cancer Res 60:5548-5552 (2000).

Li S, Chen PL, Subramanian T, Chinnadurai G, Tomlinson G, Osborne CK, Sharp ZD, Lee WH: Binding of CtIP to the BRCT repeats of BRCA1 involved in the transcription regulation of p21 is disrupted upon DNA damage. J Biol Chem 274:11334-11338 (1999).

Marmorstein LY, Kinev AV, Chan GK, Bochar DA, Beniya H, Epstein JA, Yen TJ, Shiekhattar R: A human BRCA2 complex containing a structural DNA binding component influences cell cycle progression. Cell 104:247-257 (2001).

McKay BC, Ljungman M, Rainbow AJ: Potental roles for p53 in nucleotide excision repair. Carcinogenesis 20: 1389-1396 (1986).

McKelvey-Martin VJ, Ho ET, McKeown SR, Johnston SR, McCarthy PJ, Rajab NF, Downes CS: Emerging applications of the single cell gel electrophoresis (Comet) assay. I. Management of invasive transitional cell human bladder carcinoma. II. Fluorescent in situ hybridization Comets for the identification of damaged and repaired DNA sequences in individual cells. Mutagenesis 13:1-8 (1998).

McKenna DJ, Gallus M, McKeown SR, Downes CS, McKelvey-Martin VJ: Modification of the alkaline Comet assay to allow simultaneous evaluation of mitomycin C-induced DNA cross-link damage and repair of specific DNA sequences in RT4 cells. DNA Repair (Amst) 2:879-890 (2003a).

McKenna DJ, Rajab NF, McKeown SR, McKerr G, McKelvey-Martin VJ: Use of the comet-FISH assay to demonstrate repair of the TP53 gene region in two human bladder carcinoma cell lines. Radiat Res 159:49-56 (2003b).

Miki Y, Swensen J, Shattuck-Eidens D, Futreal PA, Harshman K, Tavtigian S, Liu Q, Cochran C, Bennett LM, Ding W, .: A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. Science 266:66-71 (1994).

Miller BM, Zitzelsberger HF, Weier HU, Adler ID: Classification of micronuclei in murine erythrocytes: immunofluorescent staining using CREST antibodies compared to in situ hybridization with biotinylated gamma satellite DNA. Mutagenesis 6:297-302 (1991).

Moynahan ME, Chiu JW, Koller BH, Jasin M: Brca1 controls homology-directed DNA repair. Mol Cell 4:511-518 (1999).

Moynahan ME, Cui TY, Jasin M: Homology-directed dna repair, mitomycin-c resistance, and chromosome stability is restored with correction of a Brca1 mutation. Cancer Res 61:4842-4850 (2001).

Musk SR, Steel GG: Override of the radiation-induced mitotic block in human tumour cells by methylxanthines and its relationship to the potentiation of cytotoxicity. Int J Radiat Biol 57:1105-1112 (1990).

Nathanson KL, Antin-Ozerkis D, Couch FJ, Weber BL: I1307K APC variant in non-Ashkenazi Jewish women affected with breast cancer. Am J Med Genet 85:189-190 (1999).

Nathanson KL, Wooster R, Weber BL, Nathanson KN: Breast cancer genetics: what we know and what we need. Nat Med 7:552-556 (2001).

Nieuwenhuis B, Assen-Bolt AJ, Waarde-Verhagen MA, Sijmons RH, Van der Hout AH, Bauch T, Streffer C, Kampinga HH: BRCA1 and BRCA2 heterozygosity and repair of X-ray-induced DNA damage. Int J Radiat Biol 78:285-295 (2002).

Obe G, Pfeiffer P, Savage JR, Johannes C, Goedecke W, Jeppesen P, Natarajan AT, Martinez-Lopez W, Folle GA, Drets ME: Chromosomal aberrations: formation, identification and distribution. Mutat Res 504:17-36 (2002).

