

**Molekulargenetische und zellbiologische  
Charakterisierung primärer Fibroblasten einer  
Patientin mit konstitutiver *BRCA1*-Epimutation  
und multiplen Neoplasien im isogenen  
Zwillingsvergleich**

**Dissertation**

Zur Erlangung des Grades  
„Doktor der Naturwissenschaften“

Am Fachbereich Biologie  
Der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

**Anna Etzold (geb. Sierakowski)**

geb. am 21.02.1986

in Tarnowitz/Polen

**Mainz, 2015**



Dekan:

---

1. Berichterstatter:

---

2. Berichterstatter:

---

Tag der mündlichen Prüfung:

---



# Danksagung

# Inhaltsverzeichnis

<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>X</b>
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1 Epidemiologie der Krebserkrankungen.....	1
1.2 Genetik der Kanzerogenese.....	2
1.2.1 Onkogene.....	3
1.2.2 Tumorsuppressorgene.....	4
1.3 Ätiologie und Disposition.....	7
1.3.1 Exogene Umweltfaktoren.....	7
1.3.2 Polygene Disposition und Risikogene niedriger Penetranz.....	8
1.3.3 Monogene Disposition, Risikogene hoher Penetranz und hereditäre Tumorsyndrome.....	9
1.4 Der Tumorsuppressor <i>BRCA1</i> (BReast CAncer 1, early-onset).....	12
1.4.1 Die Struktur von <i>BRCA1</i> .....	12
1.4.2 Die Funktionen von <i>BRCA1</i> .....	14
1.4.3 <i>BRCA1</i> bei der hereditären und sporadischen Tumorgenese.....	18
1.5 Epigenetik.....	20
1.5.1 DNA-Methylierung.....	21
1.5.2 DNA-Methylierung und Krebs.....	22
1.5.2.1 Methylierungsveränderungen in der Tumorgenese.....	22
1.5.2.2 Epimutationen und hereditäre Tumordisposition.....	23
1.6 Zielsetzung der Arbeit.....	25
<b>2 Material und Methoden.....</b>	<b>27</b>
2.1 Material.....	27
2.1.1 Verwendete Geräte.....	27
2.1.2 Gebrauchsgegenstände.....	28
2.1.3 Chemikalien.....	29
2.1.4 Kommerzielle Kits.....	30
2.1.5 Software.....	31
2.1.6 Puffer, Lösungen und Medien.....	31
2.1.7 Probanden, Anamnese und Probenmaterial.....	33
2.1.8 Primärzellen und Zelllinien.....	33
2.2 Methoden.....	34
2.2.1 Zellkultur und zellbiologische Methoden.....	34
2.2.1.1 Kultivierung humaner adhärent wachsender Zellen.....	34

2.2.1.2 Subkultivierung/Passagierung .....	34
2.2.1.3 Zellzahlbestimmung .....	35
2.2.1.4 Kryokonservierung .....	35
2.2.1.5 Auftauen von kryokonservierten Zellen .....	35
2.2.1.6 Herstellen von konditioniertem Medium.....	36
2.2.1.7 Einzelzellklonierung primärer Fibroblasten .....	36
2.2.1.8 CellTiter-Glo® Lumineszenz-Zellviabilitätsassay.....	37
2.2.1.9 Migrationsstudien .....	38
2.2.1.10 Immunfluoreszenzfärbung und konfokale Laserscannmikroskopie .....	39
2.2.1.11 Zellzyklusanalyse mittels Durchflusszytometrie (FACS) .....	40
2.2.1.12 Kolorimetrische Quantifizierung von $\beta$ -Hydroxybutyrat im Zellkulturüberstand .....	41
2.2.2 Zytogenetische und molekularzytogenetische Methoden.....	41
2.2.2.1 Präparationen von Metaphasechromosomen von primären Fibroblastenkulturen .....	41
2.2.2.2 GTG-Bandenfärbung von Chromosomenpräparaten .....	42
2.2.2.3 Genomische quantitative Real-time PCR.....	42
2.2.3 Molekulargenetische Methoden .....	44
2.2.3.1 Extraktion genomischer DNA.....	45
2.2.3.2 Bisulfit-Konvertierung genomischer DNA und Pyrosequenzierung .....	45
2.2.3.3 Extraktion totaler RNA.....	47
2.2.3.4 cDNA-Synthese für die RT-qPCR.....	47
2.2.3.5 Genexpressionsanalyse mittels quantitativer Real-time Reverse- Transkription PCR (RT-qPCR) .....	49
2.2.3.6 Genexpressionsanalyse mittels Expressionsarrays.....	51
2.2.4 Proteinbiochemische Methoden.....	52
2.2.4.1 Proteinextraktion aus eukaryotischen Zellen.....	52
2.2.4.2 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)....	52
2.2.4.3 Western Blot.....	53
2.2.4.4 Immundetektion von Proteinen .....	53
<b>3 Ergebnisse.....</b>	<b>55</b>
3.1 Darstellungen projektrelevanter Ergebnisse aus anderen Arbeiten.....	55
3.2 Vergleich der <i>BRCA1</i> -Expression in <i>BRCA1</i> <sup>mosMe</sup> und <i>BRCA1</i> <sup>wt</sup> Fibroblasten auf mRNA und Protein-Ebene.....	57
3.3 Komparative Transkriptomanalyse der <i>BRCA1</i> <sup>mosMe</sup> vs. <i>BRCA1</i> <sup>wt</sup> Fibroblasten	59
3.3.1 Identifizierung von differenziell exprimierten Genen .....	59
3.3.2 Ergebnisvalidierung mittels RT-qPCR .....	62
3.3.3 Explorative, funktionelle Analyse mittels “Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery” (DAVID).....	64
3.3.4 Literaturrecherche als Vorbereitung zur Hypothesengenerierung.....	67

3.3.5 Hypothesengebundener Vergleich der Expressionsprofile von <i>BRCA1</i> <sup>mosMe</sup> Fibroblasten und CAFs .....	68
3.3.6 Hypothesengebundene „Ingenuity upstream regulator“ Analyse der Expressionsprofile <i>BRCA1</i> <sup>mosMe</sup> vs. <i>BRCA1</i> <sup>wt</sup> Fibroblasten.....	72
3.4 Komparative zellbiologische und funktionelle Charakterisierung der <i>BRCA1</i> <sup>mosMe</sup> vs. <i>BRCA1</i> <sup>wt</sup> Fibroblasten hinsichtlich CAF-typischer Eigenschaften.....	76
3.4.1 Analyse der Proliferationsgeschwindigkeit mittels CellTiter-Glo <sup>®</sup> Lumineszenz-Zellviabilitätsassay .....	76
3.4.2 Analyse des Proliferationsverhaltens mittels Immunfluoreszenzfärbung von Ki-67 .....	77
3.4.3 Zellzyklusanalyse mittels “fluorescence-activated cell sorting” (FACS) .....	79
3.4.4 Untersuchung zum <i>in vitro</i> Migrationsverhalten .....	80
3.4.5 Untersuchung des Aktin-Zytoskeletts mittels Phalloidin- Fluoreszenzfärbung .....	82
3.4.6 Indirekte Immunfluoreszenzfärbung von Kollagen I in <i>BRCA1</i> <sup>mosMe</sup> und <i>BRCA1</i> <sup>wt</sup> Fibroblasten .....	83
3.4.7 Quantifizierung von sezernierten Ketonkörpern im Zellkulturüberstand von <i>BRCA1</i> <sup>mosMe</sup> und <i>BRCA1</i> <sup>wt</sup> Fibroblasten.....	85
3.4.8 Zytogenetische Analyse der <i>BRCA1</i> <sup>mosMe</sup> vs. <i>BRCA1</i> <sup>wt</sup> Fibroblasten.....	85
3.4.9 Analyse des proliferationsfördernden Effektes von <i>BRCA1</i> <sup>mosMe</sup> und <i>BRCA1</i> <sup>wt</sup> Fibroblasten-konditioniertem Medium auf Epithel- und Krebszelllinien.....	87
3.5 Separierung des Aberrationsmosaiks durch Einzelzellklonierung der Fibroblastenkulturen <i>BRCA1</i> <sup>mosMe</sup> und <i>BRCA1</i> <sup>wt</sup> .....	89
3.5.1 Klonierungsprozedur und Beobachtungen zur Klonierungseffizienz .....	89
3.5.2 Methylierungsanalyse des <i>BRCA1</i> -Promoters in aus <i>BRCA1</i> <sup>mosMe</sup> Fibroblasten generierten Einzelzellklonen.....	90
<b>4 Diskussion.....</b>	<b>93</b>
4.1 Dermale Primärfibroblasten eines monozygoten Zwillingspaars als Untersuchungsmaterial.....	94
4.2 Mosaizismus von <i>BRCA1</i> -Aberrationen als Krebsdispositionsfaktor .....	95
4.3 Einfluss der <i>BRCA1</i> -Epimutation auf die Expression.....	96
4.4 CAF-spezifisches mRNA-Expressionsprofil in <i>BRCA1</i> <sup>mosMe</sup> Fibroblasten .....	97
4.5 Zellbiologischer Vergleich der <i>BRCA1</i> <sup>mosMe</sup> vs. <i>BRCA1</i> <sup>wt</sup> Fibroblasten hinsichtlich CAF-typischer Eigenschaften.....	100
4.5.1 <i>In vitro</i> Proliferation.....	100
4.5.2 <i>In vitro</i> Migration .....	101
4.5.3 Organisation des Zytoskeletts.....	102
4.5.4 Produktion von Ketonköpern im Energiestoffwechsel.....	103
4.5.5 Chromosomeninstabilität .....	105
4.5.6 Proliferationsmodulierendes Potenzial .....	106



---

4.6 Zusammenfassende Diskussion: Ursprünge des CAF-Phänotyps in Fibroblasten aus nicht-neoplastischem Gewebe und Auswirkungen auf die Krebs-Disposition.....	107
4.7 Implikationen zur Entwicklung chemopräventiver Maßnahmen für genetisch prädisponierte Individuen.....	109
4.8 Schlussfolgerung und Ausblick.....	111
<b>5 Anhang.....</b>	<b>113</b>
5.1 Weiterführende Charakterisierung der aus <i>BRCA1</i> <sup>mosMe</sup> Fibroblasten hervorgegangenen Einzelzellklone.....	113
5.1.1 Genomische qPCR-Analyse der Einzelzellklone zur Detektion von partiellen Deletionen der Gene <i>RSPO3</i> und <i>NREP</i> .....	113
5.1.2 Zytogenetische Analyse der Einzelzellklone.....	115
5.1.3 Transkriptomanalyse der <i>BRCA1</i> <sup>mosMe</sup> Einzelzellklone.....	115
5.1.3.1 Identifizierung differenziell exprimierter Gene.....	115
5.1.3.2 Komparative Analyse der Expressionsprofile von <i>BRCA1</i> <sup>mosMe</sup> vs. <i>BRCA1</i> <sup>wt</sup> Fibroblasten und <i>RSPO3/NREP</i> <sup>+/-</sup> vs. <i>RSPO3/NREP</i> <sup>+/+</sup> Einzelzellklone.....	118
<b>6 Literatur.....</b>	<b>119</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>153</b>
<b>Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>159</b>
<b>Curriculum Vitae.....</b>	<b>161</b>
<b>Wissenschaftliche Beiträge.....</b>	<b>163</b>

## Zusammenfassung

*BRCA1* (BReast CAncer 1, early-onset) ist ein Tumorsuppressorgen und kodiert für ein multifunktionelles Protein, das an der Erhaltung der genomischen Integrität beteiligt ist. *BRCA1*-Keimbahnmutationen sind mit einer erblichen Form von Brust- und Eierstockkrebs sowie mit erhöhtem Risiko für eine Vielzahl weiterer Tumorentitäten assoziiert. Konstitutionelle Epimutationen des *BRCA1*-Gens werden analog zu Sequenzmutationen als „Erster Hit“ im Sinne der Knudson-Hypothese und als krebsdisponierender Faktor diskutiert.

Unter Berücksichtigung neuester wissenschaftlicher Erkenntnisse, die eine entscheidende Rolle der stromalen Mikroumgebung für die Krebs-Disposition, -Initiation und -Progression belegen, wurden im Rahmen dieser Arbeit die biologischen Konsequenzen einer *BRCA1*-Haploinsuffizienz in nicht-neoplastischen Zellen mesenchymalen Ursprungs untersucht. Hierfür wurden primäre dermale Fibroblasten (*BRCA1*<sup>mosMe</sup>) einer Patientin mit lebenszeitlich früh aufgetretenen Neoplasien sowie einer konstitutionellen *BRCA1*-Epimutation auf transkriptioneller und zellbiologischer Ebene charakterisiert und mit isogenen Kontrollfibroblasten (*BRCA1*<sup>wt</sup>) der gesunden monozygoten Zwillingschwester verglichen.

Eine Microarray-basierte komparative Expressionsanalyse identifizierte 285 zwischen *BRCA1*<sup>mosMe</sup> und *BRCA1*<sup>wt</sup> Fibroblasten differenziell exprimierte Gene. Überrepräsentiert waren vor allem Gene, die für extrazelluläre Strukturproteine (z.B. COL11A1, COL5A1, FLG, KRT19), mit der extrazellulären Matrix assoziierte Faktoren (z.B. ADAM12, LOXL2, PLOD2), sowie protumorigene Wachstumsfaktoren und Chemokine (z.B. IL6, CXCL12, CXCL6, FGF5) kodieren. Der explorative Vergleich des generierten *BRCA1*<sup>mosMe</sup>-Expressionsprofils mit bereits publizierten Expressionsdaten verschiedenster Zelltypen identifizierte eine starke Analogie zu der transkriptionellen Signatur von sogenannten CAFs (Cancer associated fibroblasts).

*BRCA1*<sup>mosMe</sup> Fibroblasten zeigten im Vergleich zu *BRCA1*<sup>wt</sup> Fibroblasten veränderte zellbiologische Eigenschaften, unter anderem eine verstärkte Proliferation, Migration sowie eine abnorme Aktinarchitektur, die sich durch die vermehrte Existenz von Aktin-Stressfasern darstellte. Eine im Vergleich zu *BRCA1*<sup>wt</sup> erhöhte Konzentration des Ketonkörpers  $\beta$ -Hydroxybutyrat im Zellkulturüberstand der *BRCA1*<sup>mosMe</sup> Fibroblasten

deutete auf metabolische Veränderungen zu Gunsten einer aeroben Glykolyse hin. Darüber hinaus wirkte konditioniertes Medium der *BRCA1*<sup>mosMe</sup> Fibroblasten *in vitro* deutlich stärker proliferationsfördernd auf die Epithelial- bzw. Krebszelllinien HMLE und A549 als dies für die Kontrollfibroblasten der Fall war. Die Ergebnisse zeigen, dass *BRCA1*<sup>mosMe</sup> sich transkriptionell, zellbiologisch und funktionell in gleicher Weise von *BRCA1*<sup>wt</sup> Fibroblasten unterscheiden wie tumornah entnommene CAFs von normalen Fibroblasten.

CAFs sind Zellen der Tumormikroumgebung und fördern sowohl parakrin durch Sekretion tumorigener Substanzen als auch durch Modifikation der extrazellulären Matrix (EZM) deren Wachstum. Die primäre Existenz oder Ko-Evolution von angrenzenden Tumorzellen galt lange Zeit als Voraussetzung für die Genese von CAFs. Aktuelle Studien konnten jedoch zeigen, dass normale Fibroblasten *in vitro* in kompletter Abwesenheit von Krebszellen, CAF-typische phänotypische und funktionelle Eigenschaften annehmen können, wenn durch einen shRNA-Knockdown die Expression eines der Tumorsuppressorgene *BRCA1*, *RB*, *TP53* oder *PTEN* reduziert wird.

Die im Rahmen dieser Arbeit generierten Daten belegen, dass ein CAF-ähnlicher Zustand in nicht-tumorösen mesenchymalen Zellen vorhanden sein kann und in dem untersuchten Fall mit hoher Wahrscheinlichkeit auf die konstitutionelle *BRCA1*-Epimutation zurückzuführen ist. Konstitutionelle Veränderungen der stromal-epithelialen Interaktionen zugunsten einer Tumor-fördernden Mikroumgebung in genetisch krebsprädisponierten Individuen können einen Aspekt des bis heute nicht vollständig aufgeklärten Pathomechanismus von *BRCA1*-Mutationen bei der erblichen Tumorgenese darstellen. Das Wissen um die mesenchymale Beteiligung bei der hereditären Kanzerogenese birgt das Potenzial, gezielte chemopräventive Maßnahmen zu entwickeln, die durch Regulation der abnormen stromalen Konstitution in Individuen mit *BRCA1*-Mutationen die Initiation der Krebserkrankung verzögern oder verhindern können.



# 1 Einleitung

*„While there are several chronic diseases more destructive of life than cancer, none is more feared.“* Charles Mayo, 1926

Wie schon vor 90 Jahren von Charles Mayo, dem Mitbegründer der US-amerikanischen Organisation „Mayo Clinic“ in Rochester, formuliert [1], ist Krebs auch heute noch eine der gefürchtetsten Erkrankungen weltweit [2–4]. Einer der Gründe hierfür ist vermutlich, dass die zur Verfügung stehenden Behandlungsoptionen nebenwirkungsreich und in einem hohen Maße belastend sind und nur bei einem Teil der Patienten zu andauernden Erfolgen führen. Trotz langjähriger intensivster wissenschaftlicher Auseinandersetzung mit der Erkrankung und potenziellen therapeutischen Zielen, sind auch heute noch viele der grundlegenden Fragen der Kanzerogenese und Tumorbologie unbeantwortet geblieben und geben der Wissenschaft immer neue Rätsel auf.

Krebs stellt *per se* keine eigene Krankheitsentität dar, sondern beschreibt viel mehr eine Gruppe von mehr als 100 distinktiven Pathologien. Diese definieren sich als Malignitäten, die durch abnorme und unkontrollierte Proliferation von Zellen gekennzeichnet sind [5].

## 1.1 Epidemiologie der Krebserkrankungen

Onkologische Erkrankungen stellen durch ihre Komplexität und die verbundenen hohen Behandlungskosten eine der größten Herausforderungen des Gesundheitswesens dar. Jährlich erkranken etwa eine halbe Million Menschen in Deutschland an Krebs [6], so dass Krebserkrankungen nach Herz-Kreislaufkrankungen die zweithäufigste Todesursache in Deutschland sind und im Jahr 2013 für insgesamt 223 842 Sterbefälle verantwortlich waren [7].

In den vergangenen Jahrzehnten wurden enorme Fortschritte bei der Diagnostik und Therapie onkologischer Erkrankungen erreicht, die die Prognose vieler Erkrankter deutlich verbesserten. So leben heute durchschnittlich über 50% der Betroffenen noch 5 Jahre nach Diagnosestellung, und haben damit, abhängig vom Tumortyp, eine gute Chance auf eine dauerhafte Heilung [6]. Durch diese Entwicklung gelang es das durchschnittliche krebsbedingte Sterbealter im Jahr 2013 auf einen Tiefstwert von 73,4 Jahren und damit nur knapp unterhalb des natürlichen mittleren Sterbealters von 78 Jahren zu erhöhen [6]. Daraus lässt sich ableiten, dass ein Großteil der Krebserkrankungen Personen fortgeschrittenen Alters betreffen.

Krebs im Kindes- und Jugendalter macht insgesamt nur 1% aller Fälle aus. Jährlich erkranken in Deutschland etwa 2000 Kinder und Jugendliche unter 18 Jahren [8], wodurch nach europäischer Definition pädiatrische Krebserkrankungen zu den „seltenen Erkrankungen“ gehören. Auch in der pädiatrischen Onkologie führte die Weiterentwicklung therapeutischer Maßnahmen und Medikamente zu einer deutlichen Verbesserung der Prognose. Die 5-Jahres-Überlebensraten stiegen innerhalb von 35 Jahren um 25% auf 83% im Jahre 2010 und liegen damit für Krebserkrankungen im Kindes- und Jugendalter deutlich höher als für die Fälle im Erwachsenenalter [8]. Trotz der Seltenheit kindlicher Tumore und der guten Prognose stellen Krebserkrankungen dennoch bei europäischen Kindern nach dem ersten Lebensjahr die zweithäufigste Todesursache dar.

Die Häufigkeit der Tumorlokalisationen ist abhängig von Geschlecht und Alter, sowie für bestimmte Tumorarten auch von der geographischen Lage. In Deutschland erkranken Männer meist an Karzinomen der Prostata (26%), der Lunge (14%) oder des Darmes (13%). Frauen hingegen sind am häufigsten von Tumoren der Brustdrüse (31%), sowie ebenfalls von Darm- (13%) und Lungenkarzinomen (8%) betroffen [6]. Bei unter 18-jährigen Patienten sind Leukämien (31 %), Tumore des zentralen Nervensystems (24 %) und Lymphome (14 %) besonders häufig [8].

## 1.2 Genetik der Kanzerogenese

Die Kanzerogenese ist ein mehrstufiger Prozess, der durch genetische und phänotypische Veränderungen von normalen Zellen zur Evolution von Krebszellen führt, die sich durch eine Imbalance von Zellproliferation und Zelltod auszeichnen [5, 9]. Ein Charakteristikum von neoplastischen Zellen ist deren genomische Instabilität, die zur Akkumulation genetischer Läsionen führt [5, 10, 11]. Die Initiation

der Kanzerogenese wird durch ererbte oder somatische Mutationen in Genen getriggert, die für die Kontrolle des Zellzyklus und zellulärer Wachstumsprozesse verantwortlich sind. Solche in die Kanzerogenese involvierten Gene lassen sich in zwei Klassen einteilen: Onkogene und Tumorsuppressorgene.

### 1.2.1 Onkogene

Ein molekularer Mechanismus der Kanzerogenese ist die Wachstumsstimulation durch mutative Aktivierung von Protoonkogenen zu Onkogenen [12–14]. Protoonkogene wirken in einem normalen physiologischen Kontext kontrolliert proliferationsfördernd und kodieren häufig für Proteine, die an Signaltransduktionskaskaden und bei der Produktion von mitogenen Signalen beteiligt sind [13–15].

Die Konversion eines Protoonkogens in ein aktiviertes Onkogen basiert auf Mutationsereignissen, die einen Funktionsgewinn („gain-of-function“) zur Folge haben. Dieser kann entweder durch Punktmutationen, Genamplifikationen oder chromosomale Rearrangements, die zur Fusionierung des betroffenen Gens mit anderen Genen und deren regulativen Elementen führen, herbeigerufen werden [16, 17]. Die Funktionsgewinne der Onkogene können sich entweder auf struktureller Ebene durch eine konstitutiv gesteigerte Aktivität des Proteins oder auf transkriptioneller Ebene durch eine verstärkte Expression bemerkbar machen.

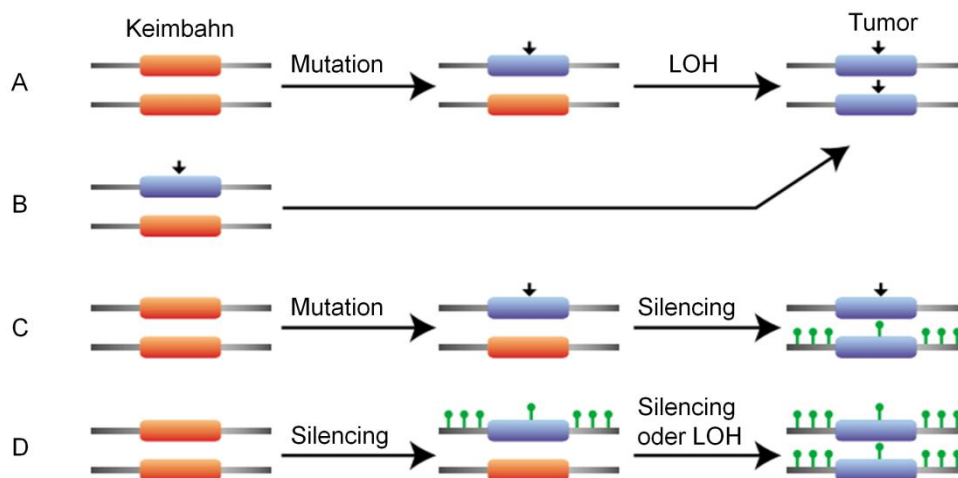
Ein Beispiel für eine strukturverändernde Aktivierung eines Onkogens mittels eines chromosomalen Rearrangements ist das mit dem Philadelphia-Chromosom assoziierte Translokationsprodukt  $t(9;22)(q34;q11)$ . Das daraus resultierende Fusionsprotein BCR-ABL ist bei der Chronisch Myeloischen Leukämie (CML) für das unkontrollierte Wachstum myeloischer Zellen verantwortlich [18–20].

Die Aktivierung von Protoonkogenen zu Onkogenen durch „Gain-of-Function“-Mutationen ist dominant und entfaltet ihre tumorigenen Effekte bereits bei Involvierung eines Allels [21]. Mutationen in Protoonkogenen werden häufig im Laufe des Lebens durch schädigende Umweltweinflüsse erworben und selten ererbt. Eine Ausnahme bilden hier funktionsgewinnende Keimbahnmutationen des Protoonkogens *RET*, die mit dem Tumorsyndrom Multiple Endokrine Neoplasie Typ 2 kausal assoziiert sind [22–24].

### 1.2.2 Tumorsuppressorgene

Ein weiterer die Kanzerogenese initiiierender Mechanismus ist die Funktionsstörung der Zellwachstumskontrolle durch Mutationen von Tumorsuppressorgenen (TSG).

Carl Nordling und Alfred Knudson beschrieben in ihrer als „2-Hit-Hypothese“ bekannten Theorie die biallelische Inaktivierung eines TSG als notwendige Voraussetzung für die Entstehung sporadischer sowie hereditärer Tumore [25, 26]. Dabei kann das initiale Mutationsereignis entweder somatisch erworben (Abb. 1A) oder aber als Keimbahnmutation ererbt sein (Abb. 1B). Ein Verlust der Heterozygotie (*loss-of-heterozygosity*, LOH) durch Non-Disjunction, mitotische Rekombination oder Deletionen hat die Inaktivierung der zweiten Genkopie des betroffenen Tumorsuppressorgens zur Folge und leitet die Kanzerogeneseprozesse ein (Abb. 1) [27, 28]. Epigenetische Stilllegung mittels Promotermethylierung ist ein weiterer Mechanismus, der sowohl als erster als auch als zweiter „Hit“ an der biallelischen Inaktivierung von TSG beteiligt sein kann (Abb. 1C+D) [29–32] und im Detail in Kapitel 1.5.2 beschrieben ist.



**Abb. 1 Mechanismen biallelischer Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen nach Knudsons „2-Hit-Hypothese“.** Inaktivierte Allele sind blau schattiert. Vertikale Pfeile markieren ein Mutationsereignis. Grüne Symbole zeigen die epigenetische Stilllegung von TSGs mittels Promotermethylierung. Graphik verändert nach Balmain et al. (2003) [28].

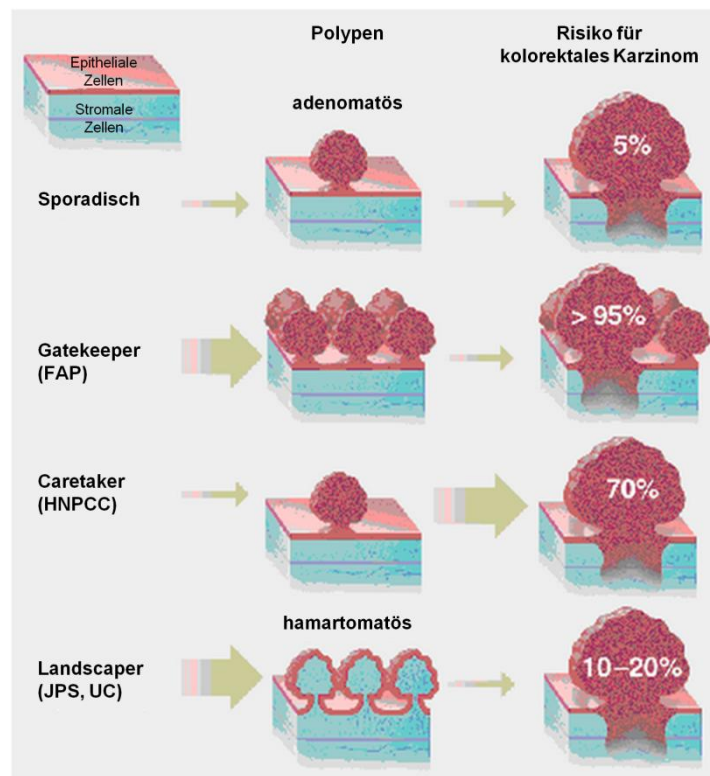
Der Begriff TSG bezieht sich weniger auf eine distinkte Proteinfunktion sondern definiert eine Gruppe von Genen, die im Rahmen ihrer unterschiedlichen physiologischen Funktionen daran beteiligt sind, Zellen vor einer malignen Transformation zu bewahren [33, 34]. Funktionell lassen sich TSGs in drei Gruppen



unterteilen: „Caretaker“, „Gatekeeper“ und „Landscape“ [34–36]. „Caretaker“-Gene sind essentiell für das regelrechte Gewebewachstum durch Erhaltung der Integrität und Stabilität des Genoms. Viele dieser Gene kodieren für Proteine, die Teil der Zellzykluskontrollpunkte oder der zellulären DNA-Reparaturmaschinerie sind [33–35]. Durch das Zusammenspiel dieser Proteine wird sichergestellt, dass während der DNA-Replikation induzierte DNA-Schäden effizient repariert werden und die Zellteilung bis zur Beendigung dieser Prozesse arretiert wird, um die Akkumulation von genetischen Aberrationen zu vermeiden [37–39]. Die Funktionen der „Caretaker“-Gene sind in Zellen vieler unterschiedlicher Gewebe identisch und sind daher nicht gewebespezifisch. Aberrationen in „Caretaker“-Genen führen zu neoplastischen Veränderungen, sind jedoch *per se* nicht ausreichend um die Entwicklung eines Tumors zu initiieren [34, 37, 40]. Vielmehr kommt es in deren Folge zu einer Schwächung der genomischen Stabilität und einer erhöhten Mutationsrate in anderen Genen, deren Beeinträchtigung wiederum zur Tumorentstehung beitragen kann, wie z.B. der zweiten Klasse der Tumorsuppressorgene, der sogenannten „Gatekeeper“-Gene [37].

„Gatekeeper“-Gene regulieren die Zellteilung und das Wachstum von Geweben durch Inhibition der Proliferation und Förderung der Apoptose und anderer Formen des Zelltods in beschädigten Zellen [33, 34, 41]. Darüber hinaus kontrollieren sie die Transformation von pluripotenten zu terminal differenzierten Zellen verschiedener Gewebe [42, 43]. Aus diesen Funktionen lässt sich ableiten, dass die „Gatekeeper“-Gene im Gegensatz zu „Caretaker“-Genen gewebespezifischer agieren müssen [34, 44]. Der Funktionsverlust eines „Gatekeepers“ ist der limitierende Faktor bei der mehrstufigen Tumorgenese [41], sodass eine Wiederherstellung der normalen Funktion die Weiterentwicklung neoplastischer Veränderungen inhibiert [33–35].

Wissenschaftliche Erkenntnisse der letzten Jahre über die Bedeutung der Mikroumgebung bei der Tumorentstehung führten zur Definition einer neuer Gruppe von TSGs, den „Landscape“ [35, 44, 45]. Die von diesen Genen kodierten Proteine sind für die Aufrechterhaltung der stromalen Homöostase verantwortlich, die regulierend auf die Proliferation benachbarter Zellen wirkt. Die erstmalige Definition von „Landscape“-Genen basierte auf der Beobachtung, dass initiiierende Läsionen, die zur Ausprägung eines Juvenilen Polyposis-Syndroms führen, nicht in den Tumorzellen selbst, sondern in den umgebenden stromalen Zellen nachgewiesen werden können [45]. Funktionalitäten, die potenziell mit „Landscape“-Genen assoziiert sein könnten, sind z.B. die Regulation von Proteinen der extrazellulären Matrix, zellulärer Oberflächenproteine, Adhäsionsmoleküle und Wachstumsfaktoren [35, 46, 47].



**Abb. 2 Divergente Pathomechanismen der Entstehung von kolorektalen Karzinomen unter Beteiligung verschiedener TSG-Typen.** Die Hälfte aller Individuen entwickelt bis zum 70. Lebensjahr benigne adenomatöse Polypen. Diese können im Laufe der Zeit entarten und Tumore bilden. Hereditäre Veränderungen des „Gatekeeper“-Gens APC (Adenomatous Polyposis Coli) führen zur Ausprägung einer Familiären Adenomatösen Polyposis (FAP). Auf Grund der enorm großen Anzahl von adenomatösen Polypen im Darm ist eine kanzeröse Entartung hoch wahrscheinlich. Patienten mit hereditärem kolorektalem Karzinom ohne Polyposis (HNPCC) bilden nicht mehr oder häufiger Polypen aus als die Gesamtbevölkerung. Jedoch kommt es viel häufiger zu einer kanzerösen Entartung eines Polypen, da ererbte Mutationen in den „Caretaker“-Genen der DNA-Reparatur wie MLH1, MSH2, MSH6, PMS2 die Akkumulation genetischer Läsionen begünstigen. Beim Juvenilen Polyposis-Syndrom (JPS) sowie der Autoimmunerkrankung Colitis ulcerosa (UC) kommt es zur Akkumulation hamartomatöser Polypen. Diese entstehen durch eine missgeleitete Proliferation stromaler Zellen, die mit hereditären oder somatischen Veränderungen von „Landscaeper“-Genen, wie z.B. SMAD4, assoziiert sind. Der Kontakt epithelialer Zellen mit der abnorm proliferierenden Mikroumgebung in den Polypen führt zu einem erhöhten Risiko einer neoplastischen Transformation dieser Zellen. Abbildung modifiziert nach Kinzler und Vogelstein (1998) [45].

Die modelhafte Definition von „Caretakern“, „Gatekeepern“ und „Landscaepern“ trug entscheidend zum Verständnis der Rolle von TSGs bei der Genese von Krebserkrankungen bei. Abb. 2 zeigt am Beispiel des kolorektalen Karzinoms wie Veränderungen von Genen unterschiedlicher TSG-Typen über divergente Pathomechanismen zur Entwicklung ähnlicher Krankheitsbilder führen können [45]. In Anbetracht neuerer wissenschaftlicher Daten scheint es wahrscheinlich, dass sich die

Funktionalität der drei Gruppen deutlich überschneiden kann. Viele TSGs kodieren für vielseitige Proteine, die je nach Gewebe sehr unterschiedliche Funktionen ausüben können und folglich nicht nur einer TSG-Gruppe zugeordnet werden können. So weisen z.B. *TP53* (tumor protein p53), *BRCA1* (Breast Cancer 1, early-onset) und *BRCA2* (Breast Cancer 2, early-onset) typische Charakteristika von sowohl „Gatekeepern“ als auch von „Caretakern“ auf [48]. Für die Gene *NF1* (neurofibromin 1) und *RB* (retinoblastoma protein) wird zusätzlich zu ihrer klassischen Rolle als „Gatekeeper“ eine gewebespezifische Funktion als „Landscape“ diskutiert [35, 36, 44, 49–51].

### 1.3 Ätiologie und Disposition

Boveri und Bauer erkannten vor über 100 Jahren die Bedeutung genetischer Veränderungen für die Kanzerogenese und definierten Krebs als „genetische Erkrankung“ [52–54]. Bis heute ließen neue wissenschaftliche Erkenntnisse diese Definition, bis auf den Einfluss epigenetischer Faktoren, unangetastet, führten jedoch zu einem tieferen Verständnis über das komplexe Wechselwirkungsgefüge von exogenen Faktoren und Genetik [55, 56].

#### 1.3.1 Exogene Umweltfaktoren

Nur etwa 5-10% der Krebserkrankungen sind eindeutig auf hereditäre genetische Defekte zurückzuführen [57]. Für die restlichen 90-95% wird eine Kausalität von schädlichen Umwelteinflüssen oder einem ungesunden Lebensstil diskutiert. Es wird geschätzt, dass durch Krebs verursachte Sterbefälle in etwa 25-30% auf Tabakkonsum, in 30-35% auf Ernährungsstil und 15-20% auf Infektionen zurückzuführen sind [58–63]. Weitere das Krebsrisiko modulierende Faktoren sind Strahlungsbelastung, Umweltverschmutzung, Stress und Übergewicht [64]. Die Tatsache, dass schädliche exogene Faktoren solch einen starken Einfluss auf die Krebsentstehung haben, tangiert nicht die Relevanz genetischer Veränderungen bei der Kanzerogenese, sondern steht vielmehr damit in Verbindung [55]. Dies liegt darin begründet, dass alle genannten exogenen Einflüsse das Potenzial besitzen, direkt oder indirekt durch metabolische oder hormonelle Mediatoren DNA-Schäden zu induzieren oder die genetische Integrität durch Beeinträchtigung wichtiger zellulärer Prozesse wie Zellzyklus oder DNA-Reparatur zu gefährden.

Ein Beispiel für direkte mutagene Effekte exogener Faktoren sind durch polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAK) induzierte G-nach-T-Transversionen, die

innerhalb von wenigen Minuten beim Tabakrauchen auftreten. Solche typischen Austauschereignisse finden sich in Lungentumorgewebe häufig in dem Tumorsuppressorgen *TP53* und sind vermutlich für die Entstehung von Lungenkarzinomen ursächlich [65–68]. Indirekte Effekte äußerlicher Einflüsse auf das Krebsrisiko kommen zum Beispiel durch eine ungesunde Ernährungsweise zustande, die eine Adipositas begünstigt. Hohe Cholesterinspiegel, Insulinresistenz und Übergewicht konnten in Studien mit einer erniedrigten Konzentration an antioxidativen Enzymen sowie mit einer erhöhten Menge an mit oxidativem Stress verbundenen mutagenen Produkten korreliert werden [69–71]. Ebenfalls konnte nachgewiesen werden, dass oxidative DNA-Schädigungen bei übergewichtigen Personen viel häufiger und in größeren Mengen vorhanden sind [69, 72]. Welche Gene bei der Adipositas-abhängigen Kanzerogenese in der Folge von tumorigenen Schäden betroffen sind, ist zum heutigen Zeitpunkt jedoch nicht geklärt.

### **1.3.2 Polygene Disposition und Risikogene niedriger Penetranz**

Die Empfindlichkeit eines jeden Individuums gegenüber exogenen Umweltfaktoren ist größtenteils genetisch determiniert und basiert auf der Kapazität zur Neutralisierung dieser adversen Effekte.

Ein Merkmal, das mit dem Krebsrisiko assoziiert ist und stark interindividuell variiert, ist die Fähigkeit, DNA-Schäden effizient zu reparieren [73, 74]. Die individuelle DNA-Reparatur-Kapazität zeigt ein Vererbungsmuster, das mit einem komplexen und polygen kodierten Merkmal vereinbar ist [75, 76].

Unter Berücksichtigung der Daten mehrerer relevanter Studien lässt sich herleiten, dass jede Person im Durchschnitt etwa 30 Aminosäuresequenz-verändernde Varianten in Genen verschiedener DNA-Reparatur-Mechanismen trägt [77–79]. Der kausale Zusammenhang zwischen dieser genetischen Vielfalt und biochemischen Variationen der DNA-Reparaturprozesse erscheint plausibel, ist jedoch nicht vollständig auf mechanistischer Ebene geklärt [80].

Das genetisch determinierte Risiko an sporadischen Karzinomen zu erkranken wird vermutlich durch Kombinationen von Einzelnukleotid-Polymorphismen (Single nucleotide polymorphisms, SNP) in vielen funktionell unterschiedlichen Genen polygen determiniert. Durch genomweite Assoziationsstudien (GWAS) mit sehr großen Patientenkohorten konnten bereits erfolgreich polymorphe Loci identifiziert werden, die mit einem erhöhten Risiko für verschiedene Tumore assoziiert sind [81–84].

Häufig korrelieren die innerhalb solcher Studien identifizierten Varianten in neuen Suszeptibilitätsgenen mit einem nur sehr gering erhöhten Erkrankungsrisiko ( $< 1,3$ -fach) und einer niedrigen Penetranz [84].

Die kumulativen Effekte solcher polymorpher Marker zuverlässig zu prognostizieren und zur individuellen Risikoabschätzung zu nutzen, birgt eine große Herausforderung aber auch Chance für die moderne Krebsvorsorge. Eine der ersten Studien, die sich eine mathematisch-statistische Beschreibung der polygenen Suszeptibilität zum Ziel machte, wurde von Pharoah et al. durchgeführt und 2002 publiziert [85]. Unter Ausschluss von Varianten der bekannten Hochrisikogene *BRCA1* und *BRCA2* wurde die Populationsverteilung des Brustkrebsrisikos einem mathematischen Modell angepasst, das auf der Loci-übergreifenden Multiplikation der geringen Risiken per Variante basierte. Gemäß dem verwendeten Modell konnten 12% der Population der Hochrisikogruppe zugeordnet werden, deren Risiko bis zu einem Alter von 70 Jahren an Brustkrebs zu erkranken, 1 zu 10 oder höher beträgt. Die Hälfte aller Brustkrebsfälle betraf tatsächlich Personen dieser Hochrisikogruppe. Nur 12% der Brustkrebsfälle wurden hingegen bei Personen diagnostiziert, die gemäß dem polygenen Modell der Gruppe mit dem niedrigsten Risiko zugeordnet worden waren.

Mittlerweile existiert eine Vielzahl von Studien, die sich mit dem kombinierten Risiko häufiger Polymorphismen für verschiedene Tumorerkrankungen beschäftigen und hierfür die Berechnung des sogenannten „polygenic risk scores“ (PRS) heranziehen [86–88]. Die Identifizierung von Hochrisikopatienten anhand eines Sets bekannter Loci wird im klinischen Alltag bereits in einigen spezialisierten Einrichtungen angeboten und wird z.B. in Großbritannien vom „National Institute of Health and Care Excellence“ im Rahmen von Präventionsprogrammen empfohlen [83, 86, 89].

### **1.3.3 Monogene Disposition, Risikogene hoher Penetranz und hereditäre Tumorsyndrome**

Die Entdeckung der ersten krebsdisponierenden Gene basierte auf der Erkenntnis, dass lebenszeitlich früh auftretende Tumore innerhalb einiger Familien aggregierten und die Vererbung den Mendelschen Gesetzen folgte [90, 91]. Durch Segregationsanalysen in betroffenen Familien und Genkartierungen mittels positionaler Klonierungsstrategien konnten Zusammenhänge zwischen Veränderungen bestimmter Gene und den für Tumorsyndrome typischen Phänotypen hergestellt werden.

**Tab. 1 Auswahl hoch-penetranter, hereditärer Tumorsyndrome**

Syndrom	Typische Tumore	Erbgang	Inzidenz	Gene
Ataxia Telangiectasia	Lymphome, Leukämien	AR	1:30 000 bis 1:100 000	<i>ATM</i>
Cowden-Syndrom	Mammakarzinom, benigne und maligne Schilddrüsentumore und Endometriumkarzinome	AD	1:200 000	<i>PTEN</i>
Familiäre adenomatöse Polyposis	Adenomatöse Polypen des Kolons/Rektums, gastrointestinale Tumore, Papilläre Schilddrüsenkarzinome	AD	1:5 000 bis 1:10 000	<i>APC</i>
Familiärer Brust- und Eierstockkrebs	Mamma-und Ovarialkarzinome	AD	1:500 bis 1:1 000	<i>BRCA1,</i> <i>BRCA2</i>
Hereditäres non-polypöses kolorektales Karzinom	Kolorektale Adenokarzinome, Endometriumkarzinome	AD	1 in 400	<i>MLH1, MSH2,</i> <i>MSH6, PMS1,</i> <i>PMS2</i>
Juveniles Polyposis-Syndrom	Multiple Polypen, Tumore des Gastrointestinal-und des Kolorektaltrakts	AD	1:100 000	<i>MADH4</i> <i>(SMAD4),</i> <i>BMPR1A</i>
Li-Fraumeni-Syndrom	Brustkrebs, Osteosarkome, Nebennierenrindentumore, Leukämien	AD	selten	<i>TP53</i>
Multiple Endokrine Neoplasie Typ 1	primäre Hyperparathyreoidismus, Pankreaskarzinome, Hypophysenadenome	AD	1:100 000	<i>MEN1</i>
Multiple Endokrine Neoplasie Typ 2	medulläre Schilddrüsenkarzinome, Phäochromozytom, Schleimhautneurome	AD	1:30 000	<i>RET</i>
Peutz-Jeghers-Syndrom	Gastrointestinale Karzinome, Mammakarzinome, Keimzelltumore	AD	1:200 000	<i>LKB1 (STK11)</i>
von Hippel-Lindau	Klarzellige Nierenzellkarzinome, Phäochromozytome, Hämangioblastome, retinales Angiom	AD	1:36 000	<i>VHL</i>
Xeroderma pigmentosum	Plattenepithelkarzinome, Basalzellkarzinome, Melanome	AR	1:1 000 000	<i>XPA, ERCC3,</i> <i>XPC, ERCC2,</i> <i>XPE, ERCC4,</i> <i>ERCC5</i>
Familiäres Retinoblastom	Pädiatrische Tumore der Retina	AD	1:13 500 bis 1:25 000	<i>RB1</i>

Abkürzungen Erbgang: AD = autosomal dominant, AR = autosomal rezessiv. Informationen entnommen aus Nagy et al. [92].

Das erste als Tumorsuppressor erkannte und charakterisierte Gen war *RB1*, dessen Veränderungen zu dem monogen erblichen pädiatrischen Retinoblastom führen [26, 93, 94]. Das RB1-Protein agiert als molekulare Verbindung zwischen dem mitogenen Signaltransduktionswegen und der Zellzyklusregulation [95]. 1979 folgte die Entdeckung von *TP53*, einem Gen, dessen Involvierung bei der viralen Transformation von Zellen sowie als Ziel somatischer Mutationen in Tumoren beobachtet wurde [96]. Zehn Jahre später wurde erkannt, dass Keimbahnmutationen auch dieses Gens zu einem hoch-penetranten Tumorsyndrom, nämlich dem sogenannten Li-Fraumeni-Syndrom, führen [97]. 1994 und 1995 folgten die Beschreibungen von *BRCA1* und *BRCA2*, zwei multifunktionalen Genen, deren Veränderungen für die hereditäre Form des Brust- und Eierstockkrebs (HBOC) kausal sind [98, 99].

Einige der bekannten Tumorsyndrome sind genetisch heterogene Entitäten und können durch Veränderungen mehrerer Gene verursacht werden, die zumeist Teil derselben Signalkaskaden sind oder eine homologe Funktionalität aufweisen. Ein Beispiel ist das Syndrom Xeroderma pigmentosum, das mit einer erhöhten Wahrscheinlichkeit für das Auftreten von UV-induziertem Hautkrebs einhergeht. Veränderungen der Gene XPA/XPC/XPE (Xeroderma Pigmentosum, Complementation Group A/C/E) sowie ERCC3/ERCC2/ERCC4/ERCC5 (Excision Repair Cross-Complementation Group 3/2/4/5), die alle Teil der Nukleotidexzisionsreparatur (NER) sind, konnten als ursächlich identifiziert werden [100–102].

Hereditäre Tumorsyndrome werden in den meisten Fällen dominant vererbt, zeigen aber auf molekularer Ebene ein rezessives Wirkmuster, das in Kapitel 1.2.2 näher beleuchtet wird. Hinweise auf das mögliche Vorliegen eines hereditären Tumorsyndroms ergeben sich aus der Familienanamnese. Folgende klinische Kriterien sprechen für eine erbliche Ätiologie einer Krebserkrankung [92]:

- mehrere Generationen sind betroffen
- lebenszeitlich deutlich früheres Auftreten der Tumore als für die jeweilige Entität typisch
- multiple primäre Neoplasien in einem Individuum
- Auftreten einer Krebserkrankungen in Kombination mit anderen nicht-malignen Manifestationen, die auf genetische Ätiologie schließen lassen

Charakteristisch für Neoplasien innerhalb erblicher Tumorsyndrome im Gegensatz zu denen sporadischer Formen sind, dass sie weitgehend unabhängig von äußeren Einflüssen entstehen und kaum durch Änderungen der Lebensweise beeinflussbar sind. Bis zum heutigen Zeitpunkt wurden bereits über 200 verschiedene hereditäre Krebs syndrome beschrieben [92, 103]. Tab. 1 zeigt eine Auswahl der bekanntesten monogenen Tumorsyndrome.

Hereditäre Krebs syndrome können mit einem erhöhten Risiko für bösartige Tumore verbunden sein, prädisponieren aber in vielen Fällen auch für benigne Tumore wie beim Cowden-Syndrom oder der Multiplen Endokrinen Neoplasie. Berücksichtigt man sowohl maligne als auch benigne Manifestationen, so haben viele der Tumorsyndrome eine fast vollständige Penetranz bis zu einem Alter von 70 Jahren [92, 103].

### 1.4 Der Tumorsuppressor *BRCA1* (BReast CAncer 1, early-onset)

#### 1.4.1 Die Struktur von *BRCA1*

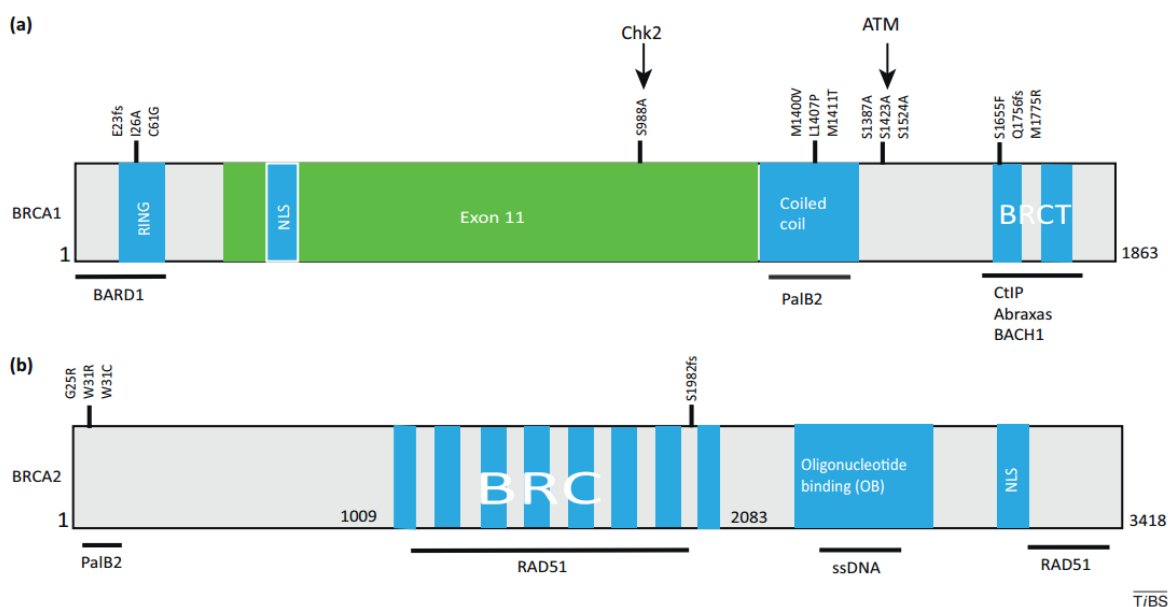
Das humane Gen *BRCA1* ist auf Chromosom 17 im Genlocus 17q21 lokalisiert und umspannt über 80 kb genomischer DNA [98, 104]. *BRCA1* besteht aus insgesamt 24 Exons, wovon 22 kodierend sind. Das zentral gelegene Exon 11 hat eine Länge von 3427 bp und macht über 50% des kodierenden Bereiches des Gens aus. Die genomische Region des *BRCA1*-Gens ist charakterisiert durch eine Akkumulation repetitiver Sequenzen. Besonders zahlreich sind die zu den „short interspersed nucleotide elements“ (SINE) zählenden Alu-Sequenzen vertreten, die 42% der gesamten genomischen Sequenz von *BRCA1* bilden [104].

*BRCA1* besitzt einen gemeinsamen bidirektionalen Promoter mit dem Gen *NBR2* (*next to BRCA1 gene 2*) [105]. Der regulatorische Bereich ist in eine ~2,8 kb große CpG-reiche Region eingebettet und reicht vom Nukleotid -1810 5' stromaufwärts bis zum intragenischen Nukleotid +974.

Das Haupttranskript ist 7,8 kb lang und kodiert für die 1863 Aminosäuren des 220 kDa schweren *BRCA1*-Proteins [98, 106]. Am N-terminalen Ende des Proteins befindet sich eine RING (Really Interesting New Gene)-Finger-Domäne, die sowohl DNA-Protein-Interaktionen als auch Protein-Protein-Interaktionen vermittelt [107, 108]. Darüber hinaus besitzt *BRCA1* eine Kernlokalisierungssequenz, die für den aktiven nukleären Import des Proteins essentiell ist [109]. Eine hochkonservierte „Coiled-coil“ Region beherbergt die Transaktivierungsdomänen AD1 und AD2, die synergistisch an der



Transkriptionsregulation von Zielgenen des BRCA1-Proteins beteiligt sind [110]. Das C-terminale Ende des Proteins umfasst eine von Tandemrepeats kodierte globuläre Domäne BRCT (BRCA1-C-Terminus), die für Proteine der DNA-Reparaturmaschinerie typisch ist [111].



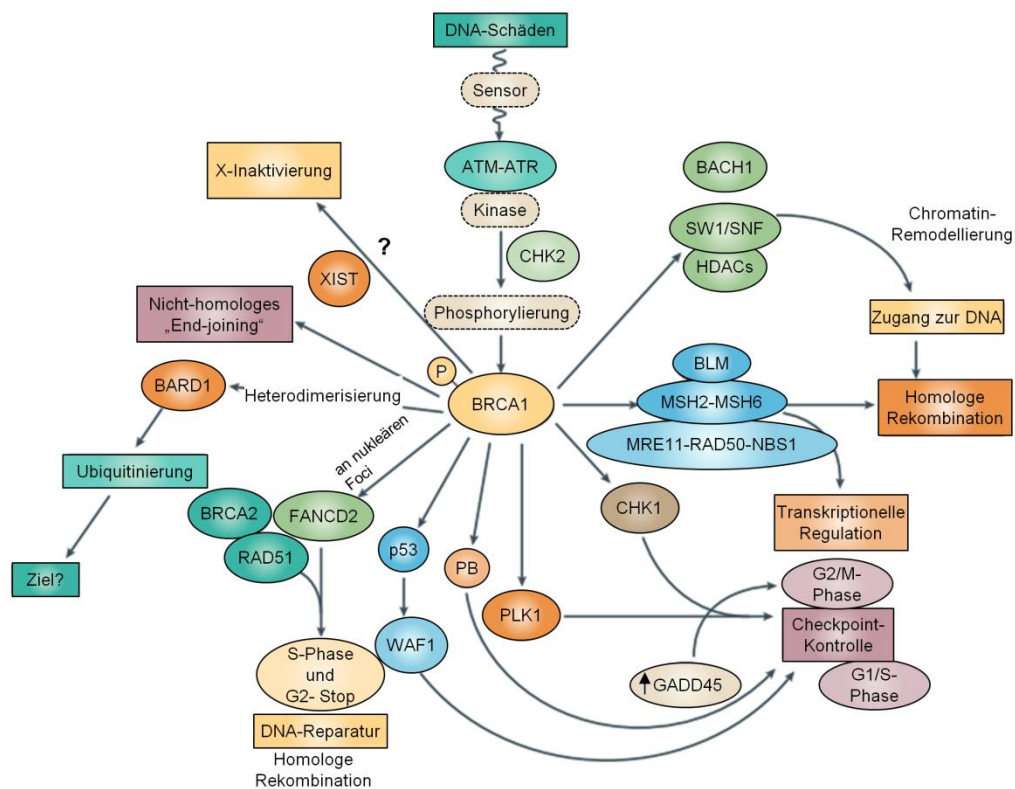
**Abb. 3 Schematische Struktur der Proteine BRCA1 (a) und BRCA2 (b).** Zwischen den Arten homologe Domänen sind blau markiert. Häufig durch Mutationen veränderte Aminosäurestellen sind über der jeweiligen Proteindarstellung notiert. Pfeile kennzeichnen Stellen, an denen das BRCA1-Protein von CHEK2 bzw. ATM phosphoryliert wird. Für Protein-Protein-Interaktionen wichtige Regionen sind durch schwarze Balken unter Angabe des Bindungspartners dargestellt. Abbildung entnommen aus Henderson et al. (2012) [112].

Obwohl keine direkten Sequenzhomologien von *BRCA1* und *BRCA2* bestehen, weisen beide Gene durch ihre umfassende Größe und das große zentrale Exon 11 Ähnlichkeiten auf genomischer Ebene auf. Trotz ihrer sehr unterschiedlichen Ausstattung an funktionellen Proteindomänen sind *BRCA1* und *BRCA2* beides nukleäre Tumorsuppressorgene und funktionell sowie pathofunktionell eng verwandt. Orthologe des humanen *BRCA1*-Gens existieren nicht nur in *Mammalia* sondern auch in den meisten anderen Chordaten, so wie z.B. *Gallus gallus* oder *Xenopus laevis* und wurden auch in Pflanzen wie *Arabidopsis thaliana* gefunden [113–115]. In verschiedenen Hefearten und *Drosophila melanogaster* konnten bisher keine Orthologen des humanen *BRCA1*-Gens identifiziert werden. Der Grad der artenübergreifende Sequenzidentität der orthologen *BRCA1*-Gene ist, verglichen mit anderen Tumorsuppressoren wie *TP53*, *RB*, *APC* oder *NF1* mit zu 90-98% Übereinstimmung sehr niedrig.

Das humane *BRCA1*-Gen zeigt insgesamt nur 58% identische DNA-Sequenzen mit dem orthologen Gen der Maus [116]. Dennoch sind die 120 aminoterminalen und die 80 carboxyterminalen Aminosäuren hochkonserviert und für viele Arten über 80% identisch, was die enorme funktionelle Relevanz der in dieser Region lokalisierten Proteindomänen unterstreicht [114, 117].

### 1.4.2 Die Funktionen von BRCA1

BRCA1 ist ein multifunktionelles Protein, das unter anderem in DNA-Reparaturprozessen, der Kontrolle der Zellzykluscheckpoints, Ubiquitinierung von Proteinen und der Umstrukturierung des Chromatingerüsts involviert ist [118]. Abb. 4 zeigt schematisch die verschiedenen Funktionen von BRCA1 und dessen bekannte Interaktionspartner.



**Abb. 4 Das BRCA1-Netzwerk.** Die funktionelle Beteiligung von BRCA1 umfasst u.a. die Prozesse DNA-Reparatur, Zellzykluskontrolle, Chromatin-Remodellierung und Ubiquitinierung. Viele dieser Prozesse sind mechanistisch noch nicht vollständig aufgeklärt. Abbildung modifiziert nach Narod und Foulkes (2004) [118].

## DNA-Reparatur

BRCA1-defiziente Zellen reagieren hypersensitiv auf DNA-schädigende Einflüsse wie ionisierende Strahlung (IR), ultraviolette Strahlung (UV) und DNA-alkylierende Agenzien [119]. Dies lässt vermuten, dass BRCA1 eine wichtige Rolle bei der effizienten Reparatur dieser DNA-Schäden spielt, die essentiell für die Toleranz von Zellen gegenüber diesen Faktoren ist.

Es existieren fünf verschiedene DNA-Reparatur-Maschinerien, die in Abhängigkeit von der Art der DNA-Läsionen getriggert werden. Diese sind Homologe Rekombination (HR), Nicht-homologes End-Joining (NHEJ), Nukleotidexzisionsreparatur (NER), Basenexzisionsreparatur (BER) und Mismatch-Reparatur (MMR) [120–122].

Nach Schädigung der DNA kolokalisieren BRCA1, BRCA2 und RAD51 in einem Komplex und bilden an der Stelle des Defektes subnukleäre Foci [123, 124]. Dabei wird BRCA1 von den Kinasen ATM und CHEK2 phosphoryliert [125–127]. BRCA1 ist Teil des BASC (BRCA1-associated genome surveillance complex)-Komplexes, der sich aus den Tumorsuppressoren und DNA-Reparaturproteinen MSH2, MSH6, MLH1, ATM, BLM, RAD50, NBS1 sowie dem DNA-Replikationsfaktor RFC zusammensetzt [128]. Dieser Komplex gilt als Sensor für DNA-Defekte und vermittelt die Reparatur von Doppelstrangbrüchen mittels homologer Rekombination [129].

Darüber hinaus ist BRCA1 auch an der Reparatur von DNA-Schäden durch NER beteiligt. BRCA1 fördert die globale sowie transkriptionsgekoppelte NER auf eine p53-unabhängige Weise, unter anderem durch die transkriptionelle Induktion NER-relevanter Gene wie *XPC*, *DDB2* und *GADD45* [130, 131]. Die Defekte in der transkriptionsgekoppelten NER in BRCA1-defizienten Zellen beruhen auf einer Blockierung der RNA-Polymerase-II-Transkriptions-Maschinerie an Stellen oxidativ-geschädigter DNA [130].

Es konnte gezeigt werden, dass BRCA1-defiziente embryonale Mausfibroblasten eine signifikant reduzierte Aktivität der NHEJ-Reparaturprozesse aufweisen, was einen Beitrag von BRCA1 auch in diesem Reparaturweg nahelegt [132]. Neuere Studien stützen diese Hypothese und belegen, dass auch der *in-vitro* Knockdown von *BRCA1* in HEK293-Zellen zu einer deutlichen Inhibition der Reparatur von Doppelstrangbrüchen mittels NHEJ führt [133].

## Kontrolle der Zellzykluscheckpoints

Zellen, die sich in der mitotischen Ruhephase (G<sub>0</sub>-Phase) oder Seneszenz befinden exprimieren nur marginale Mengen von *BRCA1* und *BRCA2* [134]. Im Gegensatz dazu ist mRNA-Transkript der beiden Gene während der Transitionen von G<sub>1</sub>- zu S-Phase und G<sub>2</sub>- zu M-Phase reichlich nachweisbar [106, 135]. Die zellzyklusabhängigen Expressionsmuster von *BRCA1* und *BRCA2* sprechen für eine Rolle der beiden Proteine in den Prozessen der Mitose und Zellteilung.

BRCA1 reguliert DNA-Schaden-abhängige Kontrollprozesse der Zellteilung und stellt somit die genomische Integrität sicher. DNA-Defekte führen zu der Aktivierung des G<sub>1</sub>/S-Checkpoints und verhindern somit, dass beschädigte DNA in der S-Phase repliziert wird. Der Tumorsuppressor p53 ist an der Aktivierung des G<sub>1</sub>/S-Checkpoint beteiligt und reguliert die Transkription des CDK-Inhibitors 1 (p21) [136, 137]. Diese Funktion des p53-Proteins ist jedoch abhängig von der vorherigen Phosphorylierung durch die Kinasen ATM/ATR [138]. Es konnte gezeigt werden, dass BRCA1 diesen Phosphorylierungsprozess von p53 vermittelt und daher BRCA1-defiziente Zellen eine defekte oder verminderte durch IR und UV induzierte Aktivierung des G<sub>1</sub>/S-Checkpoints aufweisen [138, 139].

Der S-Phasen-Checkpoint führt zu dem sofortigen Stopp der DNA-Replikation bei Auftreten von DNA-Schäden [140]. BRCA1-defiziente HCC1937-Zellen weisen einen defekten S-Phasen-Checkpoint auf, der jedoch durch die Komplementation von funktionellem BRCA1-Protein aufgehoben werden kann [141]. Der genaue Wirkmechanismus von BRCA1 bei der Aktivierung dieses Checkpoint ist bisher ungeklärt, aber vermutlich mit einer Komplexbildung von BRCA1, BRCA2, RAD51 und FANCD2 verbunden [142, 143].

Neben den G<sub>1</sub>/S- und S-Phasen-Checkpoints aktivieren DNA-Schäden ebenfalls den G<sub>2</sub>/M-Checkpoint und verhindern somit, dass genetische Läsionen in der Mitose an Tochterzellen weitergegeben werden. Während der Aktivierung der G<sub>2</sub>/M-Checkpoints reguliert BRCA1 die Kinase CHK1, die wiederum die Expression von Cyclin B und CDK1 (Cyclin-dependent kinase 1) reduziert und somit das Eintreten der Zellen in die Mitose verhindert [144–146]. Die Phosphorylierung von BRCA1 durch die Phosphokinase ATM ist dabei eine Grundvoraussetzung für die Funktion von BRCA1 bei der Regulation des G<sub>2</sub>/M-Checkpoints [127, 141, 147, 148].

## Chromatin-Remodellierung

Die räumliche Umstrukturierung des Chromatingerüsts erleichtert den Zugang verschiedener Reparaturproteine zu DNA-Läsionen und ermöglicht somit die effiziente Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen. Mehrere multimere Proteinkomplexe, darunter auch der BRCA1-beinhaltende BASC-Komplex, sind an diesem Prozess beteiligt. Darüber hinaus interagiert BRCA1 mit den Chromatin-remodellierenden Proteinen SWI/SNF, sowie der Helikase BACH1 [118, 149, 150]. Die pathogene krebsdisponierende Deletion von Exon 11 des *BRCA1*-Gens führt zu einer reduzierten Affinität des BRCA1-Proteins zu seinen Chromatin-remodellierenden Interaktionspartnern [149]. Dies spricht für eine wichtige Rolle der Chromatin-Remodellierung für die Tumorsuppressoreigenschaften des BRCA1-Proteins.

## Ubiquitinierung

Viele von BRCA1 ausgeführte Funktionen beruhen auf der Aktivität als E3-Ubiquitin-Ligase, die BRCA1 als Heterodimer mit dem Interaktionspartner BARD1 ausübt [151]. Bei der Ubiquitinierungsreaktion wird das globuläre Protein Ubiquitin kovalent über eine Isopeptidbindung an Zielproteine gebunden und modifiziert somit deren Eigenschaften und zelluläre Schicksale. Proteine mit E3-Ubiquitin-Ligasefunktion sind für die Substratspezifität der Ubiquitinierungsreaktion verantwortlich. BRCA1 vermittelt die Ubiquitinierung verschiedener Zellzyklus- und DNA-Reparatur-regulierender Proteine, und induziert somit deren Degradierung über das 26S-Proteasom, was wiederum diese Prozesse reguliert [152, 153]. Der BRCA1-abhängige proteasomale Abbau der Proteine Cyclin B und CDC25C verhindert z.B. die Akkumulation dieser Proteine und damit das Voranschreiten des Zellzyklus zur Mitose [153]. Die DNA-Schaden-abhängige Ubiquitinierung der Endonuklease CtBP-interacting protein (CtiP) wiederum führt nicht zu deren Degradierung, sondern zu einer Anlagerung an das Chromatin und zur Kontrolle des G2/M-Checkpoints [154].