Parshad R, Price FM, Bohr VA, Cowans KH, Zujewski JA, Sanford KK: Deficient DNA repair capacity, a predisposing factor in breast cancer. Br J Cancer 74:1-5 (1996).

Patel KJ, Yu VP, Lee H, Corcoran A, Thistlethwaite FC, Evans MJ, Colledge WH, Friedman LS, Ponder BA, Venkitaraman AR: Involvement of Brca2 in DNA repair. Mol Cell 1:347-357 (1998).

Patel RK, Trivedi AH, Arora DC, Bhatavdekar JM, Patel DD: DNA repair proficiency in breast cancer patients and their first-degree relatives. Int J Cancer 73:20-24 (1997).

Paull TT, Cortez D, Bowers B, Elledge SJ, Gellert M: Direct DNA binding by Brca1. Proc Natl Acad Sci U S A 98:6086-6091 (2001).

Peto J, Collins N, Barfoot R, Seal S, Warren W, Rahman N, Easton DF, Evans C, Deacon J, Stratton MR: Prevalence of BRCA1 and BRCA2 gene mutations in patients with early-onset breast cancer. J Natl Cancer Inst 91:943-949 (1999).

Rahman N; Stratton MR: The genetics of breast cancer susceptibility. Annu.Rev. Genet. 32:95-121 (1998).

Rajeswari N, Ahuja YR, Malini U, Chandrashekar S, Balakrishna N, Rao KV, Khar A: Risk assessment in first degree female relatives of breast cancer patients using the alkaline Comet assay. Carcinogenesis 21:557-561 (2000).

Ramsay J, Birrell G: Normal tissue radiosensitivity in breast cancer patients. Int J Radiat Oncol Biol Phys 31:339-344 (1995).

Rao NM, Pai SA, Shinde SR, Ghosh SN: Reduced DNA repair capacity in breast cancer patients and unaffected individuals from breast cancer families. Cancer Genet Cytogenet 102:65-73 (1998).

Rapp A, Bock C, Dittmar H, Greulich KO: UV-A breakage sensitivity of human chromosomes as measured by COMET-FISH depends on gene density and not on the chromosome size. J Photochem Photobiol B 56:109-117 (2000).

Ribieras S, Magdinier F, Leclerc D, Lenoir G, Frappart L, Dante R: Abundance of BRCA1 transcripts in human cancer and lymphoblastoid cell lines carrying BRCA1 germ-line alterations. Int J Cancer 73:715-718 (1997).

Riches AC, Bryant PE, Steel CM, Gleig A, Robertson AJ, Preece PE, Thompson AM: Chromosomal radiosensitivity in $G_2$-phase lymphocytes identifies breast cancer patients with distinctive tumour characteristics. Br J Cancer 85:1157-1161 (2001).

Roberts SA, Spreadborough AR, Bulman B, Barber JB, Evans DG, Scott D: Heritability of cellular radiosensitivity: a marker of low-penetrance predisposition genes in breast cancer? Am J Hum Genet 65:784-794 (1999).

Rothfuss A, Schutz P, Bochum S, Volm T, Eberhardt E, Kreienberg R, Vogel W, Speit G: Induced micronucleus frequencies in peripheral lymphocytes as a screening test for carriers of a BRCA1 mutation in breast cancer families. Cancer Res 60:390-394 (2000).

Roy SK, Trivedi AH, Bakshi SR, Patel RK, Shukla PH, Patel SJ, Bhatavdekar JM, Patel DD, Shah PM: Spontaneous chromosomal instability in breast cancer families. Cancer Genet Cytogenet 118:52-56 (2000a).

Roy SK, Trivedi AH, Bakshi SR, Patel SJ, Shukla PH, Bhatavdekar JM, Patel DD, Shah PM: Bleomycin-induced chromosome damage in lymphocytes indicates inefficient DNA repair capacity in breast cancer families. J Exp Clin Cancer Res 19:169-173 (2000b).

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR: DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc Natl Acad Sci U S A 74:5463-5467 (1977).