BRCA1 ist ebenfalls an der spezifischen Ubiquitinierung von H2A-Histonen beteiligt und sorgt so für die Stabilität des Heterochromatins [155–157]. Der Verlust der BRCA1-Aktivität im Mausmodell führt zur Reduktion kondensierter DNA-Regionen im Genom und zur transkriptionellen Derepression der Satelliten-DNA und damit assoziierter genomischer Instabilität [158].

### 1.4.3 *BRCA1* bei der hereditären und sporadischen Tumorgenese

Keimbahnmutationen der Gene *BRCA1* und *BRCA2* sind ursächlich für eine erbliche Form von Brust- und Eierstockkrebs (HBOC), der sich durch ein lebenszeitlich deutlich früheres Auftreten kennzeichnet als sporadische Formen. 0,1 bis 0,2% der Gesamtbevölkerung sind von pathogenen *BRCA1/2*-Mutationen betroffen [159, 160]. Dabei liegt die Prävalenz in einigen Bevölkerungsgruppen, wie z.B. Ashkenazi-Juden, durch die Existenz von Gründermutationen um einen Faktor 10 höher [161, 162].

Das Risiko für prädisponierte Frauen bis zu einem Alter von 80 Jahren an Brustkrebs zu erkranken liegt für *BRCA1*-Mutationen bei 80% sowie für *BRCA2*-Mutationen bei 88% und damit in etwa 6-mal höher als für die Gesamtbevölkerung im selben Alter [163, 164]. Die Penetranz für Ovarialkarzinome liegt bei 65% bzw. 37% für *BRCA1* bzw. *BRCA2*-Mutationen [163]. *BRCA1/2*-Mutationen führen auch in männlichen Individuen zu einer erhöhten Krebsinzidenz, wobei hier *BRCA2*-Veränderungen einen deutlich stärkeren Einfluss haben und insbesondere das Risiko für männlichen Brustkrebs, Prostatakrebs sowie Pankreaskarzinome erhöhen [165]. Darüber hinaus wurden Keimbahnmutationen der Gene *BRCA1/2* mit einer Vielzahl weiterer Tumorentitäten in Verbindung gebracht. So fanden sich in unterschiedlichen Metastudien Assoziationen mit dem Risiko für verschiedene intestinale Tumore, Eileitertumore, Hirntumore, hämatologische Malignitäten, Lymphome und Melanome [166–170]. Viele dieser Assoziationen konnten jedoch nicht mit ausreichender statistischer Stärke belegt werden und waren im Vergleich unterschiedlicher Studien inkonsistent [171]. Dies liegt möglicherweise darin begründet, dass die moderate Suszeptibilität für andere als Brust- und Ovarialtumore in *BRCA1/2*-Mutationsträgern von exogenen oder weiteren genetischen Faktoren mitbeeinflusst wird und daher zwischen verschiedenen ethnischen und geographischen Populationen variieren kann [167].

Eine konstitutive komplette Defizienz von *BRCA1* durch biallelische Keimbahnmutationen galt lange Zeit als nicht mit dem Leben vereinbar zu sein. Diese Annahme wurde ebenfalls durch Mausmodell-Experimente gestützt. Embryonen mit homozygoter Defizienz des murinen *Brca1*-Gens sterben bereits zwischen dem 10. und 13. Tag der Gestation und weisen multiple Entwicklungsdefekte neurologischer Gewebe auf, die auf eine Deregulation von Proliferation und Zelltod hindeuten [172–174]. Aktuell wurde jedoch von zwei Patienten mit biallelischen pathogenen *BRCA1*-Varianten berichtet, die im Alter von 23 bzw. 28 Jahren an Brustkrebs bzw. Ovarialkarzinom erkrankten. Beide zeigten darüber hinaus multiple kongenitale

Anomalien wie Kleinwuchs, Mikrozephalie und mentale Retardierung, sodass das Krankheitsbild als neuer Subtyp der Fanconi-Anämie (FA-S) definiert werden konnte [175, 176].

Bis heute ist nicht abschließend geklärt worin die hohe Gewebespezifität von *BRCA1*-Varianten für den hoch-penetranten Phänotyp begründet liegt. Es wird jedoch vermutet, dass hier die hormonelle Sensitivität des Zielgewebes eine entscheidende Rolle spielt [177]. In nicht östrogen-responsiven Geweben gehen Zellen mit somatisch erworbener, vollständiger *BRCA1*-Defizienz durch ROS (reaktive Sauerstoffspezies)-induzierten Zelltod zugrunde. In Brust- und Ovarialgewebe hingegen kommt es unter Östrogeneinfluss zur Aktivierung des Pi3K/AKT-Signalwegs, der die nukleäre Akkumulation von Nrf2 bedingt [178]. Nrf2 ist ein Transkriptionsfaktor der die Expression von antioxidativen und Phase-II-Enzymen der Biotransformation reguliert und somit zur Neutralisierung der adversen Effekte von ROS beiträgt [179]. Dieser Prozess ermöglicht das Überleben *BRCA1*-defizienter Brustepithelzellen sowie *BRCA1*-defizienter Brusttumorzellen *in vitro* und somit vermutlich auch die Tumorgenese in östrogenabhängigem Gewebe *in vivo* [180, 181]. *BRCA1* fungiert darüber hinaus als Koregulator der Androgenrezeptor-Transaktivierung und des Androgen-induzierten Zelltods [182, 183]. Diese Funktion könnte mit dem erhöhten Risiko für Prostatakrebs in männlichen *BRCA1/2*-Mutationsträgern in Verbindung stehen. Da im menschlichen Organismus die Östrogen- bzw. Androgen-Sensitivität jedoch nicht nur auf Brust-, Ovarial- und Prostatagewebe beschränkt ist, sondern in unterschiedlich starker Ausprägung eine Vielzahl weiterer Organe betrifft, kann die oben beschriebene Hypothese keine vollständige Erklärung für die Gewebespezifität bieten.

Mammakarzinome von Patienten mit *BRCA1*- und teilweise auch *BRCA2*-Mutationen weisen histopathologisch spezifische Charakteristika auf. Das Tumorgewebe ist häufig nur sehr schwach differenziert und anaplastisch, sodass laut dem Klassifizierungssystem der „Union Internationale Contre le Cancer“ (UICM) eine Einstufung als „hochgradig“ vorgenommen wird [184]. Weitere Indikatoren für eine *BRCA1*-abhängige hereditäre Ätiologie sind eine scharfe, periphere Begrenzung, starke lymphozytäre Infiltration und starke mitotische Aktivität [184–186]. In 90% der Fälle weisen *BRCA1*-abhängige Tumore keine Rezeptoren für die Steroidhormone Östrogen und Progesteron auf. Ebenfalls zeigt sich keine Amplifikation der epidermalen Wachstumsfaktorrezeptoren Her2/neu (human epidermal growth factor receptor 2, erb-B2, c-erbB2), sodass Tumore in dieser typischen Kombination häufig als „triple-negativ“ bezeichnet werden können [184, 186]. Etwa 80% der triple-negativen Tumore sind „basal“, d.h. sie besitzen ein Expressionsprofil, das demjenigen basal-myoeptithelialer Zellen der normalen Brust

entspricht, und durch typische Marker (CK5/6, CK17, CK14) gekennzeichnet ist [187]. Darüber hinaus zeigen viele Tumore eine stark positive immunochemische Anfärbbarkeit des Tumorsuppressors p53 und in 66% der Fälle das Vorhandensein somatischer Mutationen des Tumorsuppressorgens *TP53* im Vergleich zu 35% der sporadischen Tumore [184, 185, 188, 189].

Veränderungen der Gene *BRCA1* und *BRCA2* sind nicht nur für die hereditäre Tumorgenese ursächlich sondern spielen auch eine entscheidende Rolle bei der sporadischen Tumorgenese. In 50-70% der sporadischen Brust- und Ovarialtumore ist ein somatischer Verlust (LOH) eines *BRCA1*-Allels sowie in 30-50% eines *BRCA2*-Allels nachweisbar [190, 191]. *BRCA1/2*-mRNA-Transkript sowie Protein sind in etwa 90% der sporadischen hochgradigen Tumore stark reduziert oder überhaupt nicht detektierbar [192, 193]. Eine aberrante Methylierung des *BRCA1*-Promoters wird in 11-14% der sporadischen Mammakarzinome und in 5-31% der Ovarialkarzinome gefunden, sodass eine epigenetische Stilllegung neben LOH einen Mechanismus der *BRCA1*-Inaktivierung in der sporadischen Tumorgenese darstellt [194–199].

## 1.5 Epigenetik

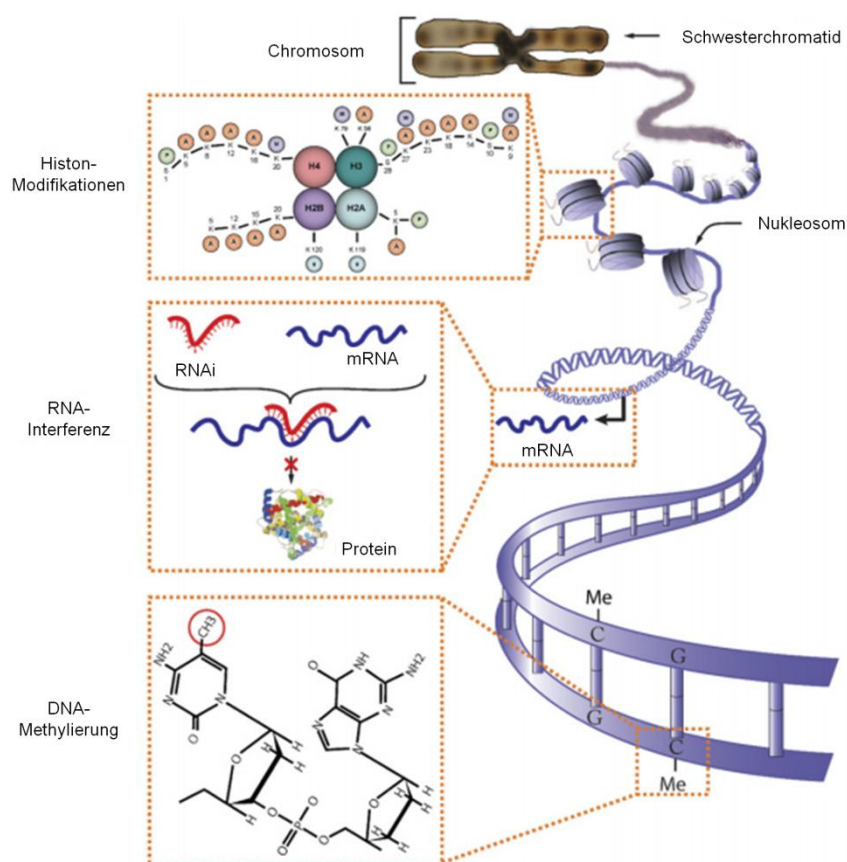
1942 führte der britische Entwicklungsbiologe Conrad Hal Waddington die Epigenetik (altgr. Epi: „dazu“, „außerdem“) als mechanistische Grundlage für die durch äußere Einflüsse induzierte phänotypische Plastizität eines Genotyps ein. Er definierte die Lehre der Epigenetik als „Zweig der Biologie, der kausale Wechselwirkungen zwischen Genen und deren Produkten studiert, die schließlich den Phänotyp hervorbringen“ [200].

Der heutige Begriff Epigenetik umschreibt die Gesamtheit der reversiblen transkriptionellen und postranskriptionellen Regulationsmechanismen der Genaktivität, die nicht in der DNA-Basensequenz kodiert, jedoch mitotisch und teilweise auch meiotisch vererbbar sind [201]. Zu den epigenetischen Mechanismen gehören die DNA-Methylierung [29, 202], Histon-Modifikationen [203, 204], Remodellierung der Chromatin-Architektur [203, 204] sowie RNA-Interferenz-vermittelte Mechanismen [205, 206] (siehe Abb. 5).

Epigenetische Modifikationen steuern gewebe- und zelltypspezifisch das transkriptionelle Programm einer Zelle und sind daher entscheidend an der Aufrechterhaltung einer normalen Physiologie beteiligt. Die Entstehung vieler pathologischer Prozesse unterschiedlichster Art, so wie Krebs,



Autoimmunerkrankungen und Depressionen gehen mit Aberrationen epigenetischer Modifikationen einher [194, 195, 207, 208].



**Abb. 5 Drei Typen epigenetischer Information.** Histon-Modifikationen, RNA-Interferenz und DNA-Methylierung. Abbildung modifiziert nach Sawan et al. (2008) [209].

### 1.5.1 DNA-Methylierung

Die am besten untersuchte epigenetische Modifikation der DNA ist die Methylierung, die in Eukaryoten auf die kovalente Verknüpfung einer Methylgruppe mit der C5-Position von Cytosinbasen beschränkt ist [210, 211]. 98% der DNA-Methylierung in somatischen Zellen findet sich im Kontext von CpG-Dinukleotiden, wobei die meisten dieser Positionen im Genom methyliert vorliegen [212]. Eine Ausnahme bilden die sogenannten CpG-Inseln (CGIs), Cluster von CpGs-Stellen die zum größten Teil unmethyliert sind [213–215]. CGIs beherbergen in etwa 7% aller CpGs im menschlichen Genom, obwohl sie nur etwa 0,7% der Gesamtsequenz ausmachen [216, 217]. CGIs kolokalisieren mit den Promotoren aller bekannten konstitutiv exprimierten Haushaltsgene, sowie mit 40% der gewebespezifisch exprimierten Gene [218, 219]. Es besteht eine negative Korrelation zwischen der DNA-Methylierung von Promotoren

und der Expressionsaktivität benachbarter Transkriptions-Startstellen [220, 221], die vermutlich durch zwei unterschiedliche Mechanismen zustande kommt. Zum einen kann DNA-Methylierung die Bindung von aktivierenden sowie reprimierenden Transkriptionsfaktoren an ihre spezifischen Transkriptionsbindungsstellen sowohl positiv als auch negativ beeinflussen und damit die Expression modulieren [222–225]. Zum anderen binden Methyl-bindende Proteine (MBDs) methylierte CpG-Dinukleotide und induzieren damit eine Deacetylierung der Histone, die folglich eine Chromatin-Kondensation und Gen-Repression hervorruft [226, 227].

### 1.5.2 DNA-Methylierung und Krebs

Krebsentstehung ist mit weitreichenden Veränderungen der DNA-Methylierungsmuster assoziiert. Diese können sowohl Verluste als auch Zugewinne von 5-Methylcytosinen darstellen, die entsprechend Hypomethylierung bzw. Hypermethylierung genannt werden.

#### 1.5.2.1 Methylierungsveränderungen in der Tumorgenese

Die Evolution von Tumorzellen geht mit einer globalen, genomweiten Hypomethylierung einher [228], die für eine genomische Instabilität und generalisierte transkriptionelle Deregulation verantwortlich ist [229, 230]. Dem gegenüber steht die spezifische Hypermethylierung von CpG-Inseln in Promotorregionen, insbesondere denen von Tumorsuppressorgenen [31, 231, 232]. Die hierdurch vermittelte transkriptionelle Stilllegung dieser Gene führt zur Fehlleitung Krebs-relevanter Signalwege und fördert somit die weitere Evolution der Krebszellen. Das Muster der Promoter-Hypermethylierung verschiedener TSGs ist teilweise spezifisch für bestimmte Tumorentitäten und kann daher als Tumormarker Verwendung finden [233, 234]. Einige Tumorarten zeigen jedoch eine Hypermethylierung zahlreicher CpG-Inseln im gesamten Genom, eine Ausprägung die als „CpG Island Methylator Phenotype“ (CIMP) beschrieben wird und sowohl mit günstigen als auch ungünstigen Prognosen in Verbindung gebracht wurde [235, 236]. Kürzlich veröffentlichte Studien postulieren, dass globale sowie spezifische Aberrationen der Methylierung im Rahmen der Krebsentstehung eine Konsequenz somatischer Mutationen in Genen der epigenetischen Regulation sowie z.B. *DNMT3*, *IDH1/2* oder *TET2* sein können [236–239].

### 1.5.2.2 Epimutationen und hereditäre Tumordisposition

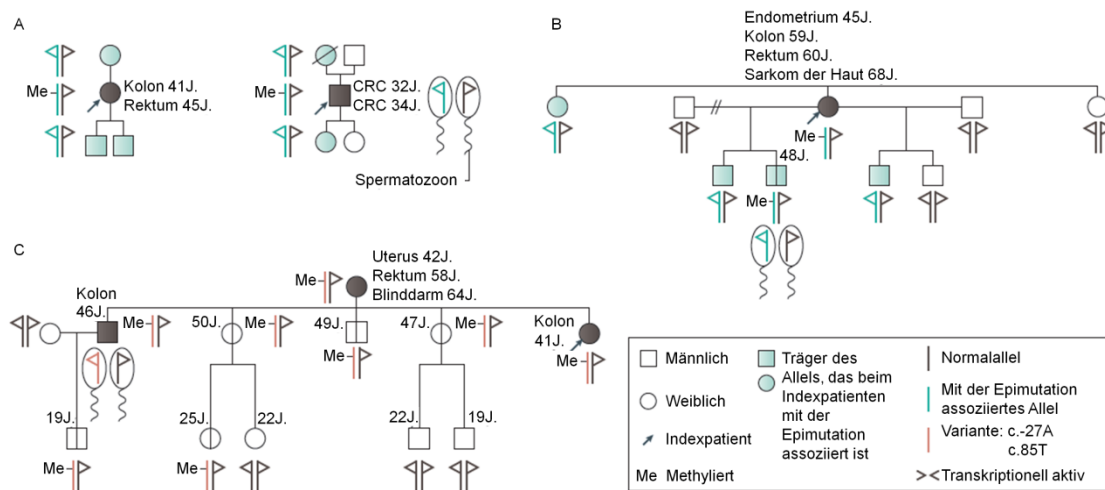
Hypermethylierung von TSG-Promotoren können nicht nur im Laufe der Tumorentstehung erworben werden, sondern auch als konstitutionelle Epimutationen in nicht-neoplastischem Gewebe vorkommen. Die epigenetisch vermittelte transkriptionelle Stilllegung eines TSG-Allels kann in hereditären Tumordispositionssyndromen analog zu Sequenzmutationen als „Erster Hit“ im Sinne der Knudson-Hypothese angesehen werden [240]. Konstitutionelle Epimutationen treten häufig in Form eines somatischen Aberrationsmosaiks auf [241]. So prädisponieren z.B. Epimutationen des maternalen Allels der Imprinting Kontrollregion 1 (ICR1) auf Chromosom 11p15 im Nierenparenchym für die Entstehung pädiatrischer Wilms-Tumore. Dies ist mit dem Verlust der genetischen Prägung (*loss of imprinting*, LOI) der reziprok aktiven Gene *H19* und *IGF2* und des selektiv-parentalen Expressionsmusters verbunden [242, 243].

Konstitutive Methylierungsveränderungen der Gene *BRCA1* und *RAD51* wurden als Dispositionsfaktor für frühen Brust- und Ovarialkrebs und andere Krebsarten diskutiert, wobei die Evidenzlage für diese Korrelationen noch limitiert ist [244–247]. In mehreren Studien konnten in Individuen mit für HBOC typischen Stammbäumen aber ohne Nachweis einer Sequenzmutation monoallelische *BRCA1*- und *RAD51*-Epimutationen in etwa 12-40% der Blutzellen detektiert werden [244, 245]. Der Grad des Methylierungsmosaiks korrelierte dabei mit der Ausprägung von für *BRCA1*-Mutationen typischen morphologischen Eigenschaften des Mammatumors [246]. Eine *BRCA1*-Epimutation im Mosaik konnte ebenfalls als wahrscheinliche Ursache für den Krebs-diskordanten Phänotyp eines von unserer Gruppe beschriebenen und in der vorliegenden Arbeit analysierten monozygoten Zwillingspaares identifiziert werden [247].

Epimutationen der Gene *MLH1* (MutL homolog 1, colon cancer, nonpolyposis type 2) und *MSH2* (MutS protein homolog 2) wurden alternativ zu Sequenzmutationen als Ursache für das Lynch-Syndrom, eine familiäre Darmkrebsform ohne Polyposis, beschrieben [248]. Diese betroffenen Patienten zeigten sowohl eine aberrante Methylierung des *MLH1*-Promoters im Blut und anderen non-neoplastischen Geweben als auch im Tumorgewebe. Die Inaktivierung des unmethylierten Alleles durch LOH oder somatische Mutationen im Tumorgewebe stellten den „Zweiten Hit“ nach Knudson dar und führten zum Verlust der *MLH1*-Expression sowie zu einem MSI (Mikrosatelliteninstabilitäts)-Phänotyp des Tumors und belegen damit die pathogene Kausalität der Epimutation für die Krebsentstehung [249–251]. *MLH1*-Epimutationen

sind schätzungsweise für 1-10% der Krankheitsfälle verantwortlich, in denen die Patienten die klinischen Kriterien eines Lynch-Syndroms erfüllen und deren Tumore immunohistochemisch einen kompletten Verlust der *MLH1*-Expression zeigen, jedoch keine Sequenzmutationen der Gene *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS2* oder *EPCAM* nachgewiesen werden können [252].

Aufgrund der bereits zahlreich bekannten Familien mit epigenetisch verursachtem Lynch-Syndrom dient diese Erkrankung als Modell zur Erforschung der intergenerationalen Vererbungsmuster (siehe Abb. 6) von Krebs-prädisponierenden Epimutationen.



**Abb. 6 Vererbungsmodi konstitutiver *MLH1*-Epimutationen in Familien mit Lynch-Syndrom.** A) Zwei Stammbäume mit *de novo* Entstehung einer *MLH1*-Epimutation und fehlender transgenerationaler Transmission, B) Nicht-Mendelsche Vererbung einer *de novo* entstandene *MLH1*-Epimutation mit partieller Löschung des Methylierungsdefekts in der Keimbahn, C) Dominante Mendelsche Vererbung einer sekundären *MLH1*-Epimutation hervorgerufen durch eine Sequenzvariante. Es kommt zur Löschung der Methylierungsaberration in der Keimbahn und einer Wiederherstellung in den von der Sequenzvariante betroffenen Nachkommen. Abbildung modifiziert nach Hitchins et al. (2015) [240].

In den meisten bisher beschriebenen Fällen handelte es sich um eine *de novo* Entstehung der *MLH1*-Aberrationen, zumeist auf dem maternalen Allel und mit fehlender Weitergabe an die Nachkommen (Abb. 6A) [240, 253, 254]. In einem Fall wurde eine nicht-mendelsche Vererbung des Methylierungsdefekts von einer erkrankten Frau an nur einen ihrer drei Söhne berichtet, wobei alle Nachkommen das betroffene Allel ererbt hatten [255]. Bei zweien der Söhne lag das Allel jedoch unmethyliert vor und wurde regelrecht transkribiert, was für eine partielle Löschung der Epimutation in

der weiblichen Keimbahn spricht. Die Spermatozoen des Sohnes mit der ererbten *MLH1*-Epimutation zeigten ebenfalls eine komplette Reversion des betroffenen Allels zum normalen Methylierungszustand (Abb. 6B). Eine Vererbung nach einem klassischen dominanten Mendelschen Muster zeigt sich in Fällen, in denen die *MLH1*-Epimutation sekundär als Folge eines *cis*-agierenden genetischen Defektes in der genomischen Umgebung bedingt ist, so wie es z.B. für den bekannten Austausch *c.-27C>A* in der 5' untranslatierten Region von *MLH1* der Fall ist [256, 257]. In den Spermatozoen betroffener Männer ist die Epimutation nicht nachweisbar, wird jedoch in der nächsten Generation bei Ererbung des veränderten Allels wiederhergestellt (Abb. 6c).

## 1.6 Zielsetzung der Arbeit

Obwohl der Verlust der *BRCA1*-Funktion als entscheidender Motor, sowohl für die sporadische als auch die hereditäre Tumorgenese gilt und diese Assoziation zahlreich beschrieben ist, konnte der genaue Pathomechanismus bisher nicht endgültig aufgeklärt werden. Da sich die meisten Vorhaben zur Erforschung der *BRCA1*-abhängigen Kanzerogenese auf Krebszelllinien beschränken, sind die Konsequenzen einer *BRCA1*-Haploinsuffizienz in gesundem Gewebe genetisch prädisponierter Individuen weitgehend unbekannt.

Ziel dieser Arbeit war die umfangreiche Charakterisierung der molekularen und zellbiologischen Effekte einer *BRCA1*-Haploinsuffizienz in nicht-neoplastischen Zellen mesenchyalem Ursprungs. Als Untersuchungsmaterial dienten primäre dermale Fibroblasten (*BRCA1*<sup>mosMe</sup>) einer Patientin mit multiplen Neoplasien sowie einer konstitutionellen *BRCA1*-Epimutation. Als Kontrolle standen isogene Fibroblasten (*BRCA1*<sup>wt</sup>) der gesunden monozygoten Zwillingsschwester mit normalem Methylierungsstatus des *BRCA1*-Promoters zur Verfügung. Dadurch wurde eine Analyse in einem einzigartigen isogenen System ermöglicht.

Mittels komparativer Microarray-basierter Transkriptomanalyse und anschließender bioinformatischer Genontologie-Anreicherungsuntersuchung sollten Rückschlüsse auf deregulierte molekulare Signalwege und zelluläre Prozesse gezogen werden. Diese Befunde sollten anschließend ergebnisabhängig durch entsprechende Analysen zur Charakterisierung zellbiologischer Eigenschaften, wie z.B. Proliferations- und Migrationsverhalten, Metabolismus und Zytoskelett-Architektur ergänzt werden. Zur Beurteilung des tumorigenen Potenzials der aberranten transkriptionellen und

zellulären Eigenschaften der *BRCA1*<sup>mosMe</sup> Fibroblasten sollte der Einfluss der sezernierten Fraktion dieser Zellen auf das Wachstum von Krebszellen beobachtet werden.

# 2 Material und Methoden

## 2.1 Material

### 2.1.1 Verwendete Geräte

5415D, Tischzentrifuge	Eppendorf, Hamburg
Axiovert 25, Durchlichtmikroskop	Carl Zeiss, Oberkochen
CB 210, Zellkulturinkubator	Binder, Tuttlingen
CLSM 510-UV, konfokales Laserscanmikroskop	Carl Zeiss, Oberkochen
DNA Engine Tetrad <sup>®</sup> 2, Thermocycler	Bio-Rad, München
EVOS <sup>®</sup> XL Cell Imaging System	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
FACSDiva <sup>™</sup> , Durchflusszytometer	Becton Dickinson, Heidelberg
Gel iX Imager, Transilluminator	Intas, Göttingen
GeneChip <sup>®</sup> Fluidics Station 450	Affymetrix, Santa Clara, USA
GeneChip <sup>®</sup> Hybridization Oven 645	Affymetrix, Santa Clara, USA
GeneChip <sup>®</sup> Scanner 3000	Affymetrix, Santa Clara, USA
Heraeus <sup>™</sup> Megafuge <sup>™</sup> 16R	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
HS18, Sterilwerkbank	Kendro Laboratory Products, Hanau
Mini-PROTEAN <sup>®</sup> System, SDS-PAGE-System	Bio-Rad, München
Molecular Imager <sup>®</sup> Chemidoc <sup>™</sup> XRS	Bio-Rad, München
NanoDrop <sup>™</sup> ND 2000, Spektralphotometer	Peqlab, Erlangen
peqPOWER E300, Spannungsgerät	Peqlab, Erlangen

PerfectBlue™ Minigelsysteme	Peqlab, Erlangen
PyroMark Q96 ID, Pyrosequenzierer	Qiagen, Hilden
Safire, Luminometer	Tecan, Maennedorf, Schweiz
Spectra FlourPlus, Fluorometer	Tecan, Maennedorf, Schweiz
StepOnePlus™, Real time Thermozykler	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
TransBlot® Turbo™ Transfer System	Bio-Rad, München
Vacuum prep worktable	Biotage, Uppsala, Schweden
vortex-genie 2, Rüttler	Scientific Industries, New York, USA
VWB 26, Wasserbad	VWR, Darmstadt

### 2.1.2 Gebrauchsgegenstände

8-Kammer-Objektträger	BD Biosciences, San José, USA
96-well-qPCR-Platten	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
accu-jet® pro, Pipettierhilfe	Braun, Melsungen
Adhesive Sealing Sheets	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Cellstar®, 96-well-Kulturplatten	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Cellstar®, serologische Pipetten	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Cellstar®, Zellkulturflaschen	Greiner Bio-One, Frickenhausen
CoolCell® LX Container, Einfrierbehälter	Biocision, Larkspur, USA
Cryotubes, Kryokonservierungsröhrchen	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Culture-inserts in $\mu$ -dish 35 mm	IBIDI, Martinsried
CytoScan HD Array	Affymetrix, Santa Clara, USA
Einkanalpipetten	Gilson, Villiers-le-Bel, Frankreich
HuGene 1.0 ST Array	Affymetrix, Santa Clara, USA
Mikroreaktionsgefäße	Sarstedt, Nümbrecht



---

Neubauer-Zählkammer	Brand, Wertheim
Pipettenspitzen mit Filter	Starlab, Hamburg
Polypropylenröhrchen mit Schraubverschluss	Greiner Bio-One, Frickenhausen
TransBlot® Turbo™ Mini PVDF Transfer Packs	Bio-Rad, München

### 2.1.3 Chemikalien

Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Sigma-Aldrich, München
<i>Aqua ad iniectabilia</i>	B.Braun, Melsungen
Bromophenolblau	Merck, Darmstadt
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth, Karlsruhe
Dithreitol (DTT)	Sigma-Aldrich, München
Ethanol	Carl Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid 1%	Carl Roth, Karlsruhe
Giensa-Azur-Eosin Methylenblau	VWR, Radnor, USA
Glycerol	Sigma-Aldrich, München
Hoechst 33342	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Isopropanol	Carl Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe
Magnesiumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma-Aldrich, München
Natriumhydroxid	Carl Roth, Karlsruhe
Orange G	Sigma-Aldrich, München
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt
Permafluor™, Eindeckmedium	Beckman Coulter, Krefeld
Propidiumiodid	Sigma, St.Louis, USA

Rotiphorese <sup>®</sup> Gellösung 40	Carl Roth, Karlsruhe
Saponin	Invitrogen, San Diego, USA
β-Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
StarPure <sup>®</sup> Agarose Low EEO	Starlab, Hamburg
Tetramethylethyldiamin	Applichem, Darmstadt
TRIzol <sup>®</sup> Reagent	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Trypsin für die Chromosomenfärbung	Biochrom KG Seromed, Berlin
Tween <sup>®</sup> -20	Merck, Darmstadt

### 2.1.4 Kommerzielle Kits

Ambion <sup>®</sup> WT Expression Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
CellTiter-Glo <sup>®</sup> Luminiscence Kit	Promega, Madison, USA
CytoScan <sup>®</sup> HD Reagent Kit	Affymetrix, Santa Clara, USA
EZ DNA Methylation <sup>™</sup> Kit	Zymo Research, Irvine, USA
FastStart <sup>®</sup> Taq DNA Polymerase Kit	Roche Diagnostics, Rotkreuz, Schweiz
GeneChip <sup>®</sup> Hybridization, Wash and Stain Kit	Affymetrix, Santa Clara, USA
PyroMark <sup>®</sup> Reagent Kit	Qiagen, Hilden
QIAamp <sup>®</sup> DNA Mini Kit	Qiagen, Hilden
QuantiTect <sup>®</sup> SYBR RT-PCR Kit	Qiagen, Hilden
Qubit <sup>™</sup> Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
RNeasy <sup>®</sup> Mini Kit	Qiagen, Hilden
SuperScript <sup>®</sup> III First-Strand Synthesis System	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Western Lightning <sup>®</sup> Chemiluminescence Reagent	Perkin Elmer, Waltham, USA
β-Hydroxybutyrate Assay Kit	Sigma-Aldrich, München

### 2.1.5 Software

ChemiDoc™ Image Lab	Bio-Rad, München
Chromosome Analysis Suite 2.0	Affymetrix, Santa Clara, USA
Expression Console	Affymetrix, Santa Clara, USA
Gimp 2.8	Peter Mattis
ImageJ	Wayne Rasband, NIH, USA
Intas Capture	Intas, Göttingen
LSM 510	Carls Zeiss, Oberkochen
PyroMark Assay Design SW 2.0	Qiagen, Hilden
PyroMark CpG Software	Qiagen, Hilden
R Studio	R, Boston, USA
StepOne™ Software 2.3	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Tecan Xfluo™	Tecan, Maennedorf, Schweiz
Transcriptome Analysis Suite	Affymetrix, Santa Clara, USA
ZEN 2011	Carls Zeiss, Oberkochen

### 2.1.6 Puffer, Lösungen und Medien

Kommerziell erhältliche Puffer und Medien für die Zellkultur:

Gibco® Dulbecco's modified eagle medium (DMEM)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Gibco® Dulbecco's phosphate buffered saline	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Gibco® Fötale Bovines Serum (FBS)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Gibco® Natrium-Pyruvat (100mM)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Gibco® Penicillin-Streptomycin	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Gibco® Recovery Cell Culture Freezing Medium	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

Gibco® Trypsin-EDTA (0,05%), phenol red Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

Selbst hergestellte Puffer und Medien:

„Lower Tris“ für SDS-PAGE-Trenngel	1,5M Tris-HCl pH 8,8
„Upper Tris“ für SDS-PAGE-Sammelgel	1M Tris-HCl pH 6,8
0,1M Sörensen-Puffer zur Chromosomenfärbung	122 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x2H <sub>2</sub> O, 78 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x2H <sub>2</sub> O, pH 7,2
Denaturierungspuffer Pyrosequenzierung	200 mM NaOH
DMEM-Vollmedium	500 ml DMEM, 10% FBS, 1% Pen/Strep, 1% Natrium-Pyruvat
IF-Blockpuffer	3% BSA in PBS, 0,1% Tween 20
Magic mix	48% Harnstoff, 15mM Tris-HCl pH 7,5, 8,7% Glycerin, 1%SDS, 0,004% Bromphenolblau, 143 mM β- Mercaptoethanol
PBST (WB-Waschpuffer)	137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 1,8 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 0,2% Tween 20
SDS-PAGE Laufpuffer	25 mM Tris-HCl pH 8,3; 250mM Glycin, 0,1% SDS
Serumfreies DMEM-Medium	500 ml DMEM, 1% Pen/Strep, 1% Natrium-Pyruvat
Trypsin-Stammlösung zur Chromosomenfärbung	2,5% Trypsin in H <sub>2</sub> O
Waschpuffer Pyrosequenzierung	10 mM Tris-HCL pH 7,6, 2M NaCl, 1 mM EDTA, 0,1% Tween 20
WB-Blockpuffer	5% Milchpulver in PBST

### 2.1.7 Probanden, Anamnese und Probenmaterial

Das im Folgenden verwendete Patientenmaterial stammt aus einem Probandenkollektiv, das im Rahmen einer Kooperationsstudie vom Institut für Humangenetik Mainz sowie dem Deutschen Kinderkrebsregister rekrutiert worden war. Die Studie wurde durch ein Votum der Ethikkommission der Landesärztekammer Rheinland-Pfalz legitimiert (Nr. 837.440.03(4102)). Es handelt sich um Material eines weiblichen monozygoten Zwillingspaars mit diskordanter Krebsdisposition, das im Weiteren mit A24 bzw. D24 kodiert wird. Die Zwillingsschwester wurden 1977 geboren und wuchsen im gleichen Haushalt auf. 1982, im Alter von vier Jahren, wurde bei A24 eine B-Zell-Vorläufer lymphatische Leukämie (ICD10: C91.0) diagnostiziert. Ein erster chemotherapeutischer Behandlungsversuch musste auf Grund einer Streptokokken-Sepsis abgebrochen werden. Im Jahr 1984 folgte eine radiochemotherapeutische Behandlung. Auf Grund eines Rezidivs im gleichen Jahr wurde eine Knochenmarkstransplantation mit Spendermaterial der gesunden Schwester D24 durchgeführt, was zu einer kompletten Remission führte. 2003, im Alter von 25 Jahren, erkrankte A24 an einem Adenokarzinom der Schilddrüse (ICD10: C73), sodass diese operativ entfernt werden musste. Seitdem werden Schilddrüsenhormone mittels Substitutionstherapie zugeführt.