Sarkaria JN, Busby EC, Tibbetts RS, Roos P, Taya Y, Karnitz LM, Abraham RT: Inhibition of ATM and ATR kinase activities by the radiosensitizing agent, caffeine. Cancer Res 59:4375-4382 (1999).

Santos SJ, Singh NP, Natarajan AT: Fluorescence in situ hybridisierung with comets. Exp.Cell Res. 232:407-411 (1997).

Schempp W, Vogel W: Difference between diploid and aneuploid Chinese hamster cells in replication at mid-S-phase. Chromosoma 73:109-115 (1979).

Scott D, Barber JB, Levine EL, Burrill W, Roberts SA: Radiation-induced micronucleus induction in lymphocytes identifies a high frequency of radiosensitive cases among breast cancer patients: a test for predisposition? Br J Cancer 77:614-620 (1998).

Scott D, Barber JB, Spreadborough AR, Burrill W, Roberts SA: Increased chromosomal radiosensitivity in breast cancer patients: a comparison of two assays. Int J Radiat Biol 75:1-10 (1999).

Scott D, Spreadborough A, Levine E, Roberts SA: Genetic predisposition in breast cancer. Lancet 344:1444 (1994).

Scully R, Chen J, Plug A, Xiao Y, Weaver D, Feunteun J, Ashley T, Livingston DM: Association of BRCA1 with Rad51 in mitotic and meiotic cells. Cell 88:265-275 (1997).

Scully R, Ganesan S, Vlasakova K, Chen J, Socolovsky M, Livingston DM: Genetic analysis of BRCA1 function in a defined tumor cell line. Mol Cell 4:1093-1099 (1999).

Sharan SK, Morimatsu M, Albrecht U, Lim DS, Regel E, Dinh C, Sands A, Eichele G, Hasty P, Bradley A: Embryonic lethality and radiation hypersensitivity mediated by Rad51 in mice lacking Brca2. Nature 386:804-810 (1997).

Shen SX, Weaver Z, Xu X, Li C, Weinstein M, Chen L, Guan XY, Ried T, Deng CX: A targeted disruption of the murine Brca1 gene causes gamma-irradiation hypersensitivity and genetic instability. Oncogene 17:3115-3124 (1998).

Simard J, Tonin P, Durocher F, Morgan K, Rommens J, Gingras S, Samson C, Leblanc JF, Belanger C, Dion F, .: Common origins of BRCA1 mutations in Canadian breast and ovarian cancer families. Nat Genet 8:392-398 (1994).

Singh NP; McCoy MT; Tice RR, Schneider EL: A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. Exp Cell Res. 175: 184-191 (1988).

Singh NP, Stephens RE: Microgel electrophoresis: sensitivity, mechanisms, and DNA electrostretching. Mutat Res 383:167-175 (1997).

Smith TR, Miller MS, Lohman KK, Case LD, Hu JJ: DNA damage and breast cancer risk. Carcinogenesis 24:883-889 (2003).

Snouwaert JN, Gowen LC, Latour AM, Mohn AR, Xiao A, DiBiase L, Koller BH: BRCA1 deficient embryonic stem cells display a decreased homologous recombination frequency and an increased frequency of non-homologous recombination that is corrected by expression of a Brca1 trasgene. Oncogene 18:7900-7907 (1999).

Speit G, Habermeier B, Helbig R: Differences in the response to mutagens between two V79 sublines. Mutat Res 325:105-111 (1994).

Speit G, Hartmann A: The comet assay (single-cell gel test). A sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage and repair. Methods Mol Biol 113:203-212 (1999).

Speit G, Trenz K, Schutz P, Bendix R, Dork T: Mutagen sensitivity of human lymphoblastoid cells with a BRCA1 mutation in comparison to ataxia telangiectasia heterozygote cells. Cytogenet Cell Genet 91:261-266 (2000).

Su J, Ciftci K: Changes in BRCA1 and BRCA2 expression produced by chemotherapeutic agents in human breast cancer cells. Int J Biochem Cell Biol 34:950-957 (2002).