Weitere körperliche Unterschiede der beiden Zwillingsschwester zum Zeitpunkt der Untersuchung bezogen sich auf die Körpergröße (A24: 156 cm vs. D24: 168 cm) sowie den Kopfumfang (A24: 51 cm vs. D24: 52 cm). Sowohl bei D24, der gesunden Schwester, als auch bei Familienangehörigen der letzten vier Generationen sind keine Krebserkrankungen bekannt. Beiden Probanden wurden Hautbiopsien sowie Blut und Saliva entnommen.

### 2.1.8 Primärzellen und Zelllinien

Im Rahmen dieser Arbeit wurden folgende Primärzellen/Zelllinien verwendet:

#### Primäre humane dermale Fibroblasten

Die primären Fibroblastenkulturen wurden aus Hautstanzen etabliert, die 2006 den in 2.1.7 beschriebenen Individuen aus dem linken Oberarm entnommen wurden. Primäre Hautfibroblasten wachsen adhärent und weisen in Kultur eine Verdopplungszeit von etwa 18 bis 24 Stunden auf. Die Kulturen sind im Folgenden als  $BRCA1^{mosMe}/A24$  (betroffener Zwilling) bzw.  $BRCA1^{wt}/D24$  (gesunder Zwilling) kodiert. Kulturen, die aus einer Einzelzellklonierung von entstanden sind, wurden mit  $BRCA1^{mosMe}$  EZK n kodiert.

## **A549**

A549 ist eine Lungenkrebszelllinie, die 1972 aus dem entarteten Lungengewebe eines 58-jährigen kaukasischen Mannes etabliert wurde. Die Zelllinie wächst als Monolayer adhärent und enthält einen hypotriploiden Chromosomensatz.

## **HMLE**

Die HMLE-Zelllinie wurde aus gesundem, humanem Brustepithelgewebe isoliert und immortalisiert. Da sich in HMLE-Zellen experimentell effizient eine Epithelial-mesenchymale Transition (EMT) anstoßen lässt, werden sie häufig als Modell für Metastasierung verwendet.

## **2.2 Methoden**

### **2.2.1 Zellkultur und zellbiologische Methoden**

#### **2.2.1.1 Kultivierung humaner adhärent wachsender Zellen**

Alle verwendeten Zellkulturen wurden adhärent wachsend in Zellkulturflaschen mit Gasaustauschventil bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> in wassergesättigter Atmosphäre kultiviert. Ein Wechsel des Kulturmediums erfolgte alle zwei bis drei Tage. Soweit nicht anders angegeben wurde Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)-Vollmedium verwendet.

#### **2.2.1.2 Subkultivierung/Passagierung**

Die Zelldichte der kultivierten Zellen wurde regelmäßig mikroskopisch kontrolliert. Bei Erreichen einer Konfluenz von etwa 80% wurde eine Passagierung vorgenommen. Das Kulturmedium wurde hierzu vollständig entfernt und die Zellen wurden mit Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBD) gewaschen. Anschließend wurde der Zellrasen mit je 1 ml Trypsin/EDTA-Lösung pro 25 cm<sup>2</sup> Kultivierungsfläche versetzt und 3-5 min bei 37°C bis zur vollständigeren Ablösung inkubiert. Die Zellsuspension wurde mit einem entsprechenden Volumen an frischem DMEM-Vollmedium gemischt und in eine neue Zellkulturflasche geeigneter Größe überführt bzw. auf mehrere Flaschen aufgeteilt.

### 2.2.1.3 Zellzahlbestimmung

Zur Zellzahlbestimmung wurden 10 µl der Zellsuspension mittels Kapillarkraft in eine Neubauer-Zählkammer eingesogen. Anschließend wurden lichtmikroskopisch die Zellzahlen von acht Großquadraten der Kammer ausgezählt. Auf Grund des definierten Volumens der Zählkammer konnte die Zellkonzentration der Suspension über folgende Formel bestimmt werden:

$$\text{Zellzahl/ml} = \text{Arithmetisches Mittel der Zellzahl pro Quadrat} \times 10^4$$

Zur Unterscheidung toter und vitaler Zellen wurde die Zellsuspension vor der Zählung im Verhältnis 1:1 mit einer 0,4%-igen Trypanblaulösung vermischt. Abgestorbene, perforierte Zellen nehmen den Farbstoff auf und erscheinen im Mikroskop blau. Lebende Zellen hingegen bleiben ungefärbt. Bei der Berechnung der Zellzahl nach Trypanblaufärbung wurde der Verdünnungsfaktor berücksichtigt:

$$\text{Zellzahl/ml} = 2 \times \text{Arithmetisches Mittel der Zellzahl pro Quadrat} \times 10^4$$

### 2.2.1.4 Kryokonservierung

Zur Kryokonservierung wurden üblicherweise 80% konfluente Kulturen einer 25 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflasche verwendet. Dazu wurden die Zellen wie in 2.2.1.2 beschrieben geerntet und anschließend bei 1000 rpm für 5 Minuten abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde in 1 ml Recovery<sup>TM</sup> Cell Culture Freezing Medium resuspendiert und in ein Kryoröhrchen überführt, das in einem CoolCell<sup>®</sup>-Behälter bei -80°C eingefroren wurde. Nach ein bis zwei Tagen wurden die Kulturen zur dauerhaften Lagerung in flüssigen Stickstoff überführt.

### 2.2.1.5 Auftauen von kryokonservierten Zellen

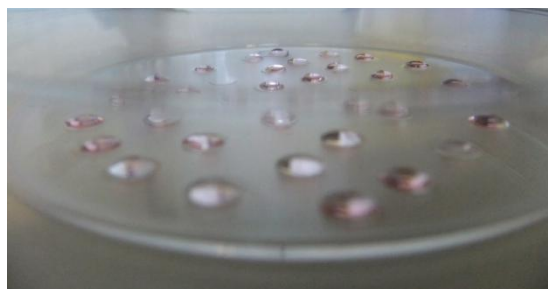
Kryokonservierte Zellen wurden bei 37°C schnell aufgetaut und in 8 ml DMEM-Vollmedium aufgenommen. Anschließend wurde die Suspension bei Raumtemperatur (RT) für 5 min bei 1000 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 3,5 ml frischem DMEM-Vollmedium aufgenommen, in eine 25 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflasche ausgesät und wie gewohnt weiterkultiviert.

### 2.2.1.6 Herstellen von konditioniertem Medium

Zur Herstellung von Fibroblasten-konditioniertem Medium wurden 500.000 Zellen in einer 25 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflasche in 3 ml Vollmedium ausgesät. Nach 72-stündiger Kultivierung im Zellinkubator wurde das Medium abgenommen, 10 min bei 4000 rpm zentrifugiert, um feste Bestandteile abzutrennen und anschließend in 1 ml Aliquots bei -80°C asserviert. Zur Herstellung von Serum-freiem konditioniertem Medium wurden die Zellen 24 Stunden nach der Aussaat drei Mal mit DPBS gewaschen, anschließend 72 Stunden in Serum-freiem DMEM inkubiert und wie beschrieben geerntet. Als Kontrolle diente DMEM-Vollmedium bzw. Serum-freies DMEM, das unter denselben Bedingungen allerdings in einer zellfreien Kulturflasche inkubiert und analog behandelt worden war.

### 2.2.1.7 Einzelzellklonierung primärer Fibroblasten

Um eine effiziente Einzelzellklonierung der primären Fibroblastenkulturen zu erreichen, wurde eine neue Klonierungsstrategie entwickelt, die die Vorteile der üblichen Limiting-Dilution-Methode und der Klonierung mit Hilfe von Glassplittern [258] verbindet. Dafür wurden zuerst 6 mm-Deckgläschen in einer Zellkulturschale platziert. In die Mitte eines jeden Deckgläschens wurden 10 µl einer Zellsuspension gegeben, die auf rechnerisch eine Zelle pro µl verdünnt worden war (Abb. 7).

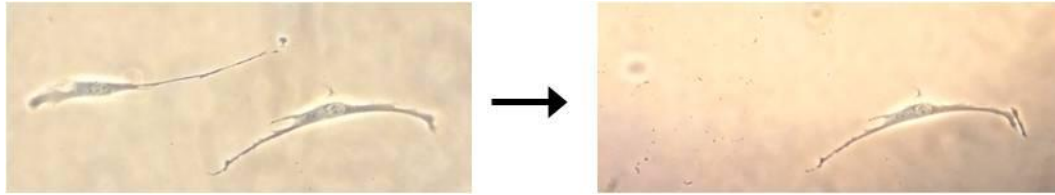


*Abb. 7 Erster Schritt der entwickelten Einzelzellklonierungsprozedur für primäre Hautfibroblasten.*

Um ein erstes Anhaften der Zelle an die Deckgläschen zu ermöglichen, wurden die Schalen eine Stunde im Zellkulturinkubator gelagert. Anschließend wurde die Kulturschale mit DMEM-Vollmedium aufgefüllt und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Unter mikroskopischer Kontrolle wurden am nächsten Tag Deckgläschen mit einer einzigen Zelle separiert und zur Kultivierung in eine 96-well-Platte überführt. Um eine bessere Effizienz zu erreichen, wurden Deckgläschen mit zwei oder drei angehafteten



Zellen nicht verworfen sondern sorgfältig mit einer feinen Pinzette von überzähligen Zellen befreit (Abb. 8).



*Abb. 8 Entfernen von überzähligen Zellen von den Deckgläschen zur Steigerung der Klonierungseffizienz*

Die Einzelzellen wurden zwei Mal wöchentlich mit steril filtriertem, konditioniertem Medium der Fibroblasten-Ausgangskultur gefüttert. Nach Erreichen einer 80%igen Konfluenz wurden die Einzelzellkulturen in Kulturgefäße eines nächstgrößeren Formats passagiert (96-well-Platte -> 48-well-Platte -> 24-well-Platte -> 12-well-Platte -> 6-well-Platte -> 25 cm<sup>2</sup>-Kulturflasche). Bei Erreichen der Konfluenz in einer 25 cm<sup>2</sup>-Flasche wurden die Einzelzellkulturen kryokonserviert und bis zur weiteren Analyse in flüssigem Stickstoff gelagert.

### **2.2.1.8 CellTiter-Glo<sup>®</sup> Lumineszenz-Zellviabilitätsassay**

Um das Proliferationsverhalten der primären Fibroblasten sowie den Einfluss des A24/D24-Fibroblasten-konditionierten Mediums auf die Proliferation von Krebszelllinien zu untersuchen, wurden Wachstumskurven mittels CellTiter-Glo<sup>®</sup> Lumineszenz Zellviabilitätsassays erstellt. Dieser Test beruht auf der Quantifizierung von ATP stoffwechselaktiver Zellen, das zur Oxidation von Luciferin beiträgt und dadurch eine messbare Lichtreaktion hervorruft. Dabei ist die Emissionsstärke des Lumineszenzsignals proportional zum intrazellulären ATP-Gehalt und dient als Maß für die Zahl lebender Zellen bezogen auf den Kontrollansatz zu Beginn des Wachstumsexperiments.

Es wurden jeweils 2.000 Fibroblasten in 100 µl DMEM-Vollmedium in eine 96-well-Platte ausgesät und bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Am nächsten Tag erfolgte die erste CellTiter-Glo<sup>®</sup> -Messung von sechs technischen Replikaten anhand der Anweisungen des Herstellers. Weitere Messungen wurden alle 24 Stunden für 10 Tage durchgeführt. Das Wachstumsmedium der Zellen wurde zwei Mal wöchentlich ausgetauscht.

Für die Untersuchung des Effektes von konditioniertem Medium der FIB A24- bzw. FIB D24-Kulturen auf das Proliferationsverhalten verschiedener Krebszelllinien wurden diese ebenfalls in 100 µl DMEM-Vollmedium in 96-well-Platten ausgesät. Die benötigte Zellzahl unterschied sich hierbei allerdings je nach Zelllinie sowie der Art des verwendeten Testmediums und ist in Tabelle 1 dargestellt.

**Tab. 2 Anzahl benötigter Zellen pro Ansatz eines CellTiter-Glo® Lumineszenz Zellviabilitätsassays mit Fibroblasten-konditioniertem Medium**

Zelllinie	FIB-kond. Med. serumhaltig	Zellzahl pro well
HMLE	+	2.000
HMLE	-	6.000
A549	+	500

Am nächsten Tag erfolgte eine Messung des Ausgangswertes. Anschließend wurde das Medium abgenommen und die Zellen zweimal mit 100 µl DPBS gewaschen. Je nach Ansatz wurden die Zellen mit serumhaltigen oder serumfreien konditioniertem Medium der Fibroblastenkulturen FIB A24 ( $BRCA1^{mosMe}$ ) bzw. FIB D24 ( $BRCA1^{wt}$ ) oder dem Kontroll-konditioniertem Medium gefüttert und für drei bis sechs Tage weiterkultiviert. Das Wachstumsverhalten wurde dabei alle 24 Stunden in 6 Replikaten mittels CellTiter-Glo® Lumineszenz Zellviabilitätsassay bestimmt.

### 2.2.1.9 Migrationsstudien

Um das *in vitro* Migrationsverhalten der primären Fibroblasten FIB A24 ( $BRCA1^{mosMe}$ ) bzw. FIB D24 ( $BRCA1^{wt}$ ) zu vergleichen, wurden Zellkultureinsätze (Culture-Inserts von IBIDI) verwendet, die es ermöglichen, Zellen in zwei Zellmonolayerflächen auszusäen, die durch einen Spalt definierter Breite getrennt sind. Dazu wurden jeweils 12.000 Zellen in 70 µl DMEM-Vollmedium pro Kammer des Einsatzes ausgesät. Nach 24 Stunden wurde der Einsatz mit einer sterilen Pinzette entfernt. Anschließend wurde die Migration der Zellen durch den Spalt alle 6 Stunden an einer definierten Stelle des Spalts mikroskopisch beobachtet und photographisch dokumentiert. Die Migrationsgeschwindigkeit wurde mittels der Software ImageJ unter Zuhilfenahme des Plug-Ins Scratch Assay Analyzer von MiToBo bestimmt und ausgewertet.

### 2.2.1.10 Immunfluoreszenzfärbung und konfokale Laserscannmikroskopie

Mit Hilfe der Immunfluoreszenzfärbung (IF) von Proteinen können deren Quantitäten und Lokalisationen innerhalb der Zelle untersucht werden. Bei der indirekten IF werden Primärantikörper verwendet, die an das Zielantigen binden. Im nächsten Schritt binden fluoreszenzmarkierte Sekundärantikörper an die Primärantikörper und ermöglichen einen fluoreszenzoptischen Nachweis des zu untersuchenden Proteins. Zur Orientierung innerhalb der Zellkompartimente werden Zellkerne üblicherweise mit dem Fluoreszenzfarbstoff Hoechst 33342 angefärbt.

Es wurden 7.000 Zellen der Fibroblastenkulturen FIB A24 (*BRCA1<sup>mosMe</sup>*) bzw. FIB D24 (*BRCA1<sup>wt</sup>*) pro Well eines 8-Kammer-Objektträgers ausgesät und über Nacht im Zellkulturinkubator kultiviert. Anschließend erfolgte die Fixierung der Zellen durch eine 10 minütige Inkubation mit 4% PFA in PBS bei RT. Nach dreimaligem Waschen mit DPBS wurden unspezifische Bindungsstellen durch Inkubation in IF-Blockpuffer blockiert. Zur Permeabilisierung der Zellmembranen wurden die Zellen anschließend 20 min mit 0,2% Saponin behandelt.

**Tab. 3 Primärantikörper und fluoreszierende Sekundärantikörper für die IF**

Antikörper	Verdünnung	Hersteller
Maus anti-Human Paxillin	1:100	R&D Systems
Kaninchen anti-Human Ki-67	1:200	Thermo Fisher Scientific (Molecular Probes)
Maus anti-Human Kollagen I	1:200	abcam
Alexa Fluor 488 Phalloidin	1:200	Thermo Fisher Scientific (Molecular Probes)
Hoechst 33342	1:5.000	Thermo Fisher Scientific (Molecular Probes)
Alexa Fluor 488 Maus anti-Kaninchen	1:200	Thermo Fisher Scientific (Molecular Probes)
Alexa Fluor 546 Maus anti-Kaninchen	1:200	Thermo Fisher Scientific (Molecular Probes)
Alexa Fluor 488 Ziege anti-Maus	1:200	Thermo Fisher Scientific (Molecular Probes)
Alexa Fluor 546 Ziege anti-Kaninchen	1:200	Thermo Fisher Scientific (Molecular Probes)

Der Primärantikörper wurde nach Angaben des Herstellers (siehe Tab. 3) in IF-Blockpuffer verdünnt und über Nacht bei 4°C auf die Zellen gegeben. Anschließend erfolgte dreimaliges Waschen mit PBST und die Inkubation mit dem Sekundärantikörper (1:200 verdünnt in IF-Blocklösung) und dem Kernfarbstoff Hoechst 33342 (1:10.000) für 1 Stunde bei RT unter Lichtausschluss. Nach der Färbung wurden die Zellen erneut drei Mal mit PBST sowie ein Mal mit destilliertem Wasser gewaschen, mit Permaflour eingedeckt und bis zur Detektion bei 4°C im Dunkeln aufbewahrt.

Die mikroskopische Analyse erfolgte an dem konfokalen Laserscanmikroskop CLSM 510-UV von Zeiss. Diese Art der Mikroskopie ermöglicht eine Untersuchung besonders dünner Präparatschnitte in hoher Auflösung. Dies beruht auf der Blockierung des Lichts aller Ebenen exklusive des von der Schärfenebene stammenden Anteils.

#### **2.2.1.11 Zellzyklusanalyse mittels Durchflusszytometrie (FACS)**

Fluorescence-activated cell sorting (FACS) ermöglicht die Quantifizierung von Zellen und die Analyse ihrer physikalischen Eigenschaften. Das Prinzip beruht auf dem Passieren von einzelnen Zellen des Messbereichs einer Laserlichtquelle und der Auswertung des dadurch entstehenden Streulichts. Die Intensität des sogenannten Vorwärtsstreulichts gibt Information über die Größe der untersuchten Zelle. Das Seitwärtsstreulicht ermöglicht eine Aussage über die Granularität der Zelle. Außerdem kann die Fluoreszenzstärke detektiert werden, wenn eine Fluoreszenzfärbung spezifischer Zellbestandteile vorgenommen wurde. Dies macht man sich bei der Analyse von Zellzyklusphasen zu Nutze, indem man die Nukleinsäuren mit dem Farbstoff Propidiumiodid anfärbt. Dieser interkaliert mit einem Farbstoffmolekül pro 4 bis 5 Basenpaaren, sodass von der Fluoreszenzintensität linear auf den Nukleinsäuregehalt der Zelle geschlossen werden kann. Wird im Vorfeld RNA enzymatisch entfernt, sodass nur der DNA-Gehalt analysiert wird, kann direkt auf die Zellzyklusverteilung der Zellen geschlossen werden.

Zur Untersuchung wurden etwa 500.000 Zellen in ihrer logarithmischen Wachstumsphase geerntet und samt Kulturmedium 5 Minuten bei 1000 rpm und 4°C abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde anschließend mit eiskaltem PBS gewaschen und unter gleichen Bedingungen zentrifugiert. Zur Fixierung der Zellen wurde das Pellet in 100 µl kaltem PBS resuspendiert und anschließend wurden 2 ml eiskalter 70%iger Ethanol hinzugefügt. Die Suspension wurde mindestens 15 Minuten bei -20°C inkubiert und anschließend 5 Minuten bei 1000 rpm und 4°C zentrifugiert. Das entstandene

Pellet wurde in 333  $\mu$ l PBS resuspendiert und mit 1  $\mu$ l RNase (10mg/ml) versetzt. Der RNA-Verdau erfolgte 1 Stunde bei Raumtemperatur. Anschließend wurden 164  $\mu$ l Propidiumiodid (50  $\mu$ g/ml) hinzugeben und die Zellen wurden bis zur Messung in einem FACS-Röhrchen auf Eis aufbewahrt. Die Messung erfolgte an einem BD FACSDiva Durchflusszytometer und wurde von Dr. Markus Eich (FACS Core Facility, Mainz) betreut. Die Analyse der Zellzyklusphasen wurde mit Hilfe der Software ModFIT LT 1.4 durchgeführt.

#### **2.2.1.12 Kolorimetrische Quantifizierung von $\beta$ -Hydroxybutyrat im Zellkulturüberstand**

Zur Quantifizierung von sezernierten Ketonkörpern im Zellkulturüberstand der Fibroblasten wurde das kommerziell erhältliche  $\beta$ -Hydroxybutyrate Assay Kit (Sigma-Aldrich) verwendet. Dieses basiert auf der kolorimetrischen Messung eines Produktes (450nm), welches durch enzymatische Reaktionen aus  $\beta$ -Hydroxybutyrat entsteht und sich mengenmäßig proportional dazu verhält.

In einer 24-well-Platte wurden jeweils 100.000 Zellen pro Vertiefung ausgesät und über Nacht kultiviert. Am nächsten Tag wurden die Zellen zwei Mal mit DPBS gewaschen und anschließend mit optiMEM + 2% FBS gefüttert. Nach einer Inkubation von 48 Stunden wurden die Überstände abgenommen, durch Zentrifugation von Zelldebris befreit und anschließend nach Anleitung des Herstellers dem kolorimetrischen  $\beta$ -Hydroxybutyrat-Assay zugeführt. Jede Probe wurde in 6 technischen Replikaten gemessen. Die Zellen wurden abgelöst, zwei Mal mit DPBS gewaschen und einer Proteinmengenbestimmung unterzogen, wie in 2.2.4.1 beschrieben.

### **2.2.2 Zytogenetische und molekularzytogenetische Methoden**

#### **2.2.2.1 Präparationen von Metaphasechromosomen von primären Fibroblastenkulturen**

Es wurden Fibroblastenkulturen einer 25  $\text{cm}^2$ -Zellkulturflasche für die Präparation verwendet, die eine Konfluenz von etwa 30% aufwiesen und sich somit in ihrer logarithmischen Wachstumsphase befanden. Im ersten Schritt wurde den Kulturen ein Derivat des Spindelgifts Colchicin (Colcemid) hinzugefügt, um den Spindelapparat der sich in der Mitose befindlichen Zellen zu depolymerisieren und somit die Trennung der Schwesterchromatiden zu verhindern. Es folgte eine Inkubation von 40 min bei 37°C und anschließend wurden die Zellen mittels Trypsinverdau abgelöst und 5 Minuten bei 1700 rpm abzentrifugiert. Das Pellet wurde langsam unter ständigem Schütteln in 0,4%

KCl resuspendiert und anschließend 25 min bei 37°C inkubiert, wodurch eine hypoosmotische Lyse der Zellen stattfand. Danach wurden die Zellen durch Zugabe von Fixativ (25% Eisessig/75% Methanol) fixiert und dreimal in Fixativ gewaschen. Im letzten Schritt wurde das Zellpellet in einem kleinen Volumen Fixativ aufgenommen und anschließend auf schrägstehende Objektträger aufgetropft. Die Spreitung und Dichte der Metaphasen wurde unter dem Phasenkontrastmikroskop überprüft und die Auftropfwinkel sowie die Verdünnung der Zellsuspension entsprechend angepasst. Anschließend wurden die Präparate in einer aufsteigenden Ethanolreihe (70% -> 90 % -> 100%) je 3 Minuten dehydriert.

#### **2.2.2.2 GTG-Bandenfärbung von Chromosomenpräparaten**

Zusätzlich zu der Beurteilung der Metaphasechromosomen bezüglich numerischer Aberrationen ermöglichen unterschiedliche Färbemethoden die eindeutige Zuordnung der 46 Chromosomen anhand ihrer spezifischen Bänderung sowie die Beurteilung struktureller Chromosomenaberrationen. Die GTG-Bänderung beruht auf einer Färbung der Chromosomen mit Giemsa im Anschluss an eine proteolytische Behandlung. Dunkel gefärbte Chromosomenbanden stellen GC-arme Chromosomenabschnitte dar, die in der Interphase transkriptionell inaktiv sind und deshalb stark kondensiert vorliegen (konstitutives Heterochromatin). Bereiche, die nach der GTG-Färbung hell erscheinen sind GC-reich, kodieren für stark transkribierte Gene (z.B. Haushaltsgene) und werden deshalb früh repliziert.

Die wie in 2.2.2.1 hergestellten Chromosomenpräparate wurden für die Färbung erst 2 Stunden bei 85 bis 90°C gealtert. Anschließend erfolgte eine proteolytische Behandlung für 15 bis 50 Sekunden in Trypsin-Lösung (2,5% Trypsin-Stammlsg. in physio. NaCl) mit anschließendem Waschen in physiologischer Kochsalzlösung. Danach wurden die Präparate für 6 bis 7 Minuten in der Chromosomen-Färbelösung gefärbt und anschließend mit destilliertem Wasser abgewaschen. Nach dem Trocknen und Eindecken der Präparate wurden diese an einem Licht-Mikroskop im Durchlichtmodus fotografiert und vollständig karyotypisiert.

#### **2.2.2.3 Genomische quantitative Real-time PCR**

Die quantitative Real-time-PCR ist eine Methode, die simultan zur Vervielfachung eines DNA-Abschnitts auf Basis der herkömmlichen Polymerase-Kettenreaktion (PCR) die Quantifizierung dieser Region in Echtzeit ermöglicht. Die Quantifizierung basiert auf dem Cyaninfarbstoff SYBR-Grün, der in doppelsträngige DNA interkaliert und in

Folge dieser Komplexbildung eine starke Fluoreszenzemission bei einer Wellenlänge von 521 nm zeigt. Die Fluoreszenzstärke korreliert dabei proportional mit der Amplifikation der DNA während der PCR-Zyklen und lässt somit auf die ursprüngliche Quantität der Zielsequenz schließen.

Wird genomische DNA mittels qPCR untersucht, so lässt sich durch Vergleich der sich ergebenden Daten für die Zielregion und für ein Referenzgen bekannter Kopienanzahl (z.B. *RFC3*) auf die Kopienanzahlen der zu analysierenden Region im Genom schließen. Auf diese Weise lassen sich zum Beispiel im SNP-Array detektierte Deletionen und Duplikationen validieren.

**Tab. 4 Primer für die genomische quantitative Real-time PCR**

Assay	Primersequenzen (F=Forward, R=Reverse)	Annealing -Temp.	Lokalisation gDNA	Quelle
RSPO3_E1	F: AGGAGAAAGGAAGGGAAGCA R: GTTTTGGCTGCCGATGTATT	60°C	Chr.6: 127,119,159- 127,119,261	selbst entworfen
RSPO3_5'up	F: CCTCCTCCTCCCCTATGTG R: GCAGGAGACGCTCCAGTG	60°C	Chr.6: 127,118,627- 127,118,687	selbst entworfen
NREP_E5	F: TGTCTGTGTGTTGGTCTGC R: TCTTGCGGTTCACTTCCTTT	60°C	Chr.5: 111,731,009- 111,731,076	selbst entworfen
NREP_I3	F: CTGCTGTCTGGTTGTGATGG R: CTTCCCGGACACACTGCT	60°C	Chr.5: 111,731,823- 111,731,888	selbst entworfen
RFC3	F: AGCATTGTCTTAGTCTGGAAC R: GGGTGAGAGCAAGGGAAC	60°C	Chr.13: 33,828,299- 33,828,499	Bachelorarbeit Miriam Grunow, 2010

Es wurden mit Hilfe des Programms Primer3 spezifische Primer entworfen sowie bekannte Primer für das Kontrollgen *RFC3* verwendet (Tab. 4). Jeder Ansatz wurde in Triplikaten bestimmt und nach folgendem Schema vorbereitet:

**Tab. 5 Ansatz genomische qPCR-Analyse**

Komponente	Quantität
Genomische DNA	25 ng
Primermix (Reverse und Forward, jeweils 10 µM)	1 µl
2xQuantiTect SYBR Master Mix	12,5 µl
Nuklease-freies Wasser	auf 25µl

Die Analyse erfolgte im ABI 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) nach folgendem Programm:

**Tab. 6 PCR-Programm für die genomische Real-time PCR**

Zyklen	Dauer	Temperatur	Prozess
1 x	15 min	95°C	Initiale Denaturierung
45 x	30 sec	95°C	Denaturierung
	30 sec	60°C	Annealing
	40 sec	72°C	Elongation

Die Messung der Fluoreszenzintensität erfolgte im Elongationsschritt bei 72°C. Zum Ausschluss von unspezifischen Signalen und Amplifikationsprodukten wurden Negativkontrollen mitgeführt sowie eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Die Qualität sowie Effizienz der Assays wurde mittels Standardkurven mit DNA-Verdünnungsreihen überprüft. Zur Bestimmung der Kopienanzahl der zu untersuchenden Zielgene wurden deren Ct-Werte auf die Werte des Referenzgens *RFC3* normalisiert. Diese Auswertung erfolgte mit der Software 7500 FAST System SDS v.2.0.5 (ABI).

### 2.2.3 Molekulargenetische Methoden

Konventionelle molekularbiologische Basismethoden wie Gelelektrophorese oder Polymeraseketten-Reaktion sind im Weiteren nicht im Detail beschrieben und wurden nach Standardprotokollen durchgeführt [259].



### 2.2.3.1 Extraktion genomischer DNA

Zur Extraktion genomischer DNA aus kultivierten Zellen wurde das Kit QIAamp® DNA Mini Kit (QIAGEN) nach Angaben des Herstellers verwendet. Die Konzentrationsmessung der extrahierten DNA wurde mit Hilfe des Spektralphotometer NanoDrop ND 2000 durchgeführt. Die Ausbeute einer typischen Extraktion aus  $1 \times 10^6$  Primärfibroblasten betrug etwa 30 µg genomischer DNA in einem Volumen von 60 µl AE-Puffer.

### 2.2.3.2 Bisulfit-Konvertierung genomischer DNA und Pyrosequenzierung

Eine Methylierungsanalyse mittels Pyrosequenzierung wird durch eine vorhergehende Behandlung der zu untersuchenden genomischen DNA mit Natriumhydrogensulfit ermöglicht. Hierbei werden unmethylierte Cytosine in einer Deaminierungsreaktion zu Uracil umgewandelt.

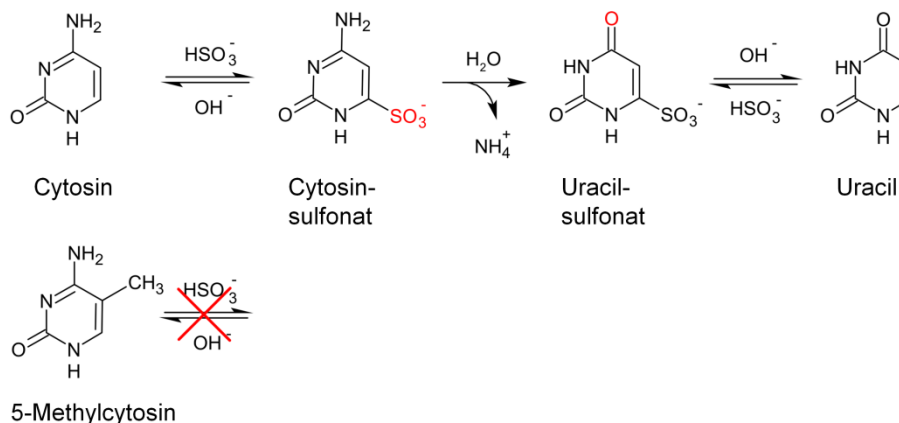


Abb. 9 Bisulfit-Konvertierung von nicht-methylierten Cytosinen zu Uracil.

In der darauf folgenden PCR werden diese Uracil-Basen als Thymin amplifiziert und bei der Pyrosequenzierung als solches erkannt. Methylierte Cytosine (5-Methyl-Cytosin) sind hingegen unempfindlich für die Bisulfit-Konvertierung, bleiben in ihrem ursprünglichen Zustand und werden in der Pyrosequenzierung als Cytosin detektiert. Der Vergleich der generierten Basenabfolge während der Pyrosequenzierung mit der bekannten genomischen Ausgangssequenz gibt Auskunft über den Methylierungsstatus einzelner Cytosine des zu untersuchenden DNA-Abschnitts.

Bisulfit-Pyrosequenzierung ist eine Echtzeit-Sequenziermethode zur hochauflösenden quantitativen Analyse des CpG-Methylierungsgrades eines gewünschten DNA-Abschnitts. Die Pyrosequenzierung beruht auf der Synthese eines Komplementärstrangs

durch das sequenzielle Hinzupipettieren einzelner Nukleotide. Wird das Nukleotid inkorporiert, so wird Pyrophosphat freigesetzt, das eine enzymatische Kaskade aktiviert, die zur Generierung eines detektierbaren Lichtblitzes führt. Da sich die Signalstärke direkt proportional zu der Menge an inkorporiertem Nukleotid verhält, wird eine genaue Quantifizierung ermöglicht. Vor jedem weiteren Zyklus werden überschüssige Nukleotide durch einen Apyrase-Verdau entfernt.

Jeweils 500 ng genomischer DNA der Fibroblasten wurden nach Herstellerangaben mit dem EZ DNA Methylation Direct Kit (Zymo Research) Bisulfit-konvertiert. Anschließend wurden die zu untersuchenden DNA-Abschnitte mittels PCR amplifiziert. Die Bisulfitsequenz-spezifischen Primer wurden aus einer relevanten Publikation [247] entnommen und sind in Tab. 7 aufgeführt.

**Tab. 7 Primersequenzen des Assays für die Bisulfit-Pyrosequenzierung von BRCA1**

Assay	Amplifikationsprimer (F=Forward, R=Reverse)	Sequenzierprimer	Lokal. gDNA
BRCA1_b	F: ATTTAGAGTAGAGGGTGAAGG R: TCTATCCCTCCCATCTCTAATT (biotinyliert)	TTGAGAAATTTTATAGTTTGTTTT	Chr. 17: 43,125,321- 43,125,506

Die Präparation und Aufreinigung der einzelsträngigen PCR-Produkte mit dem biotinylierten Primer erfolgt mit Hilfe von Streptavidin-Sepharose-Beads. Diese binden die biotinylierten Einzelstränge und isolieren sie mittels der Ansaugvorrichtung der Vacuum-Prep-Workstation (Qiagen) aus dem Reaktionsgemisch. Die Proben wurden nach einem Standardprotokoll denaturiert und gewaschen und zusammen mit dem Sequenzierprimer und Annealingpuffer in die Sequenzierplatte gegeben. Es folgte ein Denaturierungsschritt für 2 Minuten bei 80°C. Die Kartusche aus der die sequenzielle Pipettierung der Reagenzien durch Überdruck in die Sequenzierplatte erfolgte, wurde mit den Nukleotiden, sowie mit Substrat und Enzym gefüllt. Nach dem Einbringen der Kartusche und der Platte in den Pyrosequenzierer sowie Eingabe der zu analysierenden Sequenz wurde der Lauf prozessiert und anschließend mit Hilfe der Software Pyro Q-CpG (Qiagen) ausgewertet.

### 2.2.3.3 Extraktion totaler RNA

Die Gesamt-RNA aus kultivierten Zellen wurde mittels der Einzelschrittmethode nach Chomczynski und Sacchi [260] unter Verwendung des Reagenz TRIzol (Invitrogen) vorgenommen. Dazu wurden  $10^6$  Zellen mit 1 ml TRIzol-Reagenz versetzt und 5 min bei RT unter gelegentlichem Vortexen inkubiert, sodass eine Zellyse stattfand. Anschließend erhielt man durch Zugabe von 200  $\mu$ l Chloroform und kräftigem Schütteln ein Zweiphasengemisch, welches 2 min bei RT inkubiert wurde. Zur Trennung der Phasen wurde das Gemisch 15 min bei 12.000 g bei 4°C zentrifugiert. Anschließend wurde die obere, wässrige Phase abgenommen, da diese die RNA enthielt. Die DNA-enhaltende Interphase und die Protein-haltige untere Chloroform-Phase wurden verworfen. Die wässrige Phase wurde zur Fällung der RNA mit 500  $\mu$ l Isopropanol versetzt, 10 min bei RT inkubiert und anschließend 5 min bei 12.000 g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das RNA-Pellet zweifach in jeweils 1 ml 70%igem Ethanol gewaschen, wobei die Zentrifugation 5 min bei 12000 g und 4°C erfolgte. Das RNA-Pellet wurde bei RT getrocknet, bis es glänzend erschien, und anschließend in 50  $\mu$ l RNase-freiem Wasser resuspendiert. Die RNA wurde stets auf Eis hantiert sowie bei -80°C gelagert. Die Konzentrationsmessung der extrahierten RNA wurde mit Hilfe des Spektralphotometer NanoDrop ND 2000 durchgeführt. Die Ausbeute einer typischen Extraktion aus  $1 \times 10^6$  Primärfibroblasten betrug etwa 25  $\mu$ g totaler RNA in einem Volumen von 30  $\mu$ l RNAase-freiem H<sub>2</sub>O. Die Qualität und Integrität der isolierten RNA wurden mit Hilfe elektrophoretischer Auftrennung auf einem 1%igen Agarosegel mit Ethidium-Bromid (EtBr) beurteilt. Idealerweise sind 28S-rRNA (28S-ribosomale Ribonukleinsäure) sowie 18S-rRNA als zwei distinkte Banden zu erkennen, wobei das Intensitätsverhältnis von 28S-rRNA zu 18S-rRNA 2:1 betragen sollte. Degradierete RNA erscheint auf dem Gel als Schmier.

### 2.2.3.4 cDNA-Synthese für die RT-qPCR

Die reverse Transkription von RNA wurde mittels SuperScript III First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen) durchgeführt. Es wurde jeweils 1  $\mu$ g totaler RNA eingesetzt und nach Herstellerangaben (siehe Tab. 8) zu einem Annealing-Ansatz kombiniert.

*Tab. 8 Pipettierschema für den Annealing-Ansatz der Reversen Transkription*

<b>Komponente</b>	<b>Quantität</b>
totale RNA	1 µg
50µM Oligo(dT)30	1 µl
50 ng/µl random hexamers	1 µl
10mM dNTPs	1 µl
RNase-freies H <sub>2</sub> O	auf 10 µl auffüllen

Zur Denaturierung wurde der Ansatz im PCR-Thermozykler 5 min bei 65°C und anschließend mindestens 1 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden 10 µl des Reaktions-Mixes zugegeben, bestehend aus den folgenden Komponenten:

*Tab. 9 Pipettierschema für den Reaktions-Mix der Reversen Transkription*

<b>Komponente</b>	<b>Quantität</b>
10x RT Puffer	2 µl
25 mM MgCl <sub>2</sub>	4 µl
0,1 M DTT	2 µl
RNaseOUT (40U/µl)	1 µl
SuperScript III RT (200 U/µl)	1 µl

Die Synthese fand im Thermozykler statt und bestand aus einer 10-minütigen Inkubation bei 25°C gefolgt von einer Inkubation für 50 min bei 50°C. Anschließend wurde das Enzym bei 85°C für 5 min deaktiviert und die Reaktion somit terminiert. Nach Abkühlung des Ansatzes auf Eis wurde die RNA enzymatisch durch Zugabe von 1 µl RNase H und 20 min Inkubation bei 37°C entfernt. Die synthetisierte cDNA wurde bei -20°C gelagert.

### 2.2.3.5 Genexpressionsanalyse mittels quantitativer Real-time Reverse-Transkription PCR (RT-qPCR)

Die Genexpressionsanalyse mittels RT-qPCR beruht auf derselben Methodik wie die genomische Real-time qPCR (in 2.2.2.3 beschrieben). Der Unterschied besteht in der Verwendung von durch reverse Transkription generierter cDNA als Untersuchungsmaterial im Gegensatz zu genomischer DNA. Durch Quantifizierung der cDNA können Rückschlüsse auf die Menge der in der Zelle vorhandenen mRNA des Zielgens und somit seine Expressionsaktivität geschlossen werden. Zu diesem Zweck werden Haushaltsgene als Normalisierungsgrundlage verwendet, da diese kontinuierlich stabil exprimiert werden. Diese Methode wurde in dieser Arbeit unter anderem verwendet, um die Ergebnisse von Expressionsarrays zu validieren.

Es wurden mit Hilfe des Programms Primer3 spezifische Primer (Tab. 10) auf Basis der cDNA-Sequenz entworfen sowie bekannte Primer für die Haushaltsgene *TBP* und *GAPDH* verwendet.

**Tab. 10 Primer für die Reverse Transkription quantitative Real-time PCR**

Zielgen	Forward Primer	Reverse Primer
<i>ACTA2</i>	ATCACCAACTGGGACGACAT	AGGGTGGGATGCTCTTCAG
<i>BRCA1</i>	AGAAAGGGCCTTCACAGTGT	CCAAACCTGTGTCAAGCTGA
<i>CAV1</i>	GCGACCCTAAACACCTCAAC	TGCCGTCAAAACTGTGTGTC
<i>COL11A1</i>	TGAAGACCACACTGGAAAACC	TTTCTTCTCCACGCTGATTG
<i>COL8A1</i>	TGGCAAAGAGTATCCACACCT	TTGTTCCCTCGTAAACTGG
<i>CXCL12</i>	AGAGCCAACGTCAAGCATCT	CTTTAGCTTCGGGTCAATGC
<i>FAP</i>	ACCATGAAAAGTGTGAATGCTTC	GTTGCTGTGTAAGAGTATCTCCA
<i>FN1</i>	TACCAAGGCTGGATGATGGT	TTGTGTCTGATCGTTGCAT
<i>HOXC6</i>	CCAGGACCAGAAAGCCAGTA	GGTCTGGTACCGCGAGTAGA
<i>HOXC8</i>	CGAAAACGTCGGATTGAAGT	CTTCATCCTTCGGTTCTGGA
<i>IL6</i>	AAAGAGGCACTGGCAGAAAA	TGATTTTCACCAGGCAAGTC
<i>IL8</i>	TCCAAACCTTTCCACCCCAA	CCAGTTTTCTTGGGGTCCA
<i>KRT19</i>	GTGAAGATCCGCGACTGGTA	TCCTGGAGTTCTCAATGGTG
<i>MGP</i>	TCACATGAAAGCATGGAATCTT	CCATCTCTGCTGAGGGGATA
<i>PDPN</i>	GCCGAAGATGATGTGGTGAC	CGTGGACTGTGCTTTCTGAA
<i>TBX1</i>	AGATACCAGCCCCGCTTC	CGTGTCTCCTCGAACACAAA
<i>TGFB1</i>	CATGAACCGGCCTTTCCCTG	CAGCAGTTCTTCTCCGTGGA
<i>TNC</i>	CCCCAGTGA CTGCAACAAC	CCGTCACTTCTGTCAACAACG
<i>WIF1</i>	TGTTTCAGAGGGGAAAATGG	TGCAGCTTGCCAGGTA AAAAT
<i>WISP1</i>	AGCACACGCTCCTATCAACC	CCATCAGGACACTGGAAGGA

Je nach Möglichkeit wurden die Primerpaare exonspannend entworfen, um eine Amplifikation von potenziell kontaminierendem genomischem Material zu verhindern bzw. dieses in der Schmelzkurvenanalyse zu detektieren.

Jeder Ansatz wurde in Triplikaten bestimmt und nach folgendem Schema vorbereitet:

**Tab. 11 Pipettierschema für die RT qPCR-Analyse**

Komponente	Quantität
cDNA-Template	12,5 ng
Primermix (Reverse und Forward, jeweils 3 $\mu$ M)	1,25 $\mu$ l
2xQuantiTect SYBR Master Mix	6,25 $\mu$ l
Nuklease-freies Wasser	auf 12,5 $\mu$ l

Die Analyse erfolgte im StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems) nach folgendem Programm:

**Tab. 12 PCR-Programm für die RT Real-time PCR**

Zyklen	Dauer	Temperatur	Prozess
1 x	15 min	95°C	Initiale Denaturierung
45 x	30 sec	95°C	Denaturierung
	30 sec	60°C	Annealing
	40 sec	72°C	Elongation

Die Messung der Fluoreszenzintensität erfolgte im Elongationsschritt bei 72°C. Zum Ausschluss von unspezifischen Signalen und Amplifikationsprodukten wurden Negativkontrollen (H<sub>2</sub>O sowie Kontrolle ohne Reverse Transkriptase) mitgeführt, sowie Schmelzkurvenanalysen durchgeführt. Es gab zu keiner Zeit einen Hinweis auf eine genomische Kontamination der cDNA-Proben sowie unspezifische Amplifikationen. Die Qualität sowie Effizienz der Assays wurde mittels Standardkurven mit cDNA-Verdünnungsreihen überprüft. Zur relativen Quantifizierung der zu untersuchenden

Zielgene wurden deren Ct-Werte mittels  $\Delta\Delta$ Ct-Methode auf die Werte der Haushaltsgene normalisiert.

### 2.2.3.6 Genexpressionsanalyse mittels Expressionsarrays

Eine Anwendungsmöglichkeit von DNA-Arrays ist die simultane Analyse der Expression tausender mRNA-Transkripte zur Erstellung sogenannter Expressionsprofile.

Die Expressionsanalysen der Ausgangskulturen FIB A24 ( $BRCA1^{mosMe}$ ) bzw. FIB D24 ( $BRCA1^{wt}$ ) wurden von Benjamin Irmscher vorbereitet und in Zusammenarbeit mit der Firma Affymetrix realisiert. Die Hybridisierung erfolgte auf einem Affymetrix Human Genome U219 Array, der einen 3'IVT-Array darstellt. Dieser Chip enthält über 53.0000 unterschiedliche Sonden und deckt damit über 36.000 Transkripte von mehr als 20.000 Genen ab.

Die Expressionsanalysen der Einzelzellklone wurden auf den institutseigenen Geräten unter Verwendung des Chips Affymetrix HuGene 2.0 ST durchgeführt. Dies ist ein sogenannter Whole-Transcript-Gene-Array (WT) und unterscheidet sich von dem oben genannten Chip hauptsächlich durch die Designstrategie der Oligonukleotide. So decken die Sonden des WT-Arrays die Enden jedes Exons ab und akkumulieren nicht nur in der 3'-Region des Transkriptes, wie es bei den 3'IVT-Arrays (z.B. U219) der Fall ist. Der HuGene 2.0 ST enthält über 1,35 Millionen unterschiedliche Sonden, die 40.000 Transkripte von 24.000 Genen abdecken sowie 11.000 long noncoding RNAs (lncRNA).

Die Präparation der Proben für die Hybridisierung auf den HuGene-Chip beginnt mit 100 bis 200 ng DNase-behandelter RNA, deren Qualität und Integrität sowohl photometrisch als auch per Gelkontrolle gesichert wurde. Zuerst wird in einer reversen Transkription unter Verwendung von random Primern die RNA in doppelsträngige cDNA umgeschrieben. Gleichzeitig wird eine Promoter-Region für die T7 RNA-Polymerase inseriert. Anschließend wird eine *in vitro* Transkriptions-Reaktion durchgeführt, in der antisense-RNA synthetisiert wird. Diese dient wiederum als Template für die Synthese von sense-strand-cDNA, die unter Inkorporation von dUTPs stattfindet. Nach der Aufreinigung der cDNA wird diese fragmentiert. Dies geschieht durch das enzymatische Entfernen der Uracil-Basen durch das Enzym UDG (Uracil-DNA-Glykosylase) und durch Einführen eines Einzelstrangbruchs an derselben Stelle durch APE1 (Apurin/Apyrimidin-Endonuklease). Anschließend werden die Fragmente mit Biotin markiert und für 16 Stunden bei 55°C unter Rotation im Ofen auf den Chip hybridisiert. Nun wird ein Streptavidin/Phycoerythrin-Konjugat auf den Chip

aufgebracht, das an die Biotin-markierten hybridisierten Fragmente bindet. Zur Signalamplifikation wird anschließend ein biotinylierter anti-Phycoerythrin-Antikörper hinzugegeben sowie anschließend erneut ein Streptavidin/Phycoerythrin-Konjugat. Phycoerythrin absorbiert Laserlicht von einer Wellenlänge von 488 nm und emittiert Photonen bei 575 nm. Das emittierte Signal des Phycoerythrins kann anschließend mittels eines Affymetrix GeneChip Scanners 3000 aufgenommen werden.

Die Normalisierung und Hintergrundbereinigung der Daten beider Chipsorten erfolgte mittels der Software Affymetrix Expression Console. Für die Normalisierung wurde der RMA-Algorithmus verwendet. Die Analyse zur Identifizierung von differenziell exprimierten Genen erfolgte mit Hilfe der Software Affymetrix Transcriptome Analysis Suite unter Anwendung des ANOVA-Algorithmus.

## **2.2.4 Proteinbiochemische Methoden**

### **2.2.4.1 Proteinextraktion aus eukaryotischen Zellen**

Zur totalen Extraktion von Proteinen aus primären Fibroblasten wurden jeweils  $1 \times 10^6$  Zellen eingesetzt. Das zuvor dreifach mit PBS gewaschene Zellpellet wurde in 100  $\mu$ l Magic Mix aufgenommen und 10 min bei Raumtemperatur und danach 20 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die viskose Zellsuspension auf eine QIAshredder-Säule (Qiagen) aufgetragen und eine Minute bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. In diesem Schritt wurde die genomische DNA gesichert sowie Zelltrümmer abgetrennt, sodass ein klares Proteinlysate entstand. Die langfristige Lagerung der Lysate erfolgte bei  $-80^{\circ}\text{C}$ . Die Bestimmung der Proteinkonzentrationen wurde mit dem Qubit Protein Assay Kit (Thermo Scientific) nach Anweisungen des Herstellers durchgeführt. Typischerweise betrug die Ausbeute je Ansatz ca. 600  $\mu$ g Totalprotein in einem Endvolumen von 80  $\mu$ l.

### **2.2.4.2 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Bei der SDS-PAGE handelt es sich um die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen entsprechend ihres Molekulargewichts. Dafür werden die Proteine durch Hitze und Detergenzbehandlung mit SDS denaturiert, sowie mit DTT dissoziiert. Es entstehen SDS-Protein-Komplexe, deren negative Ladung sich proportional zu ihrer Masse verhält und die vergleichbare hydrodynamische Eigenschaften besitzen. Die Auftrennung der Proteine erfolgt in einem Gel definierter Porengröße, das durch radikalische Polymerisation von Acrylamid und Bisacrylamid hergestellt wird. Für Gele, die anschließend zur Detektion des BRCA1-Proteins geblottet werden sollten,



wurde im Rahmen dieser Arbeit 6%iges Polyacrylamid verwendet. Zum Zwecke der anschließenden Detektion von ACTIN wurden 10%ige Gele benutzt. Vor dem Auftragen der Proben auf das Gel wurden diese mit Magic Mix auf die gewünschte Proteinkonzentration eingestellt und 5 min bei 95°C denaturiert. Der Gellauf erfolgte bei 200 V für 45 min (ACTIN) bzw. 90 min (BRCA1).

### 2.2.4.3 Western Blot

In dem Western Blot-Verfahren werden die auf SDS-PAGE-Gelen aufgetrennten Proteine durch ein rechtwinklig angelegtes elektrisches Feld auf eine Polyvinylidenfluorid-Membran transferiert und via hydrophober Wechselwirkungen immobilisiert. In dieser Arbeit wurden Trans-Blot Turbo transfer packs (Biorad) samt vorgeschchnittener und getränkter Membranen und Filterpapiere nach Herstellerangaben verwendet. Die Übertragung der Proteine erfolgte im Trans-Blot Turbo Transfer System (Biorad) unter folgenden Bedingungen: 1,3 A konstant, bis zu 25 V, 15 min.

### 2.2.4.4 Immundetektion von Proteinen

Nach dem Proteintransfer per Western Blot wurden die PVDF-Membranen für 1 Stunde bei Raumtemperatur in WB-Blockpuffer inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem zielproteinspezifischen Primärantikörper (Tab. 13) bei 4°C über Nacht unter leichtem Schütteln. Die Membran wurde dreimal 5 min in PBST gewaschen und anschließend 1 Stunde mit dem HRP-gekoppelten Sekundärantikörper inkubiert.

*Tab. 13 Im Western Blot verwendete Antikörper und Verdünnungen*

Antikörper	Verdünnung (in 5% Magermilch in PBST)	Hersteller
Maus Anti-Human BRCA1 (Ab-1, MS110)	1:50	EMD Millipore
Kaninchen Anti-Human Actin	1:500	Sigma-Aldrich
Ziege Anti-Maus HRPO	1:6000	Dianova
Ziege Anti-Kaninchen HRPO	1:6000	Dianova

Es folgte erneut dreimaliges Waschen in PBST. Zur Detektion wurde die Membran auf einer transparenten Folie platziert und mit 1 ml ECL-Reaktionslösung (Western

Lightning Chemiluminescence Reagent von Perkin Elmer) benetzt, die zuvor durch Mischen von Substrat- und Enzymlösung vorbereitet worden war. Das Signal auf der Membran wurde mit Hilfe des digitalen Systems Chemidoc XRS Molecular Imagers aufgenommen, wobei die geeignete Expositionszeit empirisch ermittelt wurde. Die densitometrische Analyse der Banden erfolgte mit der Software ChemiDoc Image Lab (Biorad).

# 3 Ergebnisse

## 3.1 Darstellungen projektrelevanter Ergebnisse aus anderen Arbeiten

Die in dieser Arbeit beschriebenen Untersuchungen zum Zwillingsvergleich der krebdkordanten Individuen A24 und D24 basieren teilweise auf Daten, die bereits in anderen Arbeiten zuvor generiert worden waren [261, 262], sowie bereits publiziert worden sind [247]. Die genannten Arbeiten beschäftigten sich vorrangig mit der detaillierten Fallpräsentation, sowie einer ersten molekulargenetischen Analyse der A24/D24-Fibroblasten, die als Basis zur Erstellung der Arbeitshypothese für diese Arbeit diente. Um eine bessere Verständlichkeit des Ergebnisteils der vorliegenden Arbeit zu erreichen, werden die zuvor generierten und publizierten Daten im Folgenden kurz beschrieben.

Das monozygote Zwillingpaar wurde eingehend körperlich untersucht und wies primär eine diskordante Krebsanamnese auf (klinische Details siehe Kapitel 2.1.7). Auf Grund der nahezu übereinstimmenden genetischen Information in monozygoten Zwillingen sind epigenetische Unterschiede eine mögliche Erklärung für eine diskordante Krebsdisposition. Aus diesem Grund wurden die Methylierungsmuster einiger Tumorsuppressorgene (*ATM*, *BRCA1*, *BRCA2*, *MLH1*, *RAD51C*, *TP53*) in unterschiedlichem biologischem Material des Zwillingspaars mittels Bisulfit-Pyrosequenzierung untersucht. Es zeigte sich eine konstitutiv erhöhte Methylierung des *BRCA1*-Promoters in A24-Fibroblasten (12%) im Gegensatz zu D24-Fibroblasten (3%). Dieser Befund konnte ebenfalls in den Salivaproben der Zwillinge detektiert werden (A24: 9% vs D24: 2%). Eine weiterführende Analyse des *BRCA1*-Promoters mittels klassischer Bisulfit-Plasmid-Sequenzierung bestätigte die *BRCA1*-Hypermethylierung in 13% der Allele in genomischer DNA der A24-Fibroblasten (Abb. 10). Dies spricht für das Vorliegen einer heterozygoten *BRCA1*-Epimutation im Mosaik in etwa 25% der A24-Fibroblasten.

Diese Auffälligkeit blieb stabil erhalten über eine Vielzahl von Zellkultur-Passagen sowie bei Bestrahlung mit  $\gamma$ -Strahlung (1Gy). Da die gefundene Epimutation im *BRCA1*-Promoter vermutlich zur Inaktivierung einer Kopie des Tumorsuppressors führt, stellt sie einen ersten Treffer im Sinne der Knudson-2-Treffer-Hypothese dar und kommt als potenzieller Auslöser für den diskordanten Krebsphänotyp des Zwillingspaars in Frage.

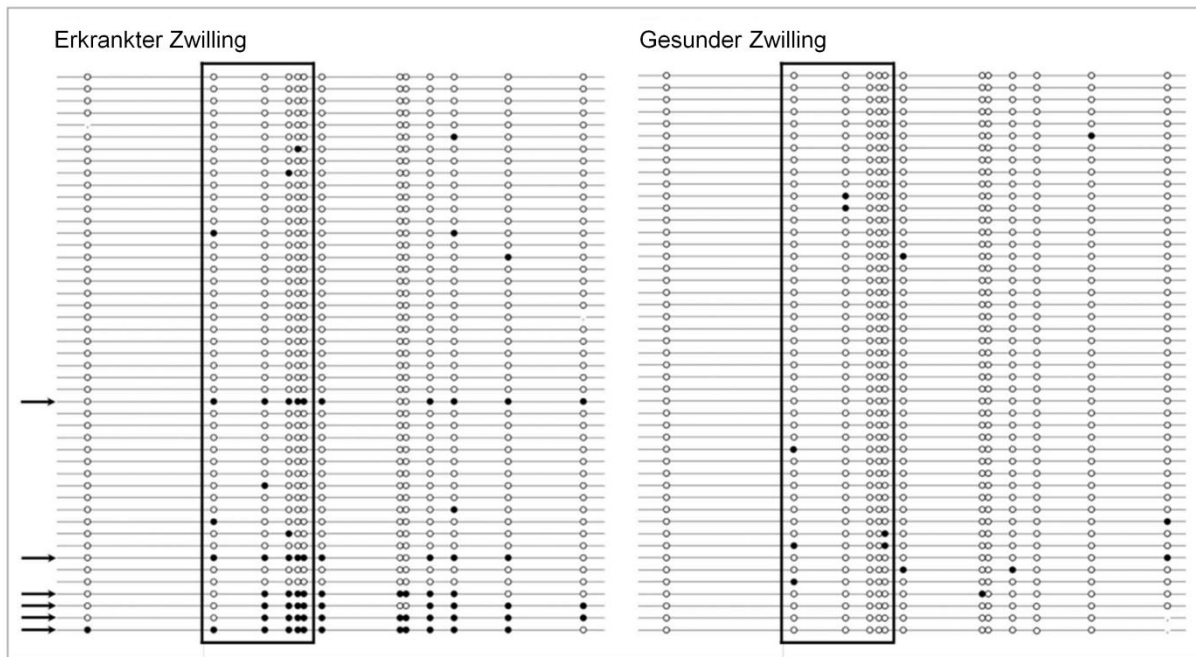


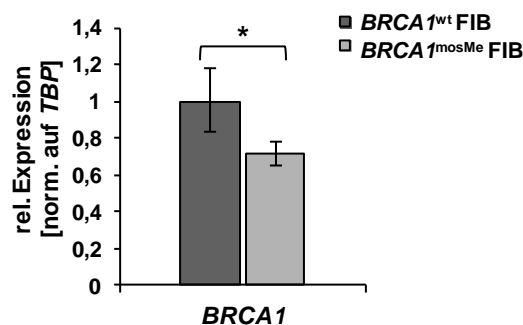
Abb. 10 Methylierungsmuster des *BRCA1*-Promoters in genomischer DNA aus A24-Fibroblasten (links) und D24-Fibroblasten (rechts). Jede Linie steht für ein mit klassischer Bisulfit-Plasmid-Sequenzierung analysiertes Allel (DNA-Molekül). Leere Symbole zeigen unmethylierte, gefüllte Symbole methylierte CpGs an. Es wurden 13 CpGs analysiert, davon 3 in Exon 1 und 10 in der 5'upstream Region. Epimutationen (im Gegensatz zu stochastischen Methylierungsfehlern) sind mit einem Pfeil markiert und treten in 6 von 47 analysierten Allelen von A24 auf. Originalabbildung aus der Publikation Galetzka et al. (2012) [247].

Es wurden zusätzlich genomische SNP-Array-Analysen durchgeführt und heterozygote Mosaik-Deletionen im Locus 5q22.1 (*NREP*) sowie in 6q22.33 (*RSPO3*) festgestellt. Obwohl eine Haploinsuffizienz der Gene *NREP* sowie *RSPO3* die Krebsentstehung fördern könnte, ist nach heutigem Kenntnisstand ein Zusammenhang bezüglich der diskordanten Krebsdisposition unwahrscheinlich.

Auf Grund der Epimutation im Mosaik werden die A24-Fibroblasten im Weiteren als *BRCA1*<sup>mosMe</sup> Fibroblasten sowie die D24-Fibroblasten als *BRCA1*<sup>wt</sup> Fibroblasten bezeichnet

### 3.2 Vergleich der *BRCA1*-Expression in *BRCA1*<sup>mosMe</sup> und *BRCA1*<sup>wt</sup> Fibroblasten auf mRNA und Protein-Ebene

Diese Arbeit umfasst die Charakterisierung der molekular- und zellbiologischen Konsequenzen einer epigenetisch modulierten *BRCA1*-Haploinsuffizienz in dermalen Fibroblasten, entnommen aus gesunder Haut des beschriebenen Zwillingspaars. Ziel dieses Vorhabens war es, einen möglichen kausalen Zusammenhang zwischen der *BRCA1*-Epimutation und der diskordanten Krebsdisposition des Zwillingspaars durch experimentelle Daten zu untermauern. Dabei ist eine Grundvoraussetzung für die Belastbarkeit der Hypothese, dass als Folge der Epimutation tatsächlich eine erniedrigte *BRCA1*-Expression in den *BRCA1*<sup>mosMe</sup> Fibroblasten nachweisbar sein sollte. Aus diesem Grund wurde zur initialen Charakterisierung des Untersuchungsmaterials und zum Nachweis der *BRCA1*-Haploinsuffizienz die *BRCA1*-Expression auf mRNA und Proteinebene untersucht und mit den isogenen Kontrollfibroblasten *BRCA1*<sup>wt</sup> verglichen. Die konstitutive *BRCA1*-mRNA-Expression wurde mittels RTq-PCR analysiert und auf die Expression des Referenzgens *TBP* normalisiert. Die PCR-Effizienzen wurde mit Hilfe der Software „LineRegPCR“ berechnet und wurden in der Auswertung berücksichtigt. Die *BRCA1*<sup>mosMe</sup> Fibroblasten zeigten eine 29% niedrigere relative Expression der *BRCA1*-mRNA verglichen mit den Kontrollfibroblasten *BRCA1*<sup>wt</sup> (Abb. 11).