Swierenga SH, Heddle JA, Sigal EA, Gilman JP, Brillinger RL, Douglas GR, Nestmann ER: Recommended protocols based on a survey of current practice in genotoxicity testing laboratories, IV. Chromosome aberration and sister-chromatid exchange in Chinese hamster ovary, V79 Chinese hamster lung and human lymphocyte cultures. Mutat Res 246:301-322 (1991).

Tzancheva M, Komitowski D: Latent chromosomal instability in cancer patients. Hum. Gen. 99:47-51 (1997).

Teare MD, Wallace SA, Harris M, Howell A, Birch JM: Cancer experience in the relatives of an unselected series of breast cancer patients. Br J Cancer 70:102-111 (1994).

Thompson ME, Jensen RA, Obermiller PS, Page DL, Holt JT: Decreased expression of BRCA1 accelerates growth and is often present during sporadic breast cancer progression. Nat Genet 9:444-450 (1995).

Tice R: The single cell gel/comet assay: a microgel electrophoretic technique for the detection of DNA damage and repair in individual cells. In: Environmental Mutagenesis S. 315-339. BIOS Scientific Publishers Ltd., Oxford (1995).

Tomlinson GE, Chen TT, Stastny VA, Virmani AK, Spillman MA, Tonk V, Blum JL, Schneider NR, Wistuba II, Shay JW, Minna JD, Gazdar AF: Characterization of a breast cancer cell line derived from a germ-line BRCA1 mutation carrier. Cancer Res 58:3237-3242 (1998).

Venkatachalam P, Paul SFD, Mohankumar MN Prabhu BK, Gajendran N, Kathiresan A, Jeevanram RK: Higher frequency of dicentrics and micronuclei in peripheral blood lymphocytes of cancer patients. Mutat. Res. 425:1-8 (1999).

Venkitaraman AR: Functions of BRCA1 and BRCA2 in the biological response to DNA damage. J Cell Sci 114:3591-3598 (2001).

Venkitaraman AR: Cancer susceptibility and the functions of BRCA1 and BRCA2. Cell 108:171-182 (2002).

Vral A, Beayens A, Thierens H, Claes K, Poppe B, Messiaen L, De Ridder L: Chromosomal radiosensitivity in BRCA1 and 2 patients and healthy carriers. Vortrag auf der 33. Jahrestaguung der EEMS in Aberdeen, 24.-28.August 2003.

Wang H, Zeng ZC, Bui TA, DiBiase SJ, Qin W, Xia F, Powell SN, Iliakis G: Nonhomologous end-joining of ionizing radiation-induced DNA double-stranded breaks in human tumor cells deficient in BRCA1 or BRCA2. Cancer Res 61:270-277 (2001).

Wang Y, Cortez D, Yazdi P, Neff N, Elledge SJ, Qin J: BASC, a super complex of BRCA1-associated proteins involved in the recognition and repair of aberrant DNA structures. Genes Dev 14:927-939 (2000).

Ward JF, Blakely WF, Joner EI: Mammalian cells are not killed by DNA single-strand breaks caused by hydroxyl radicals from hydrogen peroxide. Radiat Res 103:383-392 (1985).

Welcsh PL, Owens KN, King MC: Insights into the functions of BRCA1 and BRCA2. Trends Genet 16:69-74 (2000).

Wojewodzka M, Buraczewska I, Kruszewski M: A modified neutral comet assay: elimination of lysis at high temperature and validation of the assay with anti-single-stranded DNA antibody. Mutat Res 518:9-20 (2002).

Wong AK, Pero R, Ormonde PA, Tavtigian SV, Bartel PL: RAD51 interacts with the evolutionarily conserved BRC motifs in the human breast cancer susceptibility gene brca2. J Biol Chem 272:31941-31944 (1997).

Wooster R, Bignell G, Lancaster J, Swift S, Seal S, Mangion J, Collins N, Gregory S, Gumbs C, Micklem G: Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA2. Nature 378:789-792 (1995).