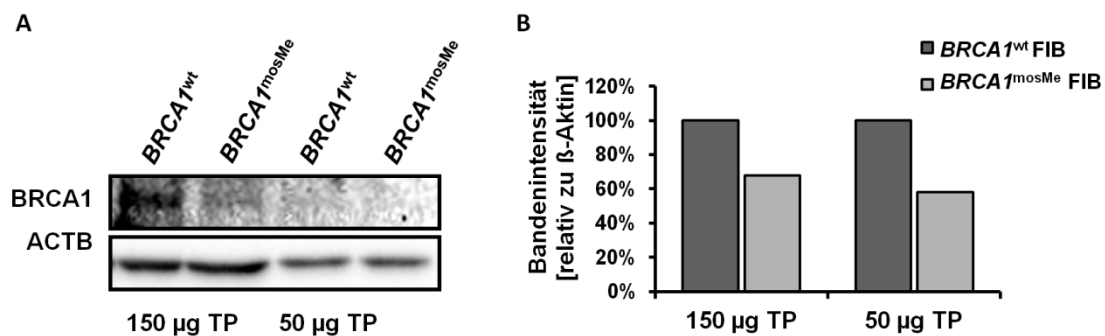


**Abb. 11** Relative *BRCA1*-mRNA-Expression *BRCA1*<sup>mosMe</sup> vs. *BRCA1*<sup>wt</sup> Fibroblasten analysiert mittels RTq-PCR. Die relative Expression wurde berechnet als  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ , normalisiert auf das Referenzgen *TBP* und die Referenzprobe *BRCA1*<sup>wt</sup> und ist dargestellt als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler des Mittelwerts (SEM). Die Anzahl der gemessenen Replikate beläuft sich für die *BRCA1*-Messung auf  $n=3$  und für die *TBP*-Messung auf  $n=5$ ;  $p=0,017$ .

Dieser Unterschied erwies sich laut Student-t-Test als statistisch signifikant ( $p=0,017$ ). Da die *BRCA1*<sup>mosMe</sup> Fibroblasten die Epimutation in einem etwa 25%igen Mosaik tragen, ist der Expressionsunterschied von etwa einem Viertel in dem zu erwartenden

Bereich und spricht für eine komplette transkriptionelle Stilllegung des methylierten Allels.

Die Immunodetektion des BRCA1-Proteins in Zellysaten aus Primärzellen ist bekanntermaßen schwierig [62, 263]. Hauptgrund dafür ist die niedrige Expressionsmenge des Proteins in Primärzellen. Das hohe Molekulargewicht von 220 kDa erschwert zusätzlich das Blotten des Proteins vom SDS-Gel auf die PVDF-Membran und erniedrigt somit die detektierbare Proteinmenge noch weiter. Trotz dieser Schwierigkeiten konnte ein Protokoll etabliert werden, das die erfolgreiche Detektion des BRCA1-Proteins in den Proteinextrakten der *BRCA1*<sup>mosMe</sup> und *BRCA1*<sup>wt</sup> Fibroblasten ermöglichte. Die Banden wurden densitometrisch quantifiziert und mit den Intensitäten der Banden des Referenzproteins ACTB verrechnet. Unabhängig von der Menge des eingesetzten Totalproteins wurde in den Proteinextrakten der *BRCA1*<sup>mosMe</sup> Fibroblasten verglichen mit denen der *BRCA1*<sup>wt</sup> Fibroblasten eine deutlich geringere basale BRCA1-Proteinmenge detektiert (Abb. 12A).



**Abb. 12 Basale BRCA1-Proteinexpression in totalen Proteinextrakten (TP) von *BRCA1*<sup>mosMe</sup> vs. *BRCA1*<sup>wt</sup> Fibroblasten analysiert mittels Western-Blot.** Die Detektion erfolgte mit dem monoklonalen Primärantikörper Anti-BRCA1 (MS110, von Millipore). ACTB wurde als Referenzprotein und Ladekontrolle detektiert. Die Quantifizierung der Bande wurde mit Hilfe der Software ChemiDoc Image Lab (Biorad) vorgenommen.

Die Expressionsunterschiede beliefen sich auf 32% (150µg TP) bzw. 42% (50µg TP) (Abb. 12B), und waren somit in etwa mit den Erwartungen, basierend auf den *BRCA1*-mRNA-Expressionsunterschieden, vereinbar. Da nur sehr geringe Proteinmengen zur Verfügung standen, konnten nicht ausreichend viele Replikate analysiert werden, um eine statistische Auswertung zu ermöglichen.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass sich die Mosaik-*BRCA1*-Epimutation in den *BRCA1*<sup>mosMe</sup> Fibroblasten in einer Runterregulation der Expression sowohl auf

mRNA- als auch auf Proteinebene niederschlägt und somit potenziell zu Veränderungen von Krebs-relevanten Prozessen in der Zelle führen kann.

### **3.3 Komparative Transkriptomanalyse der *BRCA1*<sup>mosMe</sup> vs. *BRCA1*<sup>wt</sup> Fibroblasten**

#### **3.3.1 Identifizierung von differenziell exprimierten Genen**

Zur Identifizierung von deregulierten potenziell Krebs-relevanten Signalwegen und molekularen Prozessen in den *BRCA1*<sup>mosMe</sup> Fibroblasten im Vergleich mit der isogenen Kontrolle *BRCA1*<sup>wt</sup> wurden komparative genomweite Expressionsanalysen durchgeführt. Um Kultivierungsartefakte auszuschließen, wurden jeweils vier unabhängig kultivierte Fibroblastenproben pro Individuum untersucht.

Die Analyse wurde in Kooperation mit der Firma Affymetrix unter Verwendung von Affymetrix Human Genome U219 Arrays durchgeführt. Zur Normalisierung der Rohdaten wurde das Programm Affymetrix „Expression Console“ unter Anwendung des Robust Multi-Array Average Algorithmus (RMA) verwendet. Die Analyse erfolgte, nicht direkt auf Genebene, sondern wie für 3'IVT-Arrays (3' „*In vitro* transcription“-Arrays) üblich auf Ebene der sogenannten „Probe Sets“, einer Gruppierung von unterschiedlichen Sonden, die spezifisch eine gemeinsame Zielsequenz binden.

Über eine anschließende Varianzanalyse („analysis of variance“, ANOVA) konnten Probe Sets isoliert werden, die zwischen *BRCA1*<sup>wt</sup> und *BRCA1*<sup>mosMe</sup> Fibroblasten differenziell exprimiert waren. Auf Grund des Mosaikstatus der *BRCA1*<sup>mosMe</sup> Fibroblasten wurden moderate Signifikanzkriterien für die differenziell exprimierten Gene (DEGs) definiert. Dabei wurden Probe Sets mit einer mindestens 1,5-fachen Hoch-oder Runterregulation und einem p-Wert kleiner als 0,05 als signifikant differenziell exprimiert beurteilt.

Die ANOVA-Analyse identifizierte 376 Probe Sets, die 285 unterschiedliche differenziell exprimierte Gene repräsentierten. Bezogen auf die Gesamtmenge der mit dem U219-Array untersuchten Gene waren somit 0,014% der Gene als zwischen *BRCA1*<sup>mosMe</sup> und *BRCA1*<sup>wt</sup> Fibroblasten differenziell exprimiert anzusehen. Dabei waren 133 Probe Sets (91 Gene) in *BRCA1*<sup>mosMe</sup> Fibroblasten im Vergleich zu *BRCA1*<sup>wt</sup> Fibroblasten signifikant hochreguliert, sowie 243 Probe Sets (194 Gene) runterreguliert. Die 100 am stärksten regulierten Gene sind in den Tabellen Tab. 14 und Tab. 15 darstellt.

**Tab. 14 Top 100 der in  $BRCA1^{mosMe}$  im Vergleich zu  $BRCA1^{wt}$  Fibroblasten stärker exprimierten Probe Sets. FC steht für den Expressionsunterschied („fold change“).**

Probe Set	FC	p-Wert	Gen	Probe Set	FC	p-Wert	Gen
11725765_a_at	35,45	0,0020	<i>COL11A1</i>	11756509_a_at	2,05	0,0487	<i>BAMBI</i>
11725766_x_at	24,98	0,0036	<i>COL11A1</i>	11722199_at	2,03	0,0128	<i>ADAM12</i>
11733707_x_at	21,68	0,0020	<i>COL11A1</i>	11759440_at	2,03	0,0254	<i>GLS</i>
11751904_x_at	14,40	0,0026	<i>COL11A1</i>	11720489_a_at	2,02	0,0250	<i>ACTC1</i>
11733706_s_at	8,50	0,0035	<i>COL11A1</i>	11755071_a_at	2,00	0,0073	<i>HMCN1</i>
11764247_s_at	5,09	0,0076	<i>WISP1</i>	11719218_at	1,97	0,0474	<i>SOCS3</i>
11746463_a_at	4,73	0,0222	<i>IL6</i>	11718832_a_at	1,96	0,0270	<i>LOXL2</i>
11720606_a_at	4,48	0,0385	<i>SFRP2</i>	11720527_at	1,93	0,0040	<i>LTBP2</i>
11731822_at	4,42	0,0133	<i>WISP1</i>	11727164_at	1,92	0,0203	<i>ACVR2A</i>
11744219_at	4,36	0,0373	<i>GOS2</i>	11735346_s_at	1,92	0,0227	<i>C1QTNF5</i>
11741116_at	4,02	0,0345	<i>FLG</i>	11739976_a_at	1,92	0,0491	<i>ITGA11</i>
11730801_at	3,94	0,0232	<i>CXCL6</i>	11715351_at	1,90	0,0182	<i>COL1A1</i>
11718876_at	3,88	0,0215	<i>DNER</i>	11740758_a_at	1,89	0,0098	<i>LINC00478</i>
11747927_a_at	3,75	0,0014	<i>POSTN</i>	11758071_s_at	1,88	0,0043	<i>SULF1</i>
11747928_x_at	3,63	0,0012	<i>POSTN</i>	11735570_a_at	1,85	0,0207	<i>SORBS2</i>
11736422_s_at	3,61	0,0026	<i>POSTN</i>	11757404_x_at	1,85	0,0031	<i>ID3</i>
11729238_a_at	3,56	0,0147	<i>CSRP2</i>	11757645_s_at	1,85	0,0152	<i>FIBIN</i>
11729239_x_at	3,56	0,0118	<i>CSRP2</i>	11715352_x_at	1,84	0,0255	<i>COL1A1</i>
11749527_a_at	3,54	0,0357	<i>POSTN</i>	11720230_at	1,84	0,0295	<i>TES</i>
11736423_a_at	3,53	0,0026	<i>POSTN</i>	11754993_s_at	1,84	0,0247	<i>PXDN</i>
11746931_a_at	3,20	0,0303	<i>INHBA</i>	11748659_a_at	1,83	0,0261	<i>EFEMP1</i>
11719198_s_at	3,17	0,0175	<i>CCND2</i>	11758382_s_at	1,83	0,0012	<i>ABCC9</i>
11731246_s_at	3,12	0,0055	<i>SERTAD4</i>	11721493_a_at	1,82	0,0205	<i>SULF2</i>
11728809_a_at	3,05	0,0071	<i>COL8A1</i>	11737874_a_at	1,82	0,0065	<i>SULF1</i>
11755841_a_at	2,99	0,0150	<i>KIF26B</i>	11720528_at	1,81	0,0012	<i>LTBP2</i>
11764077_s_at	2,84	0,0439	<i>EDIL3</i>	11716685_s_at	1,80	0,0256	<i>MYO1D</i>
11732519_at	2,78	0,0427	<i>CH25H</i>	11722111_at	1,79	0,0018	<i>HLX</i>
11723174_a_at	2,75	0,0115	<i>FNDC1</i>	11754008_x_at	1,79	0,0070	<i>ID3</i>
11720607_a_at	2,62	0,0349	<i>SFRP2</i>	11725806_at	1,77	0,0284	<i>KCNJ8</i>
11715673_x_at	2,60	0,0091	<i>JUNB</i>	11755643_a_at	1,77	0,0002	<i>TNS3</i>
11729157_a_at	2,60	0,0029	<i>MFAP4</i>	11731596_a_at	1,76	0,0333	<i>ZNF503</i>
11721335_x_at	2,50	0,0159	<i>PLOD2</i>	11724983_at	1,75	0,0083	<i>PCDH7</i>
11723785_s_at	2,49	0,0230	<i>LIMCH1</i>	11751896_a_at	1,75	0,0242	<i>COL12A1</i>
11725764_a_at	2,49	0,0233	<i>COL11A1</i>	11724886_a_at	1,74	0,0129	<i>LRRN3</i>
11721334_a_at	2,36	0,0237	<i>PLOD2</i>	11716835_a_at	1,71	0,0127	<i>DHRS3</i>
11751903_s_at	2,35	0,0055	<i>COL11A1</i>	11747935_a_at	1,71	0,0252	<i>TNC</i>
11718743_a_at	2,34	0,0019	<i>CXCL12</i>	11716666_a_at	1,70	0,0078	<i>ID3</i>
11716203_a_at	2,32	0,0056	<i>MGP</i>	11726015_at	1,70	0,0010	<i>GPC6</i>
11715683_a_at	2,30	0,0220	<i>KRT7</i>	11722352_s_at	1,69	0,0138	<i>ACTA2</i>
11756294_a_at	2,29	0,0034	<i>JAM2</i>	11744969_a_at	1,69	0,0009	<i>PAPLN</i>
11757336_s_at	2,28	0,0133	<i>LIMCH1</i>	11749254_a_at	1,69	0,0122	<i>PRSS23</i>
11722597_a_at	2,26	0,0036	<i>CXCR7</i>	11720338_at	1,68	0,0085	<i>FIBIN</i>
11760425_a_at	2,22	0,0451	<i>IL6</i>	11752501_a_at	1,67	0,0430	<i>CXCR7</i>
11717274_s_at	2,20	0,0495	<i>COL5A1</i>	11720452_at	1,65	0,0110	<i>PLEKHH2</i>
11743282_a_at	2,20	0,0070	<i>SULF1</i>	11751633_x_at	1,65	0,0022	<i>PRSS23</i>
11734225_x_at	2,18	0,0177	<i>LIMCH1</i>	11715465_at	1,63	0,0194	<i>IGFBP4</i>
11717272_at	2,14	0,0496	<i>COL5A1</i>	11721046_a_at	1,63	0,0251	<i>SERINC2</i>
11727163_a_at	2,08	0,0325	<i>ACVR2A</i>	11727067_a_at	1,62	0,0262	<i>SLIT3</i>
11723364_at	2,07	0,0013	<i>LITD1</i>	11741013_a_at	1,62	0,0145	<i>LRRN3</i>
11715846_at	2,05	0,0185	<i>EFEMP1</i>	11745839_a_at	1,62	0,0039	<i>C9orf3</i>



Tab. 15 Top 100 der in  $BRCA1^{mosMe}$  im Vergleich zu  $BRCA1^{wt}$  Fibroblasten schwächer exprimierten Probe Sets. FC steht für den Expressionsunterschied („fold change“).

Probe Set	FC	p-Wert	Gen	Probe Set	FC	p-Wert	Gen
11759471_x_at	-8,21	0,0036	<i>LCE1F</i>	11761116_a_at	-1,96	0,0379	<i>FAM65B</i>
11759470_at	-7,10	0,0028	<i>LCE1F</i>	11728302_at	-1,95	0,0118	<i>TGFA</i>
11759610_at	-7,01	0,0000	<i>HOXB-AS3</i>	11718977_a_at	-1,94	0,0204	<i>CAPN2</i>
11732881_s_at	-6,67	0,0000	<i>TBX1</i>	11739518_a_at	-1,94	0,0327	<i>FLRT3</i>
11731500_a_at	-5,93	0,0181	<i>KRT19</i>	11744519_a_at	-1,94	0,0367	<i>POLE2</i>
11757033_a_at	-5,82	0,0109	<i>IL13RA2</i>	11725274_s_at	-1,92	0,0492	<i>RGS20</i>
11758790_a_at	-4,99	0,0192	<i>STMN2</i>	11734389_a_at	-1,92	0,0419	<i>GLYATL2</i>
11758251_s_at	-4,45	0,0000	<i>HOXB3</i>	11751957_a_at	-1,92	0,0003	<i>HERC4</i>
11717825_a_at	-4,39	0,0317	<i>STMN2</i>	11739466_a_at	-1,90	0,0246	<i>ECHDC1</i>
11717826_x_at	-4,12	0,0449	<i>STMN2</i>	11755866_a_at	-1,90	0,0019	<i>OLFM1</i>
11735486_at	-3,72	0,0174	<i>HOXC8</i>	11718539_a_at	-1,89	0,0088	<i>NRN1</i>
11741558_a_at	-3,47	0,0007	<i>HOXB6</i>	11737708_a_at	-1,88	0,0499	<i>ORC5</i>
11716395_a_at	-3,39	0,0016	<i>GPR56</i>	11749567_a_at	-1,88	0,0248	<i>DDX55</i>
11722977_at	-3,35	0,0012	<i>HOXB5</i>	11728101_at	-1,87	0,0065	<i>ZNF367</i>
11723503_at	-3,25	0,0018	<i>PRLR</i>	11732455_at	-1,86	0,0235	<i>KCNJ15</i>
11727270_a_at	-3,20	0,0383	<i>TRIM55</i>	11746162_a_at	-1,86	0,0426	<i>FAM49B</i>
11723070_a_at	-3,10	0,0142	<i>CYTL1</i>	11723928_at	-1,85	0,0079	<i>PNMA2</i>
11757849_s_at	-3,08	0,0062	<i>PNMA2</i>	11730391_at	-1,85	0,0096	<i>SEMA3A</i>
11727272_x_at	-2,88	0,0328	<i>TRIM55</i>	11730742_x_at	-1,85	0,0262	<i>AKIRIN1</i>
11722893_at	-2,87	0,0018	<i>HOXB7</i>	11733608_x_at	-1,85	0,0001	<i>LRRC34</i>
11750279_a_at	-2,85	0,0460	<i>STC1</i>	11750435_a_at	-1,85	0,0149	<i>IRX5</i>
11735487_at	-2,83	0,0001	<i>HOXC8</i>	11720240_at	-1,84	0,0048	<i>LOC10106023</i>
11740290_a_at	-2,73	0,0000	<i>HOXC6</i>	11755932_a_at	-1,84	0,0057	<i>HCLS1</i>
11724381_at	-2,65	0,0054	<i>FAM65B</i>	11719809_x_at	-1,83	0,0153	<i>BLOC1S6</i>
11727271_a_at	-2,62	0,0069	<i>TRIM55</i>	11721043_at	-1,83	0,0133	<i>ERI1</i>
11723502_at	-2,52	0,0019	<i>PRLR</i>	11725830_a_at	-1,83	0,0152	<i>PLCL2</i>
11763492_a_at	-2,48	0,0249	<i>NRN1</i>	11732922_at	-1,82	0,0019	<i>GJA3</i>
11750898_a_at	-2,44	0,0007	<i>HOXB3</i>	11740338_a_at	-1,82	0,0328	<i>AGFG1</i>
11733607_a_at	-2,39	0,0013	<i>LRRC34</i>	11752562_x_at	-1,82	0,0381	<i>CDH13</i>
11757903_s_at	-2,36	0,0166	<i>COL4A5</i>	11726479_a_at	-1,81	0,0007	<i>MX2</i>
11737135_a_at	-2,33	0,0000	<i>HOXC6</i>	11730541_x_at	-1,81	0,0062	<i>TAF1A</i>
11763202_x_at	-2,31	0,0050	<i>FAM65B</i>	11724965_at	-1,80	0,0420	<i>BLOC1S1</i>
11728397_at	-2,23	0,0402	<i>MT1M</i>	11744140_a_at	-1,80	0,0331	<i>FOLR3</i>
11758967_s_at	-2,23	0,0304	<i>TFPI2</i>	11727791_s_at	-1,78	0,0155	<i>DLAT</i>
11723501_at	-2,21	0,0050	<i>PRLR</i>	11731606_at	-1,78	0,0078	<i>SCIN</i>
11723246_s_at	-2,19	0,0038	<i>SFRP1</i>	11747210_a_at	-1,78	0,0451	<i>SRI</i>
11722503_at	-2,15	0,0428	<i>ITGB8</i>	11759287_at	-1,78	0,0391	<i>DNAJB4</i>
11744141_x_at	-2,14	0,0259	<i>FOLR3</i>	11716422_x_at	-1,76	0,0372	<i>SPTBN1</i>
11726080_a_at	-2,13	0,0192	<i>GALNT15</i>	11725457_at	-1,76	0,0225	<i>FBXO33</i>
11735463_a_at	-2,13	0,0310	<i>NTNG1</i>	11727448_x_at	-1,76	0,0241	<i>ST6GALNAC5</i>
11725980_at	-2,12	0,0332	<i>CFD</i>	11730469_s_at	-1,76	0,0392	<i>LMO2</i>
11720558_a_at	-2,11	0,0376	<i>GEM</i>	11741123_x_at	-1,76	0,0140	<i>ADK</i>
11724912_at	-2,07	0,0335	<i>NDNF</i>	11725321_a_at	-1,75	0,0355	<i>CRK</i>
11723607_a_at	-2,06	0,0421	<i>AGFG1</i>	11741599_at	-1,75	0,0068	<i>LCE2A</i>
11724198_a_at	-2,05	0,0125	<i>STC1</i>	11731800_at	-1,74	0,0303	<i>C3orf70</i>
11729381_a_at	-2,03	0,0444	<i>AK5</i>	11739770_s_at	-1,73	0,0152	<i>TMOD2</i>
11729996_a_at	-2,02	0,0013	<i>SLFN12</i>	11718685_a_at	-1,72	0,0151	<i>TXNRD2</i>
11718102_at	-2,00	0,0338	<i>CD59</i>	11728404_at	-1,72	0,0480	<i>SHCBP1</i>
11722583_a_at	-1,97	0,0092	<i>IGFBP2</i>	11729374_at	-1,72	0,0210	<i>KRT34</i>
11726383_a_at	-1,96	0,0108	<i>OLFM1</i>	11719242_s_at	-1,71	0,0481	<i>CAMK2N1</i>

Die Gesamtheit aller differenziell exprimierten Gene wurde einer hierarchischen Clusteranalyse unterzogen. In der Clusteranalyse werden Messwerte an Hand ihrer Ähnlichkeit gruppiert. Bei der Expressionsarray-Analyse macht man sich diese Methode zu Nutze, um z.B. Proben ähnlicher Expressionsmuster zu identifizieren. Zur Clustergenerierung wurde hier die „complete linkage“ Methode angewendet. Dabei wird jeweils der größte Abstand zwischen den Punkten aus zwei Clustern als euklidischer Abstand berechnet und in einem Dendrogramm dargestellt.

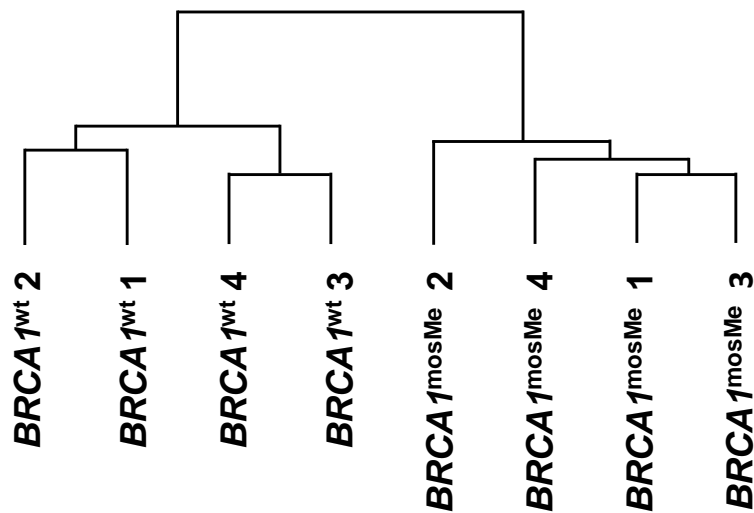
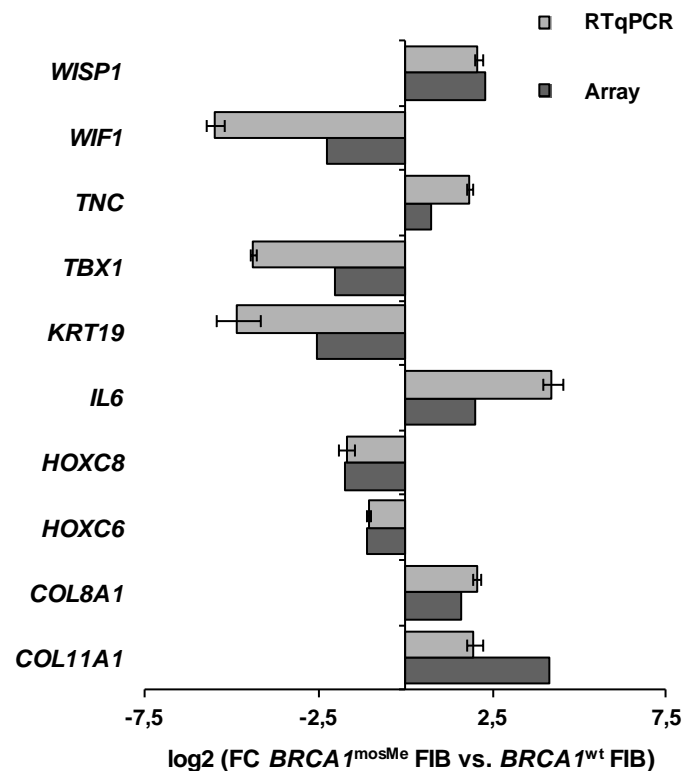


Abb. 13 Dendrogramm der „complete linkage“ Cluster Analyse mit differenziell exprimierten Genen der je 4 Replikate der  $BRCA1^{wt}$  und  $BRCA1^{mosMe}$  Fibroblasten

In der Clusteranalyse gruppierten sich zwei Hauptcluster von je vier Proben (Abb. 13). Die Zuordnung der Proben entsprach der Zugehörigkeit der Fibroblasten zu dem jeweiligen Zwilling, dem diese entnommen wurden. Diese Beobachtung bestätigte, dass die Expressionsprofile während der Fibroblastenkultivierung stabil bestehen blieben und sich spezifisch zwischen  $BRCA1^{mosMe}$  und  $BRCA1^{wt}$  Fibroblasten unterschieden.

### 3.3.2 Ergebnisvalidierung mittels RT-qPCR

Zur Validierung des Arrayexperimentes wurden die Expressionsunterschiede zwischen  $BRCA1^{wt}$  und  $BRCA1^{mosMe}$  Fibroblasten für 10 Gene mittels RT-qPCR gemessen. Es wurden bewusst Gene gewählt, deren Expressionsunterschiede unterschiedlich stark ausgeprägt waren. Dies ist in diesem Projekt von besonderer Bedeutung, da in den weiteren Analysen auch Gene berücksichtigt werden sollen, die relativ geringe, jedoch signifikante Expressionsunterschiede zeigen.



**Abb. 14 Vergleich der mRNA-Expressionslevel 10 ausgewählter Gene analysiert mittels Expressionsarray und RT-qPCR.** Dargestellt sind die logarithmierten Expressionsverhältnisse  $BRCA1^{mosMe}$  vs.  $BRCA1^{wt}$  für beide Untersuchungsmethoden. Für das RT-qPCR-Experiment wurde die relative Expression berechnet als  $2^{\Delta\Delta Ct}$  und auf das Referenzgen TBP normalisiert. Die Anzahl der gemessenen Replikate beläuft sich auf  $n=3$ . Die Werte der Array-Untersuchung wurden einer Normalisierung mittels ANOVA-Algorithmus unterzogen.

In Abb. 14 sind die sich im Array und in der RT-qPCR ergebenden Expressionsverhältnisse von  $BRCA1^{mosMe}$  zu  $BRCA1^{wt}$  logarithmisch aufgetragen. Positive Werte zeigen eine höhere Expression, negative Werte eine niedrigere Expression des jeweiligen Gens in  $BRCA1^{mosMe}$  Fibroblasten im Vergleich zu  $BRCA1^{wt}$  Fibroblasten an. Der Trend der Expressionsverhältnisse, die mittels Array analysiert wurden, bestätigte sich in der RT-qPCR für alle untersuchten Gene. Allerdings gab es teilweise Unterschiede in der Stärke der differentiellen Expression. Dabei fiel auf, dass oftmals die gemessenen Expressionsunterschiede in der RT-qPCR höher waren als die im Arrayexperiment gemessenen Werte. Solche Diskrepanzen kommen zumeist durch die stark unterschiedlichen Arten der Normalisierung zwischen den beiden Methoden oder auf Grund der Detektion unterschiedlicher Transkripte zu Stande.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse jedoch, dass die Verwendung des U219-Arrays in dem vorliegenden Vorhaben geeignet war, Expressionsunterschiede zwischen den

*BRCA1*<sup>mosMe</sup> und *BRCA1*<sup>wt</sup> Fibroblasten zu identifizieren. Dabei wurde das Ausmaß der differentiellen Expression in einigen Fällen tendenziell unterschätzt.

### 3.3.3 Explorative, funktionelle Analyse mittels “Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery” (DAVID)

Im nächsten Schritt wurden die gewonnenen Expressionsdaten unter Zuhilfenahme des webbasierten Tools „Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery“ (DAVID) analysiert, um das Expressionsprofil der *BRCA1*<sup>mosMe</sup> Fibroblasten in einen funktionellen Zusammenhang einordnen zu können. Dieses Tool weist einem Satz von Genen assoziierte biomedizinische Ontologien (gene ontology, GO) zu und bestimmt anschließend den Grad deren Anreicherung. Dabei werden folgende drei Bereiche abdeckt: „Zelluläre Komponente“, „Biologischer Prozess“ und „Molekulare Funktion“. DAVID nutzt den exakten Fisher Test zur Berechnung der statistischen Signifikanz der Anreicherung.

Die in *BRCA1*<sup>mosMe</sup> signifikant höher sowie niedriger exprimierten Gene wurden separat der DAVID-Analyse unterzogen. Tab. 16 zeigt die meistangereicherten Ontologien für die in *BRCA1*<sup>mosMe</sup> höher exprimierten Gene.

Sowohl für die Analyse der „Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes“-Pathways (KEGG) auch als für alle drei Kategorien der GO-Analyse fanden sich signifikante Anreicherungen. Die stärkste Akkumulation zeigte sich in der Kategorie der „Zellulären Komponenten“, wobei der Begriff „strukturelle Bestandteile der EZM“ mit einem p-Wert von  $1,7 \times 10^{-11}$  die statistisch höchste Signifikanz in der Kategorie sowie in der gesamten Analyse erreichte. Auffällig war, dass in dieser Kategorie 8 von 10 signifikant angereicherten Begriffen, wie z.B. „proteinöse extrazelluläre Matrix“, „Kollagen“ und „Basalmembran“ in einem starken Zusammenhang zum Interzellularraum standen. Einige Begriffe, die in der Kategorie „Biologischer Prozess“ stark gehäuft vorkamen, wie z.B. „Zelladhäsion“ und „Organisation der extrazellulären Struktur“, bezogen sich ebenfalls auf Prozesse des extrazellulären Raumes. Dies galt ebenfalls für die Annotationsgruppe „Bestandteil der extrazellulären Matrix“, die mit einem p-Wert von  $7,93 \times 10^{-5}$  in der Kategorie „Molekulare Funktion“ den meist angereicherten Begriff darstellte. In der Analyse der KEGG-Pathways fielen ebenfalls die zwei außerhalb der Zellkörper stattfindenden Signalwege „EZM-Rezeptor-Interaktion“ sowie „Fokale Adhäsion“ auf, da deren Anreicherung die höchste Signifikanz innerhalb dieser Pathway-Analyse erreichte.

**Tab. 16 Ergebniszusammenfassung der DAVID-Analyse der in  $BRCA1^{mosMe}$  Fibroblasten signifikant höher exprimierten Gene im Vergleich zu  $BRCA1^{wt}$  Fibroblasten.**

GO Zelluläre Komponenten			GO Biologische Prozesse		
Terminus	# <sub>1</sub>	P-Wert <sup>2</sup>	Terminus	# <sub>1</sub>	P-Wert <sup>2</sup>
Bestandteil d. extrazellulären Region	27	1,70E-11	Zelladhäsion	18	1,63E-07
proteinöse extrazelluläre Matrix	17	4,57E-11	biologische Adhäsion	18	1,65E-07
extrazelluläre Matrix	17	1,40E-10	Organisation d. extrazellulären Struktur	9	2,87E-06
Bestandteil d. extrazellulären Matrix	9	4,35E-07	Organisation d. extrazellulären Matrix	7	2,17E-05
Kollagen	5	5,25E-05	Entwicklung d. Neuralleiste	9	2,58E-05
Basalmembran	5	1,18E-03	pos. Regulation v. Entwicklungsprozessen	9	1,34E-04
fibrilläres Kollagen	3	2,22E-03	Muskulentwicklung	8	1,51E-04
extrazellulärer Raum	12	2,29E-03	Zellmotilität	11	2,48E-04
Golgi Zisterne	4	2,55E-03	pos. Regulation d. Zelldifferenzierung	8	2,50E-04
ATP-sensitive Kaliumkanäle	2	1,77E-02	Skelettentwicklung	9	9,51E-01

GO Molekulare Funktionen			KEGG Signalwege		
Terminus	# <sub>1</sub>	P-Wert <sup>2</sup>	Terminus	# <sub>1</sub>	P-Wert <sup>2</sup>
strukturelle Bestandteile d. EZM	6	7,93E-05	EZM-Rezeptor-Interaktion	5	1,37E-03
Bindung v. Wachstumsfaktoren	6	2,04E-04	Fokale Adhäsion	6	5,84E-03
Bindung von Calcium-Ionen	15	2,05E-04	Hypertrophe Kardiomyopathie	4	1,32E-02
strukturelle Molekülaktivität	11	1,43E-03	TGF- $\beta$ Signalweg	4	1,41E-02
Bindung von Metall-Ionen	33	4,75E-03	Zytokin-Rezeptor-Interaktion	5	6,58E-02
Bindung von Kationen	33	5,56E-03			
Bindung von Ionen	33	7,10E-03			
Bindung von Glykosaminoglykanen	4	3,56E-02			
Bindung von Polysacchariden	4	4,52E-02			
Interaktion mit polymerischen Strukturen	4	4,52E-02			

<sup>1</sup> Anzahl der Gene in einer funktionellen

Annotationsgruppierung

<sup>2</sup> p-Wert der Anreicherungssignifikanz, berechnet per exaktem Fisher-Tests

Tab. 17 zeigt jeweils für jede GO-Kategorie die meistangereicherten biomedizinischen Ontologien für die in  $BRCA1^{mosMe}$  niedriger exprimierten Gene. In der Kategorie „Biologische Prozesse“ fällt eine extrem starke Häufung von Begriffen auf, die im Zusammenhang zu embryonaler Entwicklung stehen, wie „Entwicklung anteriorer/posteriorer Muster“, „Regionalisierung“ und „embryonale Skelettentwicklung“. Dies ist auf eine starke Präsenz von Genen der *HOX*-Genfamilie in der Genliste der unterexprimierten Gene zurückzuführen (siehe Tab. 15).

Eine Bedeutung von *HOX*-Genen für die Krebsentstehung wird vermutet, konnte bisher aber noch nicht bewiesen werden. Gleiches gilt für eine mögliche Assoziation mit *BRCA1* [264]. Es ist allerdings bekannt, dass das Expressionsprofil von *HOX*-Genen in Fibroblasten stark von der Entnahmestelle der Zellen beeinflusst wird [265]. Da solche positionsabhängigen Veränderungen in der *HOX*-Gensignatur nicht krankheitsrelevant sind, spielen sie vermutlich auch bei dem Vergleich der  $BRCA1^{mosMe}$  und  $BRCA1^{wt}$  Fibroblasten keine Rolle. Die erneute DAVID-Analyse der in  $BRCA1^{mosMe}$  Fibroblasten

niedriger exprimierten Gene unter Ausschluss der *HOX*-Gene ergab eine deutlich geringere Anreicherung, als es für die Analyse der in *BRCA1*<sup>mosMe</sup> höher exprimierten Gene der Fall war. In der Kategorie der „Biologischen Prozesse“ waren nur vier Begriffe statistisch signifikant angereichert und zwar „Purindesoxyribonukleotid-Biosynthese“, „Reaktion auf organische Substanzen“, „Doppelstrangbruch-Reparatur“, „Reaktion auf endogene Stimuli“ und „2'-Desoxyribonukleotid-Biosynthese“. Alle diese Annotationsgruppen stehen in Zusammenhang mit DNA-Schädigung und DNA-Reparatur. Interessanterweise war in 3 dieser 5 Ontologien *BRCA1* als eines der für die Anreicherung verantwortlichen Gene beteiligt.

**Tab. 17 Ergebniszusammenfassung der DAVID-Analyse der in *BRCA1*<sup>mosMe</sup> Fibroblasten signifikant niedriger exprimierten Gene im Vergleich zu *BRCA1*<sup>wt</sup> Fibroblasten.**

GO Biologische Prozesse (inkl. <i>HOX</i> -Gene)			GO Biologische Prozesse (exkl. <i>HOX</i> -Gene)		
Terminus	# 1	p- Wert <sup>2</sup>	Terminus	# 1	p- Wert <sup>2</sup>
Entw. anteriorer/posteriorer Muster	9	8,33E-05	Purindesoxyribonukleotid-Biosynthese	2	1,90E-02
Regionalisierung	9	8,43E-04	Reaktion auf organische Substanzen	14	2,01E-02
embryonale Skelettentwicklung	6	1,06E-03	Doppelstrangbruch-Reparatur	4	2,13E-02
embryonale Musterbildung	10	1,50E-03	Reaktion auf endogene Stimuli	9	4,00E-02
embryonale Organentwicklung	8	1,76E-03	2'-Desoxyribonukleotid-Biosynthese	2	4,68E-02
Embryonalentwicklung d. Chordaten	11	1,87E-03	Glycerin-3-Phosphat Metabolismus	2	5,59E-02
Embryonalentwicklung	11	2,00E-03	Biosynthese organischer Säuren	5	6,09E-02
embryonale Skelettmorphogenese	5	2,56E-03	Biosynthese Carboxyl-Säuren	5	6,09E-02
Skelettentwicklung	10	4,92E-03	Bind. v. Kofaktoren und Proteinen	2	7,38E-02
Skelettmorphogenese	6	5,42E-03	Desoxyribonukleotid-Biosynthese	2	7,38E-02
GO Zelluläre Komponenten (exkl. <i>HOX</i> -Gene)			GO Molekulare Funktionen (exkl. <i>HOX</i> -Gene)		
Terminus	# 1	p- Wert <sup>2</sup>	Terminus	# 1	p- Wert <sup>2</sup>
neuronales Auswachsen	8	2,82E-02	Bindung identischer Proteine	13	1,93E-02
Bestandteil d. extrazellulären Region	14	6,85E-02	Translations-Freisetzungsfaktoraktivität	2	5,60E-02
zelluläres Auswachsen	11	7,71E-02	Translations-Terminationsfaktoraktivität	2	5,60E-02
Mitochondrium	15	8,28E-02	Kinaseaktivität f. Nucleobasen-,side-,tide	3	6,34E-02
Intrins. Fakt. a. d. äußeren Plasmamem.	2	8,28E-02	Bindung v. DNA-Einzelsträngen	3	9,69E-02
extrazelluläre Region	24	8,89E-02	Zytokin-Rezeptor-Aktivität	3	9,69E-02
KEGG Signalwege (exkl. <i>HOX</i> -Gene)					
Terminus	# 1	p-Wert <sup>2</sup>			
Cystein- und Methioninmetabolismus	3	5,17E-02			

<sup>1</sup> Anzahl der Gene in einer funktionellen Annotationsgruppierung

<sup>2</sup> p-Wert der Anreicherungssignifikanz, berechnet per exaktem Fisher-Tests

Für die Kategorien „Zelluläre Komponenten“ sowie „Molekulare Funktion“ konnte jeweils nur ein signifikant angereicherter Begriff gefunden werden. Für die Ontologie

„neuronales Auswachsen“ kann weder ein Zusammenhang zum extrazellulären Raum noch zur DNA-Reparatur festgestellt werden. Dies betrifft ebenfalls den in der Kategorie „Molekulare Funktion“ angereicherten Begriff „Bindung identischer Proteine“, da dies ein funktionell neutraler Begriff ohne spezifische Verbindung zu bestimmten zellulären Prozessen ist. Die Pathway-Analyse ergab keinen signifikant angereicherten Signalweg.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass sich der höher exprimierte Teil des Expressionsprofils der *BRCA1*<sup>mosMe</sup> Fibroblasten im Vergleich zu *BRCA1*<sup>wt</sup> Fibroblasten auch funktionell deutlich von dem niedriger exprimierten Teil unterscheidet. Dabei sind die in *BRCA1*<sup>mosMe</sup> Fibroblasten höher exprimierten Gene stark mit Prozessen assoziiert, die mit dem extrazellulären Raum und der extrazellulären Matrix in Verbindung stehen. Die funktionelle Anreicherung der Gene, die in *BRCA1*<sup>mosMe</sup> Fibroblasten niedriger exprimiert sind, war hingegen geprägt von Prozessen, die mit DNA-Schädigung und DNA-Reparatur verknüpft sind.

### 3.3.4 Literaturrecherche als Vorbereitung zur Hypothesengenerierung

Um festzustellen, ob ähnliche Veränderungen des Expressionsprofils bei Fibroblasten bereits in anderen Zusammenhängen berichtet worden sind, folgte eine umfangreiche Literaturrecherche. Dabei wurde mittels PubMed [266] nach relevanten wissenschaftlichen Publikationen gesucht. Dies geschah durch Eingabe unterschiedlicher Schlagwörtern in verschiedenen Kombinationen, so wie: „dermal fibroblasts“, „expression profile“, „collagen upregulation“, „COL11A1“ „extra cellular matrix gene upregulation“, „tumor suppressor“, „cancer“ „POSTN“ usw. Durch Analyse der gefundenen Literatur und Vergleich des Expressionsprofils *BRCA1*<sup>mosMe</sup> vs. *BRCA1*<sup>wt</sup> mit bereits publizierten Expressionsprofilen von Fibroblasten im Rahmen unterschiedlichster experimenteller Fragestellungen, fiel eine große Übereinstimmung zu sogenannten „Cancer-associated fibroblasts“ (CAFs) bzw. Tumor-assoziierten Fibroblasten auf. Um im nächsten Schritt konkrete Parallelen zwischen den Expressionprofilen von *BRCA1*<sup>mosMe</sup> Fibroblasten und denen von CAFs aufdecken zu können, wurden in der aktuellen Literatur zum Thema „Cancer-associated fibroblasts“ Gene bzw. Proteine identifiziert, die als Marker für den CAF-Zustand dienen bzw. typischerweise im Vergleich zu normalen Fibroblasten in CAFs dereguliert sind.

Wie erwartet waren viele der identifizierten Marker Strukturproteine und Enzyme, die am Umbau der Extrazellulären Matrix (EZM) beteiligt sind. Zusätzlich fiel eine

Überrepräsentation von Zytokinen und Wachstumsfaktoren auf. Die Ergebnisse dieser Recherche sind in Tab. 18 zusammengefasst.

**Tab. 18 Ergebnis der Literaturrecherche in Reviews zur Identifizierung von spezifischen CAF-Markern und deregulierten Proteinen/Genen in CAFs**

Reviews zu CAFs	Beschriebene CAF-Marker bzw. deregulierte Proteine/Gene
Madar et al. 2013 [267] Cancer associated fibroblasts-more than meets the eye	↓CAV1, CXCL12, FSP1, HGF, MMP1, PDGF, PDGFR, α-SMA, TGF-β, VIM
Togo et al. 2013 [268] Carcinoma-associated fibroblasts are a promising therapeutic target	COL1A1, FAP, FN1, FSP1, NG2, PALLD, PDGFR, PDPN, POSTN, α-SMA, TNC, VIM
Kharaihvili et al. 2014 [269] The role of cancer-associated fibroblasts, solid stress and other microenvironmental factors in tumor progression and therapy resistance	↓CAV1, DES, FAP, FSP1, HGF, LOXL1, MMPs, PDGFR, POSTN, PTEN, α-SMA, TNC, VIM
Valcz et al. 2014 [270] Importance of carcinoma-associated fibroblast-derived proteins in clinical oncology	CCLs, COL1A1, COL3A1, COL4A1, CXCLs, EGF, FAP, FGF, FN1, FSP1, HGF, IL6, IL8, MMPs, PDGF, PDPN, POSTN, SDF1, TGF-β, TNC, VEGF, VIM
Polanska et al. 2013 [271] Carcinoma-associated fibroblasts: non-neoplastic tumour-promoting mesenchymal cells	COL1A1, FAP, FN1, NG2, PALLD, PDGFR, PDPN, α-SMA, TNC, VIM

### 3.3.5 Hypothesengebundener Vergleich der Expressionsprofile von *BRCA1*<sup>mosMe</sup> Fibroblasten und CAFs

Um zu überprüfen, ob das mRNA-Expressionsprofil von *BRCA1*<sup>mosMe</sup> Fibroblasten tatsächlich Ähnlichkeiten zum Expressionsprofil von CAFs hat, wurde die Liste der differenziell exprimierten Gene insbesondere nach EZM-assoziierten Genen sowie Zytokinen durchsucht. Eine Auswahl dieser ist in Abb. 15 unter Darstellung der Expressionswerte einzelner biologischer Replikate in Form einer Heatmap dargestellt. Zusätzlich wurde die Expression einiger im Array auffälliger sowie unauffälliger CAF-Schlüsselgene mittels RT-qPCR analysiert (Abb. 16).

In der Gruppe der EZM-assoziierten Strukturproteine fiel eine starke Überexpression der Kollagene *COL11A1*, *COL5A1*, *COL8A1* und *COL1A1* in *BRCA1*<sup>mosMe</sup> im Vergleich zu *BRCA1*<sup>wt</sup> Fibroblasten auf. Für *COL11A1* erreichte das Expressionsverhältnis eines Probe Sets einen Wert von 35,45 und stellt somit das am stärksten differenziell



regulierte Probe Set im gesamten Arrayexperiment dar. Für *COL4A1* konnte weder im Array noch in der RT-qPCR ein Expressionsunterschied festgestellt werden. Eine weitere deregulierte Genfamilie waren die Keratine mit einer signifikant höheren Expression für *KRT7* sowie niedrigerer Expression für *KRT19* und *KRT34* in *BRCA1<sup>mosMe</sup>* Fibroblasten. Darüber hinaus konnte in der RT-qPCR eine 4-fach höhere Expression des für das EZM-Strukturprotein Fibronectin kodierenden Gens FN1 in *BRCA1<sup>mosMe</sup>* Fibroblasten festgestellt werden.

In der Gruppe der Gene, die für EZM-modulierende Enzyme kodieren, fand sich unter anderem eine moderate aber signifikante Überexpression der zwei wichtigen CAF-Marker *POSTN* und *TNC* in *BRCA1<sup>mosMe</sup>* im Gegensatz zu *BRCA1<sup>wt</sup>* Fibroblasten, wobei sich letztere ebenfalls in der RT-qPCR bestätigte. Darüber hinaus zeigte sich ebenfalls eine signifikante Hochregulation weiterer EZM-assoziiierter Gene, unter anderem von *LOXL2* und *MGP*, die in der Literatur bereits mit CAFs in Verbindung gebracht wurden. Die RT-qPCR bestätigte die signifikant differenzielle Expression von *MGP*, wies jedoch mit 9,5 einen vielfach stärkeren Expressionsunterschied auf. Zudem ergab die RT-qPCR für das CAF-Schlüsselgen *PDPN* eine 3,85-fache Überexpression in *BRCA1<sup>mosMe</sup>* verglichen mit *BRCA1<sup>wt</sup>* Fibroblasten. Weder Array noch RT-qPCR zeigten Expressionsunterschiede der CAF-typischen Gene *MMP1* und *MMP14* in *BRCA1<sup>mosMe</sup>* vs. *BRCA1<sup>wt</sup>* Fibroblasten.

Beobachtet werden konnte außerdem eine zwischen *BRCA1<sup>mosMe</sup>* und *BRCA1<sup>wt</sup>* differenzielle Expression von Zytokinen und Wachstumsfaktoren, die als CAF-Schlüsselmarker identifiziert worden waren. Dabei waren *IL6*, *CXCL6* sowie *CXCL12* moderat und signifikant hochreguliert, wohingegen für *FGF5* eine niedrigere Expression festgestellt werden konnte. Die RT-qPCR bestätigte die leichte Überexpression von *CXCL12*. Zusätzlich zeigte sich in der RT-qPCR für die CAF-Schlüsselgene *FAP*, *IL8* und *TGF $\beta$* , die im Arrayexperiment unauffällig waren, eine stark signifikante differenzielle Expression, mit höheren Expressionswerten für *BRCA1<sup>mosMe</sup>* im Vergleich zu *BRCA1<sup>wt</sup>*. Die Expression von *CAV1*, dessen Verlust als Marker für einen CAF-Phänotyp gilt, war in *BRCA1<sup>mosMe</sup>* Fibroblasten im Gegensatz zu *BRCA1<sup>wt</sup>* erniedrigt. Dieser Unterschied war allerdings nicht statistisch signifikant.

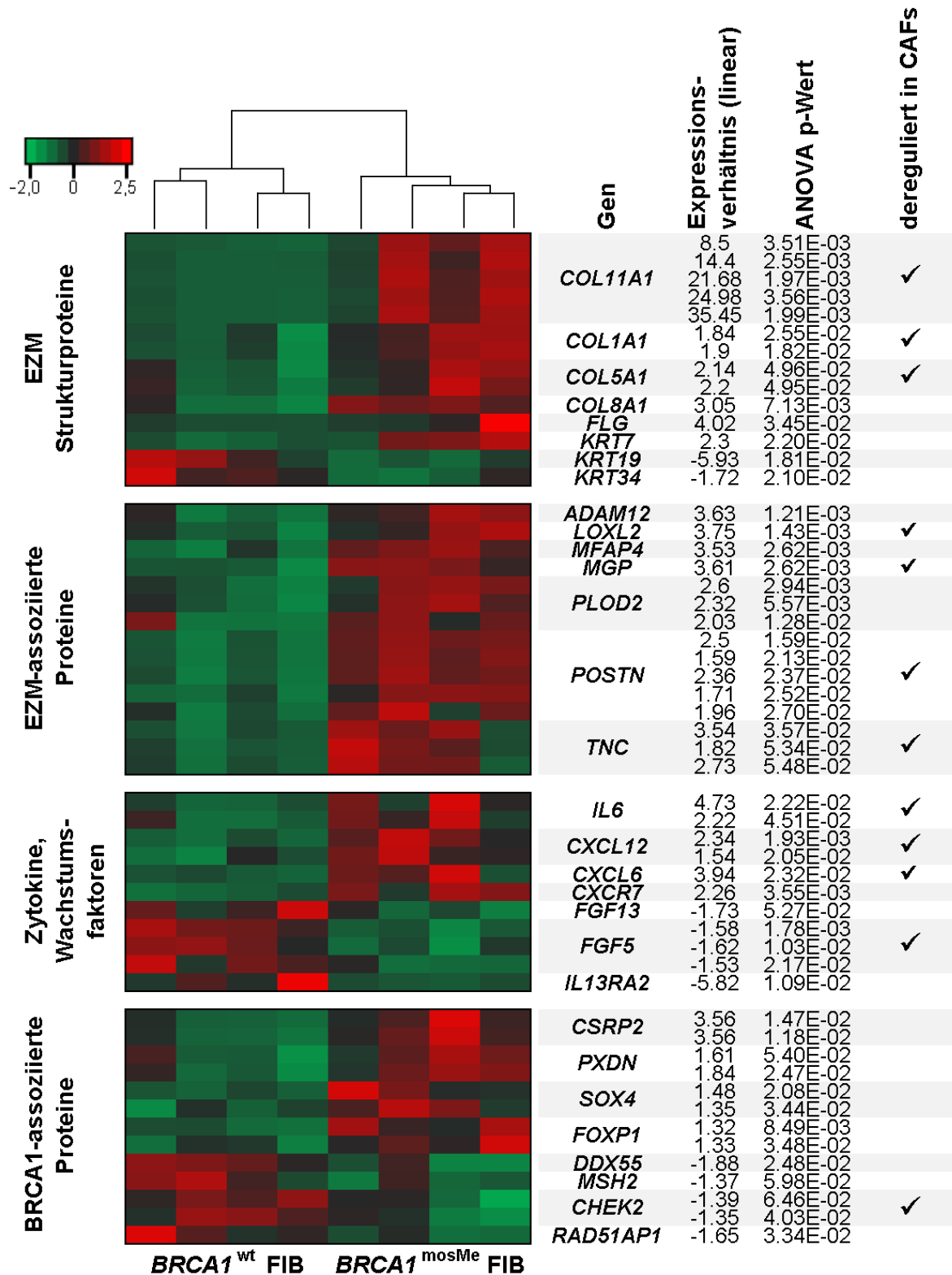
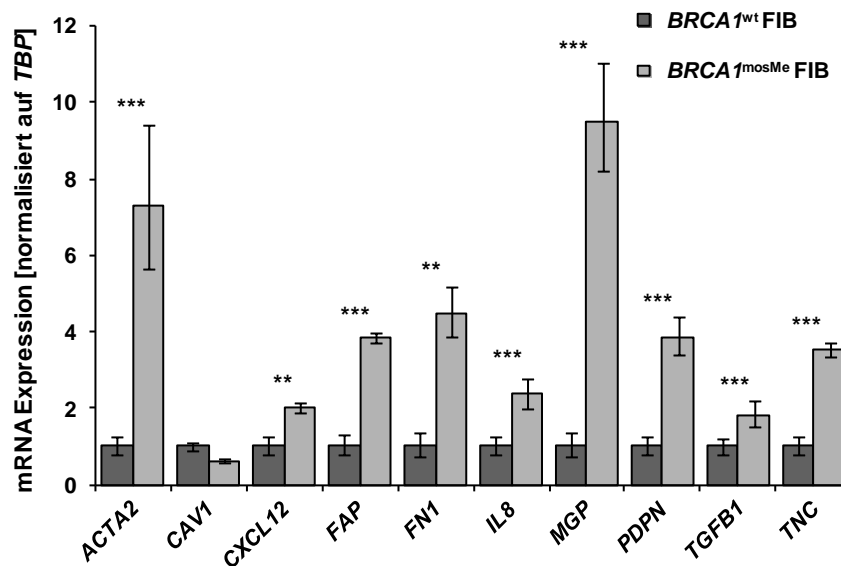


Abb. 15 Heatmap der mRNA-Genexpressionswerte ausgewählter Gene in BRCA1<sup>mosMe</sup> Fibroblasten vs. BRCA1<sup>wt</sup> Fibroblasten. Die Expressionswerte wurden zeilenweise z-transformiert und farbkodiert dargestellt. Rot=Wert über dem Zeilendurchschnitt; Grün=Wert unter dem Zeilendurchschnitt. Jede Spalte steht für ein biologisches Replikat. In einigen Fällen sind Werte für mehrere Probe Sets pro Gen dargestellt. Häkchen markieren diejenigen Gene, die laut Literatur in CAFs dereguliert vorkommen.



**Abb. 16** Vergleich der mRNA-Expressionslevel ausgewählter CAF-Schlüsselgene in *BRCA1<sup>mosMe</sup>* Fibroblasten vs. *BRCA1<sup>wt</sup>* Fibroblasten mittels RT-qPCR. Die relative Expression wurde berechnet als  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  und auf das Referenzgen TBP sowie die Probe *BRCA1<sup>wt</sup>* normalisiert. Die Fehlerbalken zeigen  $\pm RQ_{min/max} = 2^{-(\Delta\Delta Ct \pm T \cdot SD(\Delta\Delta Ct))}$  mit  $T = \text{Konfidenzniveau}$  und  $SD = \text{Standardabweichung}$ . Die Anzahl der gemessenen Replikate beläuft sich auf  $n=3$ . Die statistische Auswertung erfolgt mittels Studentischem *t*-Test mit  $*p < 0,05$ ,  $**p < 0,0005$ ,  $***p < 0,00005$ .

Das Expressionsprofil von *BRCA1<sup>mosMe</sup>* vs. *BRCA1<sup>wt</sup>* wurde im nächsten Schritt auf Veränderungen hin untersucht, die direkt auf die Haploinsuffizienz von *BRCA1* zurückzuführen sind. Dies sollte einen Hinweis darauf geben, ob die durch die *BRCA1*-Epimutation im 25%-igen Mosaik hervorgerufene *BRCA1*-Defizienz sich auf funktioneller Ebene überhaupt stark genug auswirkt, um nachgeschaltete Signalwege und Prozesse zu regulieren. Das Expressionsprofil von *BRCA1<sup>mosMe</sup>* wurde mit publizierten Expressionsdaten verglichen, die an Lymphozyten von *BRCA1*-Mutationsträgern generiert worden waren. Es fand sich eine 10%ige Übereinstimmung der Gene, die in beiden Studien differenziell exprimiert waren. Unter Berücksichtigung des geringgradigen Aberrationsmosaiks und des dadurch begründeten Herabsetzens der Grenzwerte für differenziell exprimierte Gene (DEGs) auf 25% fand sich sogar eine Schnittmenge von 25%. Dabei waren zum Beispiel *PXDN*, *CSRP2*, *ENPP2* und *FOXP1* in *BRCA1<sup>mosMe</sup>* und in Lymphozyten mit *BRCA1*-Mutationen gleichermaßen hochreguliert. Darüber hinaus fand sich auch eine Runterregulation von Genen, die in DNA-Reparatur-Prozessen mit *BRCA1* assoziiert sind. Diese waren zum Beispiel *MSH2*, *CHEK2* und *RAD51AP1* (Abb. 15).

### 3.3.6 Hypothesengebundene „Ingenuity upstream regulator“ Analyse der Expressionsprofile *BRCA1*<sup>mosMe</sup> vs. *BRCA1*<sup>wt</sup> Fibroblasten

Im nächsten Schritt wurden die gewonnenen Expressionsdaten unter Zuhilfenahme der Ingenuity Pathway Analysis Software der Firma Qiagen analysiert, um das Expressionsprofil der *BRCA1*<sup>mosMe</sup> Fibroblasten in einen funktionellen Zusammenhang einordnen bzw. den funktionellen Zusammenhang zu CAFs überprüfen zu können. Dieses Tool stellt eine Verbindung her zwischen der Gesamtheit aller differenziell exprimierten Gene einer Expressionsstudie sowie übergeordneten Regulatoren, die potenziell für die Induktion dieses Expressionsmusters verantwortlich sein könnten. Dabei greift die Software auf einen Wissenspool zurück, der sich aus wissenschaftlichen Publikationen und Datenbanken speist.

Zusätzlich wird bei dieser Analyse eine Vorhersage bezüglich des Aktivierungszustandes der „upstream regulator“ Moleküle gemacht. Dies beruht auf der Berechnung eines z-transformierten Aktivierungswertes, der sich aus der Gesamtheit der Expressionswerte der Gene eines Netzwerks zusammensetzt. Der p-Wert ist in diesem Zusammenhang ein Maß für die Signifikanz der Schnittmenge der von dem „upstream regulator“ beeinflussten Gene mit der Liste der DEGs des analysierten Experimentes.

Bei der Analyse des Expressionsprofils der *BRCA1*<sup>mosMe</sup> vs. *BRCA1*<sup>wt</sup> Fibroblasten ergab die Vorhersage 18 aktivierte sowie 8 reprimierte vorgeschaltete Regulatoren („upstream regulator“) (siehe Tab. 19). Dabei gehörten viele der Regulatoren den Molekülklassen „Wachstumsfaktor“, „Transkriptionsfaktor“ und „Zytokin“ an.

Der Wachstumsfaktor TGFβ1 war dabei der „upstream regulator“, der mit dem niedrigsten p-Wert von  $2,22 \times 10^{-12}$  als aktiviert vorhergesagt wurde. Wie in Abb. 17 gezeigt, steht TGFβ1 mit einer Vielzahl von Genen in Beziehung, die in *BRCA1*<sup>mosMe</sup> Fibroblasten im Vergleich zu *BRCA1*<sup>wt</sup> höher exprimiert waren. Dies gilt zum Beispiel für die Kollagen-Familie sowie für andere CAF-Schlüsselmoleküle wie POSTN oder IL6. Zusätzlich zu TGFβ1 zeigten sich auch TGFβ3 sowie die TGF-β-Genfamilie als solche als in *BRCA1*<sup>mosMe</sup> Fibroblasten potenziell aktiviert.

Tab. 19 Ergebnis der Ingenuity "upstream regulator" Analyse.

Vorhergesagter Aktivierungsstatus	"Upstream Regulator"	Molekültyp	z-transf. Wert der Aktivierung	p-Wert
aktiviert	TGFB1	Wachstumsfaktor	3,131	2,22E-12
	COMMD3-BMI1	Transkriptionsfaktor	2,449	8,64E-08
	TGFB3	Wachstumsfaktor	2,343	8,53E-07
	ERBB2	Kinase	2,318	5,04E-06
	EGF	Wachstumsfaktor	2,201	6,96E-06
	TWIST1	Transkriptionsfaktor	2,333	8,20E-06
	TGF- $\beta$	Gruppe	2,364	1,05E-05
	VEGFA	Wachstumsfaktor	2,092	1,60E-05
	CXCR4	G-Protein-gekoppelter Rezeptor	2,359	1,15E-04
	FGF2	Wachstumsfaktor	2,401	7,97E-04
	EDN1	Zytokin	2,186	5,80E-03
	MYD88	anderer Typ	2,766	8,47E-03
	GDF2	Wachstumsfaktor	2,166	8,50E-03
	TICAM1	anderer Typ	2,215	2,41E-02
	MTPN	Transkriptionsfaktor	2,000	2,47E-02
	IL27	Zytokin	2,179	2,77E-02
	SAMSN1	anderer Typ	2,000	3,18E-02
	reprimiert	IL6	Zytokin	2,744
AHR		Kernrezeptor	-2,826	2,87E-05
CR1L		anderer Typ	-2,236	4,69E-05
$\alpha$ -catenin		Gruppe	-2,377	6,33E-05
TP63		Transkriptionsfaktor	-2,406	2,90E-04
FAS		Transmembran-Rezeptor	-2,283	7,31E-04
MEOX2		Transkriptionsfaktor	-2,000	2,28E-03
PRKAA2		Kinase	-2,190	1,18E-02
PPARGC1A	Transkriptionsfaktor	-2,425	2,31E-02	

Dargestellt sind alle vorgeschalteten Regulatoren mit eindeutig vorhergesagtem Aktivierungsstatus. Exogene Regulatoren und Chemikalien wurden aus der Analyse ausgeschlossen.

Ein anderer als „upstream regulator“ identifizierter Wachstumsfaktor war FGF2 mit einem p-Wert von  $7,97 \times 10^{-04}$ . In dem zugehörigen Netzwerk zeigte sich eine der Vorhersage entsprechende Aktivierung der Zielmoleküle SOCS3, ACTA2, BDNF, CCND2, ID3, IGFBP4, INHBA und JUNB sowie die Repression von SFRP1 (Abb. 18). Das Expressionsverhalten von zwei weiteren Genen *CXCL12* und *IGFBP2* entsprach nicht dem von Ingenuity vorhergesagtem Expressionsverhalten.

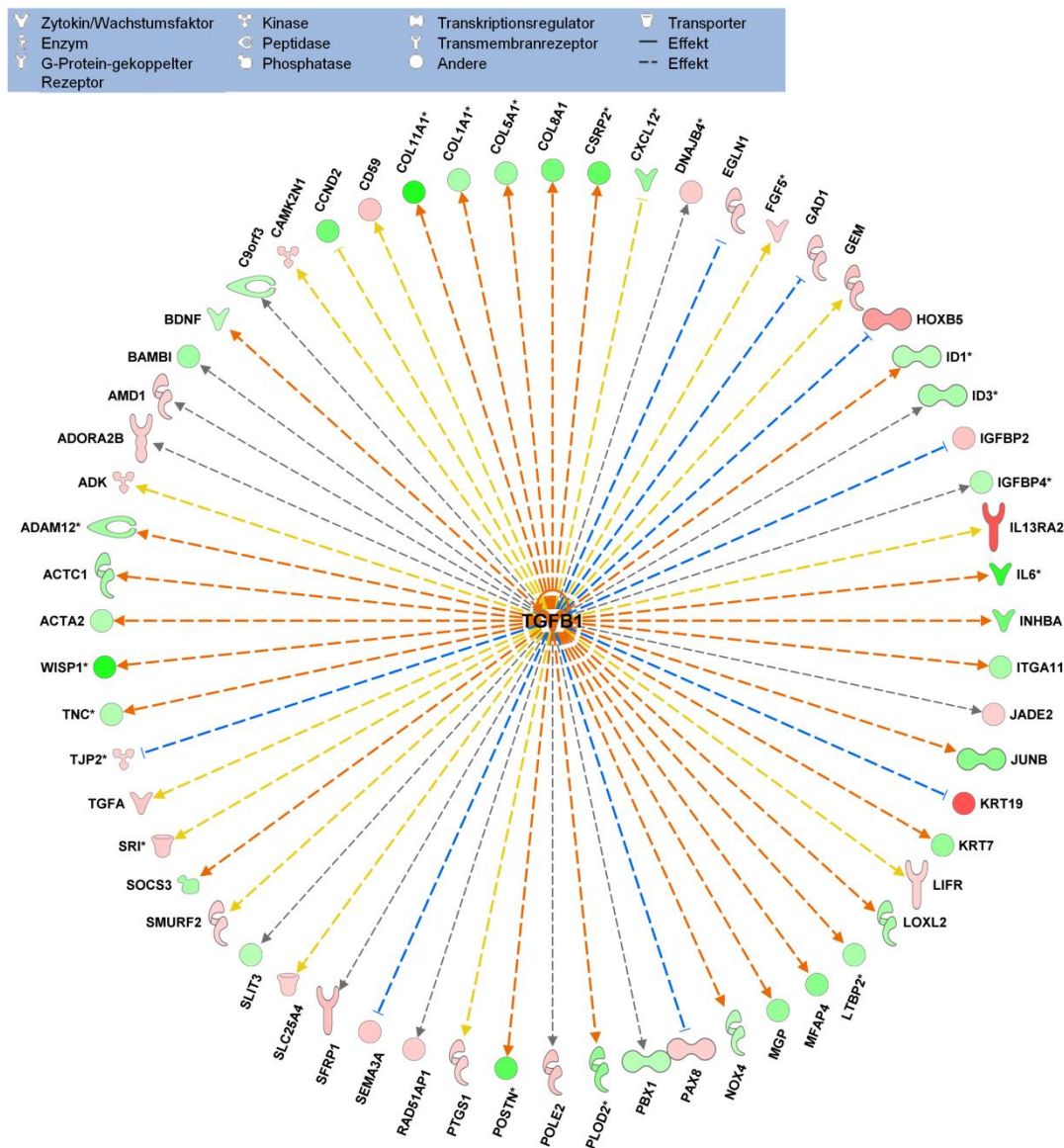


Abb. 17 Molekulares Netzwerk um den „upstream regulator“ TGFβ1, identifiziert mittels Ingenuity. Die Farbintensitäten der Symbole zeigen das Ausmaß der differentiellen Expression, wobei die Farbe Rot für in BRCA1<sup>mosMe</sup> niedriger exprimierte und Grün für in BRCA1<sup>mosMe</sup> höher exprimierte Gene steht. Sterne markieren Gene, deren Expression sich in BRCA1<sup>mosMe</sup> vs. BRCA1<sup>wt</sup> signifikant unterscheidet, wobei hier der Durchschnitt aller ProbeSets pro Gen berücksichtigt wurde. Orangene Pfeile stehen für aktivierende, blaue Pfeile für inhibierende molekulare Beziehungen. Gelbe Pfeile zeigen eine Inkonsistenz zwischen vorhergesagtem Effekt sowie gemessener Expression des Zielmoleküls an. Graue Pfeile stehen für unbekannte Beziehungen zwischen Regulator und Zielmolekül.