Wooster R, Neuhausen SL, Mangion J, Quirk Y, Ford D, Collins N, Nguyen K, Seal S, Tran T, Averill D, .: Localization of a breast cancer susceptibility gene, BRCA2, to chromosome 13q12-13. Science 265:2088-2090 (1994).

Xu X, Weaver Z, Linke SP, Li C, Gotay J, Wang XW, Harris CC, Ried T, Deng CX: Centrosome amplification and a defective $G_2$-M cell cycle checkpoint induce genetic instability in BRCA1 exon 11 isoform-deficient cells. Mol Cell 3:389-395 (1999).

Yuan SS, Lee SY, Chen G, Song M, Tomlinson GE, Lee EY: BRCA2 is required for ionizing radiation-induced assembly of Rad51 complex in vivo. Cancer Res 59:3547-3551 (1999).

Zampetti-Bosseler F, Scott D: The effect of caffeine on X-ray-induced mitotic delay in normal human and ataxia-telangiectasia fibroblasts. Mutat Res 143:251-256 (1985).

Zheng L, Pan H, Li S, Flesken-Nikitin A, Chen PL, Boyer TG, Lee WH: Sequence-specific transcriptional corepressor function for BRCA1 through a novel zinc finger protein, ZBRK1. Mol Cell 6:757-768 (2000).

Zhong Q, Boyer TG, Chen PL, Lee WH: Deficient Nonhomologous End-Joining Activity in Cell-free Extracts from Brca1-null Fibroblasts. Cancer Res 62:3966-3970 (2002).

Zhong Q, Chen CF, Li S, Chen Y, Wang CC, Xiao J, Chen PL, Sharp ZD, Lee WH: Association of BRCA1 with the hRad50-hMre11-p95 complex and the DNA damage response. Science 285:747-750 (1999).

Zhou BB, Chaturvedi P, Spring K, Scott SP, Johanson RA, Mishra R, Mattern MR, Winkler JD, Khanna KK: Caffeine abolishes the mammalian G(2)/M DNA damage checkpoint by inhibiting ataxia-telangiectasia-mutated kinase activity. J Biol Chem 275:10342-10348 (2000).

# DANKSAGUNG

Ich möchte mich bei allen ganz herzlich bedanken, die mich während dieser Arbeit unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gebührt meinem Doktorvater Prof. Dr. Günter Speit, der durch seine kompetente Betreuung wesentlich zu dem Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat. Er hat mir genügend Freiräume gewährt bei der Durchführung der Experimente und auch seine stete Diskussionsbereitschaft war mir immer eine wertvolle Hilfe. Zudem war es seinen Bemühungen zu verdanken, dass mir der Besuch vieler Tagungen, Workshops und Fortbildungen ermöglicht wurde, was für meine wissenschaftliche Ausbildung sehr förderlich war. Vielen Dank für die Zeit in einer guten Arbeitsgruppe mit einem netten Chef!

Herrn Prof. Dr. Walther Vogel danke ich für die Aufnahme in die Abteilung Humangenetik und sein Interesse an der Arbeit wie auch dafür, dass er den Besuch von Tagungen und Fortbildungen gefördert hat.

Herrn Prof. Dr. H.U. Wolf danke ich für die Übernahme des Korreferats.

Ein besonderer Dank gilt Andreas Rothfuß, sowohl als Arbeitskollegen als auch als gutem Freund. Neben fachlich kompetenten Ratschlägen, die er immer parat hatte, war es auch sein Humor, den ich überaus geschätzt habe. Vielen Dank, dass du dir immer für mich Zeit genommen hast, egal ob du in Ulm oder in weiter Ferne in den USA weiltest!

Ein ganz großer Dank geht an Petra Schütz, dem Sonnenschein unserer Arbeitsgruppe, die mit ihrer fröhlichen angenehmen Art, ihrer Hilfsbereitschaft und ihrem Humor immer gute Laune in den Laboralltag brachte. Petra war zudem diejenige, die stets wusste wo was steht und wie was geht, und außerdem war sie die Spezialistin im Blutabnehmen. Schön war´s mit Dir!

Danken möchte ich auch Sebastian Lugowski, Ute Jahrsdörfer und Julia Landgraf, deren Resultat während ihrer Doktor- bzw. Diplomarbeiten auch für meine Arbeit hilfreich waren. Sie trugen außerdem zu einem angenehmen Klima in der Arbeitsgruppe bei, ebenso wie Mercedes Kloss, Thomas Witton-Davies, Heike Hoffmann, Caroline Isner und Susanne Wepler.

Ein großer Dank gebührt auch Antje Kollak, die mir die Technik der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung beibrachte und bei der Durchführung und Modifikation dieser Methode stets mit wertvollen Ratschlägen und helfender Hand beiseite stand. Auch ihre aufmunternden Worte waren oft Gold wert.

Ein Dankeschön auch an Walter Just, der immer äußerst hilfsbereit bei Computerproblemen und auch sonstigen Fragen war. Ein Dank in Angelegenheit Computer geht auch an Oliver Merk und Herbert Heinz.

Ein großes Dankschön auch an alle Blutspender, die bereitwillig ihr Blut zu Verfügung stellten.

Weiterhin möchte ich auch den restlichen Mitarbeitern der Abteilung Humangenetik danken, die für ein angenehmes und freundliches Arbeitsklima gesorgt haben.

Jenny-Dewajana Wild als auch Thomas Brade möchte ich danken für das Korrekturlesen und die kritischen Anmerkungen zu meiner Arbeit. Meinem Freund Grégoire Hummel danke ich für seine moralische Unterstützung in den manchmal stressigen Zeiten. Einen großen Dank auch an Beate Fischer, die mich immer wieder aufmunterte, wenn alles nicht so lief wie es sollte.

Zuletzt geht mein ausdrücklicher Dank an meine Eltern, die immer für mich da waren und mich unterstützt haben. Ein ganz spezieller Dank auch für das Korrekturlesen meiner Arbeit!

# PUBLIKATIONSVERZEICHNIS

## 1. Publikationen, die im Zusammenhang mit dieser Arbeit entstanden sind :

Speit G., Trenz K., Schütz P., Bendix R., and Dörk T.: Mutagen sensitivity of human lymphoblastoid cells with a BRCA1 mutation in comparison to ataxia telangiectasia heterozygote cells. Cytogenet. Cell Genet.; 91: 261-266; 2000.

Trenz K. Rothfuss A., Schütz P., Speit G.: Mutagen sensitivity of peripheral blood from women carrying a BRCA1 or BRCA2 mutation. Mutat. Res. 500: 89-96; 2002.

Trenz K., Landgraf J., Speit G.: Mutagen sensitivity of human lymphoblastoid cell lines with a BRCA1 mutation. Breast Cancer Res. and Treat. 78(1): 69-79, 2003

Trenz K, Lugowski S., Jahrsdörfer U., Jainta S., Vogel W., Speit G.: Enhanced sensitivity of peripheral blood from women carrying a BRCA1 mutation towards the mutagenic effects of various cytostatic drugs; Mutat. Res, in press.

Speit G., Trenz K.: Chromosomal mutagen sensitivity associated with mutations in BRCA genes. Cytogenet. Genome Res., eingereicht.

## 2. Weitere Publikationen:

Speit G., Trenz K., Schütz P., Rothfuss A., Merk O.: The Influence of temperature during alkaline treatment and electrophoresis on results obtained with the comet assay. Toxicology letters 110: 73-78; 1999

Speit G., Schütz P., Trenz K., Rothfuss A.: Oxygenated water does not induce genotoxic effects in the comet assay. Toxicology letters 133: 203-210; 2002

Speit G., Witton-Davies T., Heepchantree W., Trenz K., Hoffmann H.: Investigations on the effect of cigarette smoking in the comet assay. Mutat.Res. in press.

Speit G., Schütz P., Bonzheim I., Trenz K., Hoffmann H.: Sensitivity of the FPG protein towards alkylation damage in the comet assay. Toxicology letters, in press

Klett VM., Boneberg EM., Trenz K., Knippers R., Illges H.: Hydrostatic pressure induces apoptosis in the human leukemic T cell line Jurkat via the mitochondrial pethway. European Journal of Immunology, eingereicht.

# TAGUNGSBEITRÄGE

Trenz K., Lugowski S., Schütz P., Speit G.: Mutagen sensitivity of lymphoblastoid cells with a BRCA1- Mutation.
30. Jahrestagung der EEMS in Budapest, 20.-26. August 2000.

Rothfuss A., Trenz K., Speit G.: The comet assay as a tool to study mutagen sensitivity in cancer predisposing conditions.
Workshop “Biomarkers of genetic and acquired susceptibility” in Bremen, 31. August 2000

Trenz K. and Speit G.: Investigation of mutagen-sensitivity using an alkaline and a neutral version of the comet assay.
4. Internationaler Comet Assay Workshop in Ulm, 22.-25. Juli 2001.

Trenz K., Schütz P., Speit G.: Mutagen-sensitivity of breast cancer patients with a BRCA mutation in the micronucleus test.
19. GUM-Tagung 2001 in Karlsruhe, 25.-28. September 2001.

Trenz K.; Landgraf,J.; Speit,G.: Can lymphoblastoid cell lines be used as a model for BRCA1-induced mutagen sensitivity?
32. Jahrestagung der EEMS in Warschau, 2.-7. September 2002.

Speit G., Trenz K., Lugowski S., Jahrsdörfer U.: Mutagen sensitivity of lymphocytes of women carrying a BRCA1 mutation.
32. Jahrestagung der EEMS in Warschau, 2.-7. September 2002.

Trenz K.; Landgraf,J.; Speit,G.: Comparative studies on mutagen sensitivity of lymphoblastoid cell lines with and without a BRCA1 mutation.
7. Symposium „DNA repair“ in Karlsruhe, 17.-20. September 2002.

Trenz K., Lugowski S., Jahrsdörfer U., Speit G.: Enhanced mutagen sensitivity of peripheral blood from women carrying a BRCA1 mutation towards the mutagenic effect of various cytostatic drugs.
7. Symposium „DNA repair“ in Karlsruhe, 17-20 September 2002.

Trenz K., Witton-Davies T., Speit G.: Modifications of the Comet Assay for an improved use in human biomonitoring
20. GUM-Tagung in Mainz, 17.-20. März 2003.

Speit G., Lugowski S., Jahrsdörfer U., Trenz K.: Mutagen sensitivity, DNA-repair deficiency and susceptibility to cancer
4. ICEMHP-Tagung in Florianopolis, 04.-08. Mai 2003

# LEBENSLAUF

| | |
|---|---|
| Name: | Kristina Trenz |
| Geboren am: | 26.02.1975 in Stuttgart |

## SCHULAUSBILDUNG

| | |
|---|---|
| 1981-1985 | Grundschule; Hohewartschule Stuttgart-Feuerbach |
| 1985-1994 | Leibniz-Gymnasium Stuttgart-Feuerbach<br>Abschluss: Abitur, Allgemeine Hochschulreife |

## HOCHSCHULAUSBILDUNG

| | |
|---|---|
| 10 / 1994 – 10 / 1999 | Studium der Biologie an der Universität Ulm |
| 11 / 1998 – 10 / 1999 | Diplomarbeit in der Abteilung Medizinische Genetik; Arbeitsgruppe Prof. Dr. Speit : Untersuchungen zum Einfluß von GST-Polymorphismen auf den genotoxischen Effekt im Comet-Assay |
| seit 02 / 2000 | Bearbeitung einer Dissertation in der Abteilung Humangenetik |
| 02 / 2000 – 10 / 2003 | Angestellte des Universitätsklinikums |
| 11 / 2003 | Promotionskolloquium |