Darüber hinaus erschien auch der Transkriptionsfaktor TWIST1 mit einem p-Wert von  $8,2 \times 10^{-6}$  als potenziell vorgeschalteter Regulator (Tab. 19). Bis auf eine Ausnahme entsprach hier das Expressionsverhalten der Zielmoleküle dem vorhergesagten Expressionsverhalten. Unter den 11 Zielmolekülen von TWIST1 befanden sich vier, die bereits bei der vorhergehenden Literaturrecherche (Tab. 18) als CAF-Schlüsselproteine identifiziert worden waren, nämlich COL1A1, CXCL12, IL6 und ACTA2 (Abb. 19).

Viele der in der Ingenuity Analyse vorhergesagten vorgeschalteten Regulatoren spielen bekanntermaßen eine Rolle bei der Induktion und Aufrechterhaltung des CAF-Zustandes. So sind zum Beispiel TGF- $\beta$  sowie TWIST1 sowohl an der metabolischen als auch an der phänotypischen Reprogrammierung von normalen Fibroblasten zu CAFs beteiligt [272, 273]. FGF2 spielt darüber hinaus eine Rolle bei der Kommunikation von CAFs und Tumorzellen [274]. Alle drei Regulatoren haben dabei z.B. *CXCL12* und *COL1A1* als transkriptionelles Zielgen gemeinsam. Zusammenfassend stützen die Ergebnisse der „Ingenuity upstream regulator“ Analyse die hypothetische Annahme, dass das transkriptionelle Programm von CAFs auch in den untersuchten *BRCA1*<sup>mosMe</sup> Fibroblasten zu finden ist, wenn diese mit *BRCA1*<sup>wt</sup> verglichen werden.

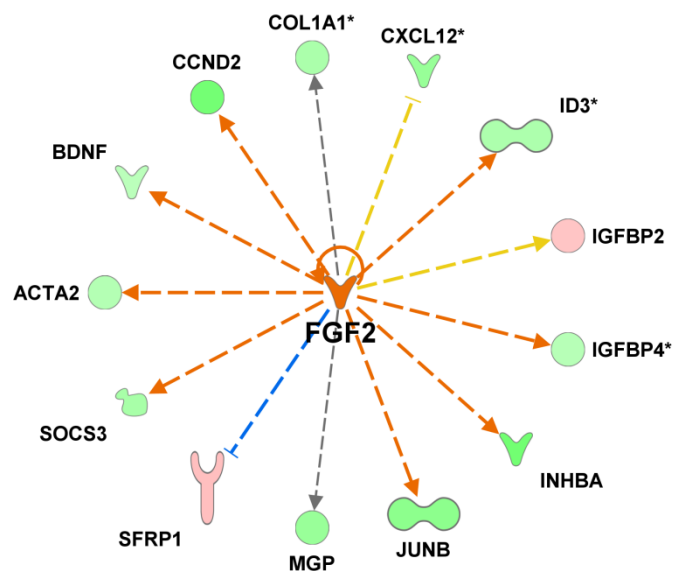


Abb. 18 Molekulares Netzwerk um den „upstream regulator“ FGF2, identifiziert mittels Ingenuity. Für Legende und Farbkodierung siehe Abb. 17.

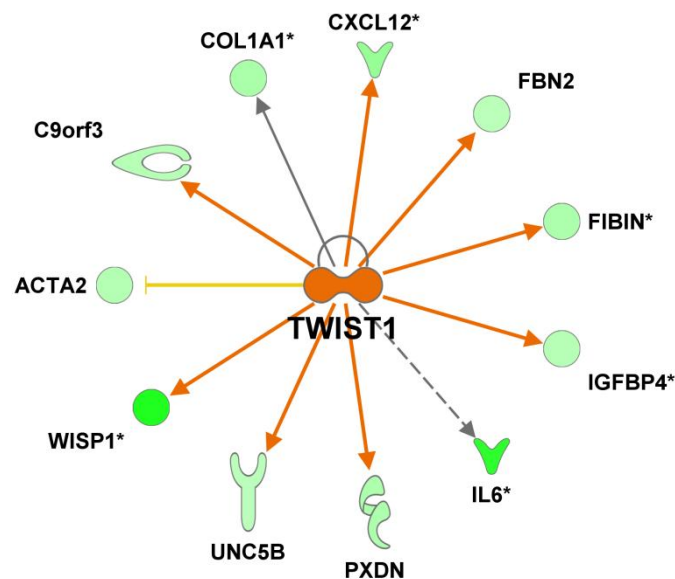


Abb. 19 Molekulares Netzwerk um den „upstream regulator“ TWIST1, identifiziert mittels Ingenuity. Für Legende und Farbkodierung siehe Abb. 17.

### 3.4 Komparative zellbiologische und funktionelle Charakterisierung der $BRCA1^{mosMe}$ vs. $BRCA1^{wt}$ Fibroblasten hinsichtlich CAF-typischer Eigenschaften

#### 3.4.1 Analyse der Proliferationsgeschwindigkeit mittels CellTiter-Glo<sup>®</sup> Lumineszenz-Zellviabilitätsassay

Im Weiteren sollte untersucht werden, ob  $BRCA1^{mosMe}$  Fibroblasten außer dem transkriptionellen Profil auch typische zellbiologische Eigenschaften von CAFs besitzen. Da ein erhöhter proliferativer Index ein Merkmal ist, das CAFs aller Quellen gemeinsam haben, wurde das *in vitro* Proliferationsverhalten von  $BRCA1^{mosMe}$  Fibroblasten untersucht und mit dem der isogenen Kontrollfibroblasten  $BRCA1^{wt}$  verglichen. Es wurden Wachstumskurven über 10 Tage erstellt, indem täglich die Quantität lebender Zellen mit dem CellTiter-Glo<sup>®</sup> Lumineszenz-Viabilitätstest bestimmt wurde. Dieses Experiment wurde jeweils mit Fibroblastenkulturen der Passagen 6 und 11 durchgeführt.

Für Fibroblasten der Passage 6 zeigte sich ab Tag 3 bereits eine signifikant stärkere Proliferation der  $BRCA1^{mosMe}$  Fibroblasten im Vergleich zu  $BRCA1^{wt}$  Fibroblasten (Abb. 20A). Für Fibroblasten der Passage 11 wurde dieser signifikante Wachstumsvorsprung sogar schon am zweiten Tag des Experiments evident (Abb. 20B). Die Unterschiede in der Proliferation vergrößerten sich für Zellen beider Passagen im



Laufe des Experiments. Am Tag 10 des Experiments wurde ein RLU-Signal (normalisiert) gemessen, das für  $BRCA1^{mosMe}$  Fibroblasten im Vergleich zu  $BRCA1^{wt}$  Fibroblasten um 157 (Passage 6) bzw. 185 (Passage 11) Prozentpunkte höher lag. Sowohl  $BRCA1^{mosMe}$  als auch  $BRCA1^{wt}$  Fibroblasten der Passage 11 proliferierten langsamer als die der früheren Passage 6. Auffällig war jedoch, dass  $BRCA1^{mosMe}$  Fibroblasten nach dem mikroskopisch bestätigten Erreichen einer Konfluenz in den Wachstumsgefäßen weiterhin ein exponentielles Wachstum fortführten. Es war keine Kontaktinhibition zu erkennen, so wie es für Fibroblasten zu erwarten wäre.

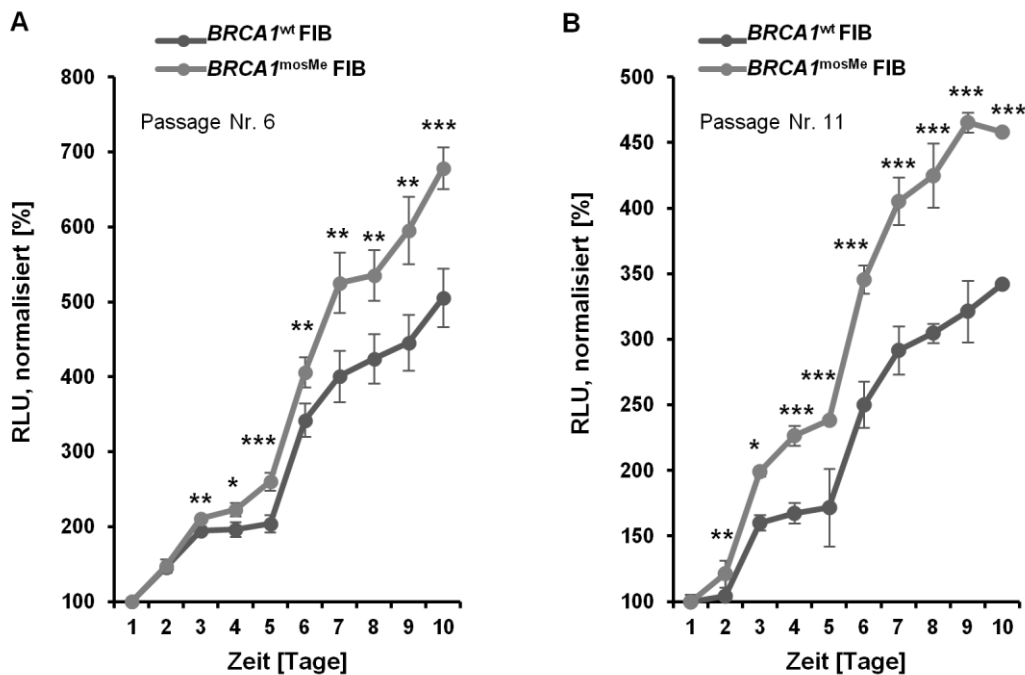


Abb. 20 10-tägige Wachstumskurven der  $BRCA1^{mosMe}$  und  $BRCA1^{wt}$  Fibroblasten der Zellkulturpassagen 6 und 11. Die relative Zahl lebender Zellen wurde mittels CellTiter-Glo<sup>®</sup> Lumineszenz-Zellviabilitätsassay photometrisch bestimmt. Dargestellt sind die RLU (relative light units)  $\pm$ SEM (Standardfehler des Mittelwertes) normalisiert auf die Messwerte des Kontrollansatzes von Tag 0 des Experimentes. Die Anzahl der gemessenen Replikate beläuft sich auf  $n=6$ . Die statistische Auswertung erfolgte mittels Studentischem  $t$ -Test mit \* $p < 0,005$ , \*\* $p < 0,0005$ , \*\*\* $p < 0,00005$ .

### 3.4.2 Analyse des Proliferationsverhaltens mittels Immunfluoreszenzfärbung von Ki-67

Darüber hinaus wurde das Proliferationsverhalten von  $BRCA1^{mosMe}$  und  $BRCA1^{wt}$  Fibroblasten auch mittels immunhistochemischer Detektion des Proteins Ki-67 analysiert. Dieses Protein ist während der aktiven G(1)-, S-, G(2)- und M-Phase des Zellzyklus den Chromosomen angelagert und kann zu dieser Zeit detektiert werden. Während der G(0)-Phase von ruhenden Zellen ist es jedoch nicht nachweisbar [275]. Im

Gegensatz zur Wachstumsanalyse mittels CellTiter-Glo<sup>®</sup> Lumineszenz-Zellviabilitätsassay, bei dem von der Zahl lebender Zellen auf die Wachstumsgeschwindigkeit geschlossen wird, kann mit diesem Verfahren die Wachstumsfraktion einer Zellpopulation direkt bestimmt werden.

Abb. 21 zeigt ein repräsentatives Ergebnis einer Ki-67 Färbung von  $BRCA1^{mosMe}$  und  $BRCA1^{wt}$  Fibroblastenkulturen. In dem zufällig gewählten Bildausschnitt waren für  $BRCA1^{wt}$  Fibroblasten keine eindeutig Ki-67-positiven Zellen nachzuweisen, wohingegen drei  $BRCA1^{mosMe}$  Fibroblasten eine Ki-67-Färbung aufwiesen.

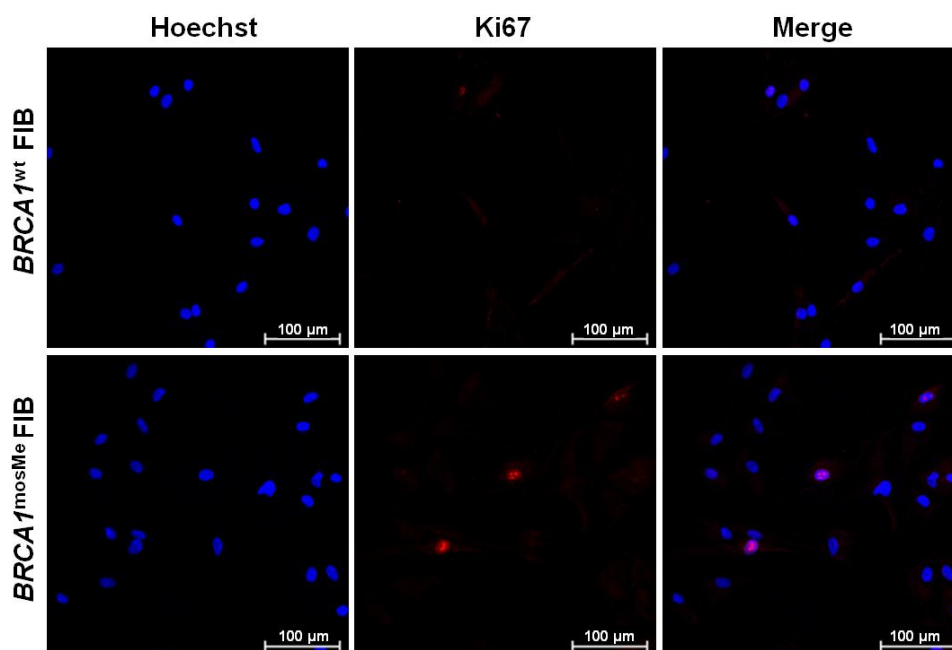
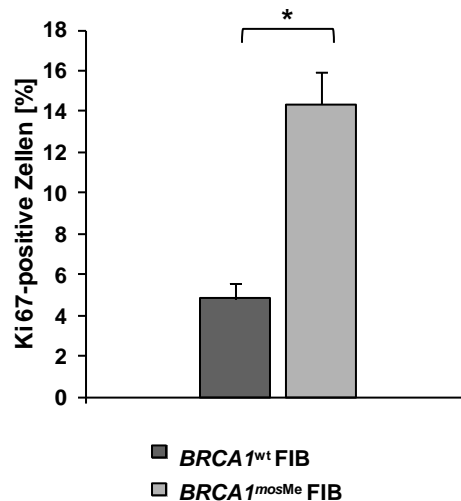


Abb. 21 Repräsentative Aufnahme einer indirekten Immunfluoreszenzfärbung des Kernantigens Ki-67 (rot) an  $BRCA1^{mosMe}$  vs.  $BRCA1^{wt}$  Fibroblasten. Zur Orientierung wurden die Zellkerne mit Hoechst 33342 angefärbt (blau).

Nach statistischer Auswertung von insgesamt mindestens 105 Zellen pro Probe ergab sich für  $BRCA1^{wt}$  ein proliferativer Index von 0,05 und für  $BRCA1^{mosMe}$  ein Wert von 0,14. Daraus errechnete sich für  $BRCA1^{mosMe}$  ein fast 3-fach höherer Anteil von proliferierenden Zellen im Vergleich zu  $BRCA1^{wt}$  (Abb. 22). Der Unterschied erwies sich mit einem p-Wert=0,02 als statistisch signifikant



**Abb. 22** Statistische Auswertung der Ki-67-Immunfluoreszenzfärbung an  $BRCA1^{mosMe}$  vs.  $BRCA1^{wt}$  Fibroblasten. Es wurden 3 unabhängige Experimente mit jeweils mindestens 32 auswertbaren Zellen in die Analyse einbezogen. Die Gesamtzahl der ausgewerteten Zellen belief sich für  $BRCA1^{mosMe}$  auf 129 und für  $BRCA1^{wt}$  auf 105. Werte sind dargestellt als Mittelwert  $\pm$ SEM. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Studentischem t-Test mit  $*p < 0,05$ .

### 3.4.3 Zellzyklusanalyse mittels “fluorescence-activated cell sorting” (FACS)

Sowohl die Ergebnisse des CellTiter-Glo<sup>®</sup> Lumineszenz-Zellviabilitätsassay als auch die der Ki-67-Färbung bestätigten eindeutig ein im Vergleich zu  $BRCA1^{wt}$  beschleunigtes Wachstumsverhalten der  $BRCA1^{mosMe}$  Fibroblasten und einen erhöhten proliferativen Index. Um die damit potenziell assoziierten Veränderungen des Zellzyklusverlaufs nachzuweisen, wurde eine Zellzyklusanalyse mittels FACS unter DNA-Färbung mit Propidiumiodid durchgeführt. Die Rohdaten wurden einer Prozessierung mit der Software ModFit LT 4.1 unterzogen, um die Zellzyklusphasen zu identifizieren und quantifizieren. Auf Grund des limitierten Untersuchungsmaterials konnte die Analyse nicht ausreichend oft repliziert werden um eine statistische Auswertung zu ermöglichen. Die Analyse erfolgte daher rein deskriptiv.

Nach Analyse von insgesamt 10000 Zellen pro Probe war kein deutlicher Unterschied in der G1-Phasen-Zellfraktion zwischen  $BRCA1^{wt}$  und  $BRCA1^{mosMe}$  Fibroblasten nachweisbar (81,52 % vs. 79,91%, Abb. 23). Der Anteil der Zellen, die sich in der S-Phase befanden, war mit 15,02% für  $BRCA1^{wt}$  Fibroblasten höher als für  $BRCA1^{mosMe}$  Fibroblasten mit 11,01%. Die Beobachtungen entsprachen nicht den Erwartungen, da vor dem Hintergrund der schnelleren Proliferation und höheren Ki-67-Indices in  $BRCA1^{mosMe}$  Fibroblasten eine gegenteilige Datenlage plausibel gewesen wäre. Der Anteil der Zellen in der G2-Phase war in  $BRCA1^{mosMe}$  Fibroblasten mit 9,08% höher als in  $BRCA1^{wt}$  mit 3,46%. Diese Beobachtung war kongruent mit bereits bestehenden

Studien die für *BRCA1*-defiziente Zellen eine Akkumulation in der G2/M-Phase des Zellzyklus beschrieben haben. Unterschiede in der Granularität und Zellgröße waren in der FACS-Analyse nicht darstellbar.

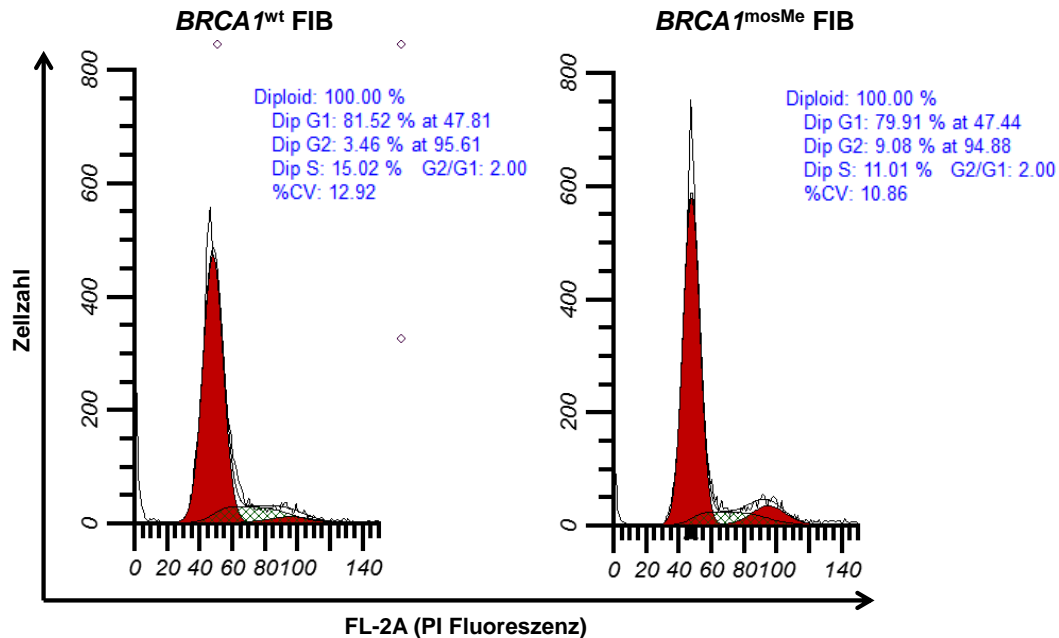
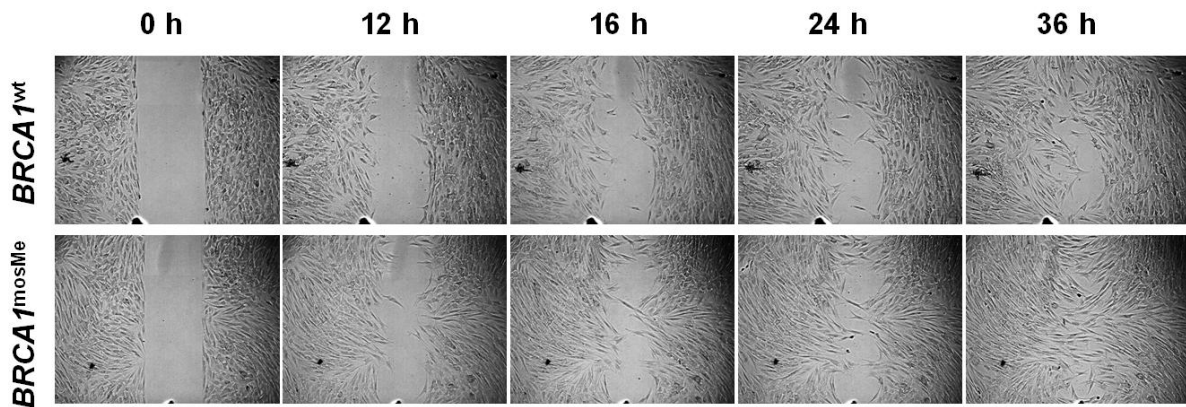


Abb. 23 Zellzyklusanalyse der *BRCA1*<sup>mosMe</sup> vs. *BRCA1*<sup>wt</sup> Fibroblasten mittels FACS nach Propidiumiodid-Färbung. Das Datenfitting erfolgte mit Hilfe der Software ModFit LT 4.1.

### 3.4.4 Untersuchung zum *in vitro* Migrationsverhalten

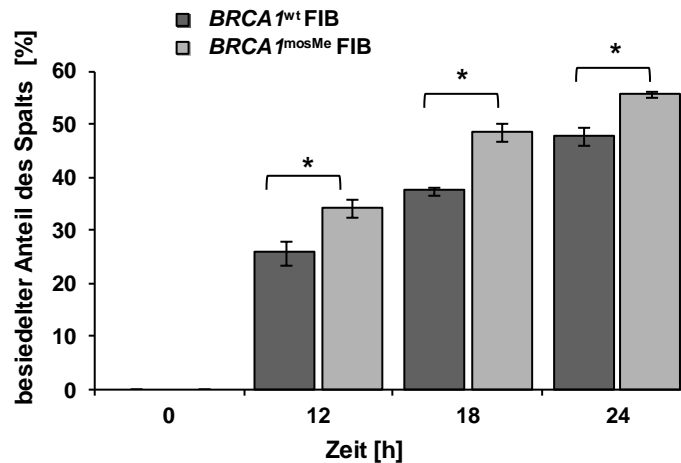
Es ist aus der Literatur bekannt, dass CAFs oder mit Krebszellen ko-kultivierte Fibroblasten *in vitro* ein charakteristisches Migrationsverhalten zeigten, das sich durch erhöhte Motilität sowie ein kollektives Migrationsmuster auszeichnet [276, 277]. Das *in vitro* Migrationsverhalten von *BRCA1*<sup>mosMe</sup> und *BRCA1*<sup>wt</sup> Fibroblasten wurde unter Zuhilfenahme von IBIDI-Zellkultureinsätzen untersucht (Abb. 24 und Abb. 25). Vorteile dieses Verfahrens gegenüber dem konventionellen Scratch-Assays ist die vollständige Reproduzierbarkeit des Migrationsspalts in Größe und Form. Außerdem wird die Zerstörung von Zellen mit Freisetzung von potenziell migrationsmodulierenden Substanzen vermieden, die zwar bei Untersuchungen der Wundheilung jedoch nicht bei reinen Migrationsanalysen erwünscht ist.



**Abb. 24** Repräsentatives Ergebnis für IBIDI-Migrationsassays der  $BRCA1^{mosMe}$  vs.  $BRCA1^{wt}$  Fibroblasten. Im Laufe des Experiments wurde zu den angegebenen Zeitpunkten der Migrationsfortschritt photomikroskopisch dokumentiert. Mit Hilfe von Markierungen an den Zellkulturgefäßen wurde gewährleistet, dass zu jedem Zeitpunkt übereinstimmende Bildausschnitte aufgenommen wurden.

Das Migrationsverhalten der  $BRCA1^{mosMe}$  und  $BRCA1^{wt}$  Fibroblasten wurde für 36 h beobachtet, wobei am Ende des Experiments der Migrationsspalt fast vollständig gefüllt war. Der größte Unterschied in der Migration zwischen  $BRCA1^{mosMe}$  und  $BRCA1^{wt}$  Fibroblasten konnte zum Zeitpunkt 18 h beobachtet werden und betrug 11,18% Prozentpunkte. Die Unterschiede in der Migration zwischen  $BRCA1^{mosMe}$  und  $BRCA1^{wt}$  waren zu allen analysierten Zeitpunkten nur moderat ausgeprägt jedoch signifikant. Da kein Proliferationsinhibitor verwendet wurde, kann jedoch nicht abschließend geklärt werden, ob der hier gezeigte Effekt tatsächlich auf eine erhöhte Motilität zurückzuführen ist oder durch eine Kombination aus verstärkter Proliferation und Motilität von  $BRCA1^{mosMe}$  Fibroblasten zu erklären ist.

Zusätzlich zu den Unterschieden in der Geschwindigkeit der Migration sind in  $BRCA1^{mosMe}$  und  $BRCA1^{wt}$  auch differierende Migrationsmuster zu erkennen. Dabei fällt bei  $BRCA1^{mosMe}$  eine vergleichsweise gerichtete Migration der Fibroblasten als Migrationskollektiv auf. Dies ist insbesondere zu den Zeitpunkten 24 h und 36 h an der der Migrationsfront zugewandten Orientierung der Zellen im Verband zu beobachten. Das Migrationsmuster der  $BRCA1^{wt}$  Fibroblasten hingegen stellt sich eher diffus ohne einheitliche Orientierung des Zellverbandes dar.



**Abb. 25** Statistische Auswertung des IBIDI-Migrationsassay der  $BRCA1^{mosMe}$  vs.  $BRCA1^{wt}$  Fibroblasten. Die Analyse der Migration erfolgte über die automatische Messung der besiedelten Fläche des Migrationsspaltens mittels ImageJ unter Zuhilfenahme des Plug-Ins „Scratch Assay Analyzer“ von MiToBo. Für den Zeitpunkt 36 h konnte keine zuverlässige automatische Auswertung durchgeführt werden. Werte sind dargestellt als Mittelwert  $\pm$  SEM. Die Anzahl der gemessenen Replikate beläuft sich auf  $n=3$ . Die statistische Auswertung erfolgte mittels Studentischem  $t$ -Test mit  $*p<0,05$ .

### 3.4.5 Untersuchung des Aktin-Zytoskeletts mittels Phalloidin-Fluoreszenzfärbung

Die wichtigsten Aufgaben des Proteins Aktin sind die Stabilisierung, Adhäsion und Fortbewegung der Zelle sowie die Regulation der Proliferation. Dabei spielt auch das Signaltransduktionsprotein Paxillin eine Rolle, das innerhalb fokaler Adhäsionkomplexe akkumuliert, die das Aktingerüst mechanisch in das Substrat verankern. Das Anfärben von fibrillärem Aktin (F-Aktin) mittels Phalloidinfärbung in Kombination mit dem immunhistochemischen Nachweis von Paxillin gilt als geeignetes Instrument zur unterstützenden Darstellung der diesen Prozessen zugrundeliegenden morphologischen Veränderungen.

Sowohl F-Aktin als auch Paxillin konnten erfolgreich in  $BRCA1^{mosMe}$  und  $BRCA1^{wt}$  Fibroblasten histochemisch angefärbt werden (Abb. 26). Dabei ergab sich ein zwischen beiden Kulturen deutlich unterschiedliches Erscheinungsbild.  $BRCA1^{mosMe}$  Fibroblasten zeigten ein stark organisiertes Aktin-Skelett mit charakteristischen F-Aktin-Stressfasern, die sich parallel durch den gesamten Zellkörper zogen. Im Gegensatz dazu erschien das Immunfluoreszenzsignal für F-Aktin in  $BRCA1^{wt}$  Fibroblasten insgesamt schwächer, ohne distinkte Orientierung und vornämlich der Zellmembran angelagert.

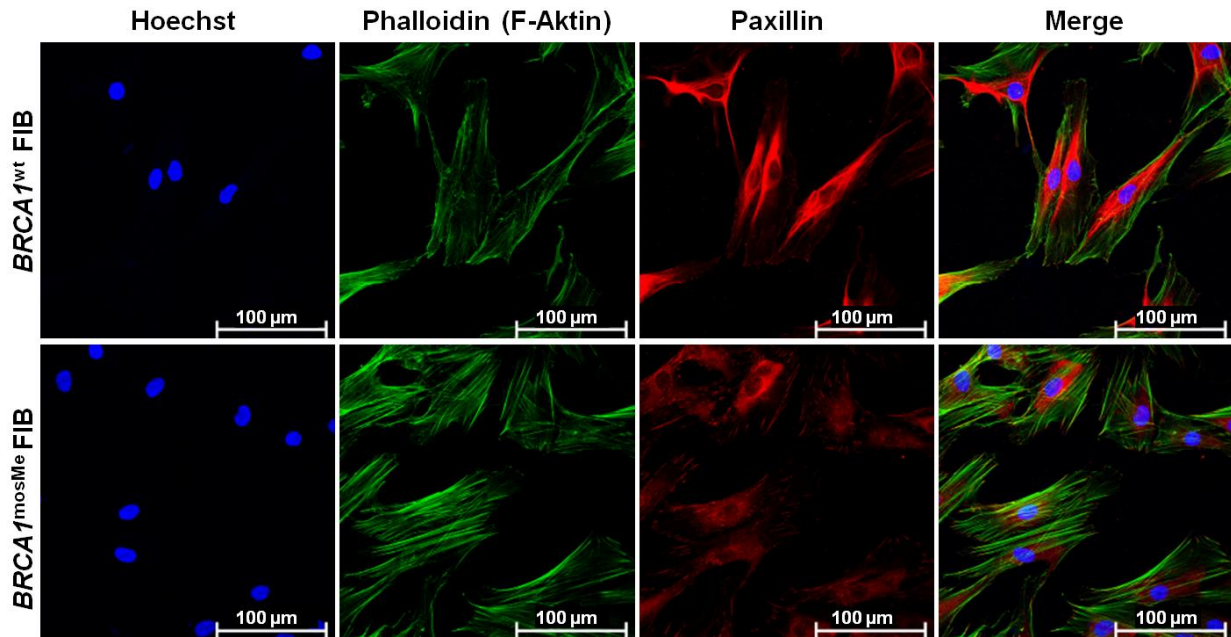


Abb. 26 Repräsentative Aufnahme einer Phalloidinfärbung von F-Aktin (grün) und indirekten Immunfluoreszenzfärbung von Paxillin (rot) an  $BRCA1^{mosMe}$  vs.  $BRCA1^{wt}$  Fibroblasten. Zur Orientierung wurden die Zellkerne mit Hoechst 33342 angefärbt (blau).

Das Signal der Paxillin-Färbung hingegen war in  $BRCA1^{wt}$  Fibroblasten stärker ausgeprägt, insbesondere im Nukleus-nahen Bereich (Abb. 26). Im Gegensatz dazu akkumulierte das Paxillin-Signal in  $BRCA1^{mosMe}$  Fibroblasten verstärkt an den Enden der F-Aktin-Stressfasern.

### 3.4.6 Indirekte Immunfluoreszenzfärbung von Kollagen I in $BRCA1^{mosMe}$ und $BRCA1^{wt}$ Fibroblasten

Das Expressionsprofil von  $BRCA1^{mosMe}$  Fibroblasten zeigte im Vergleich zu  $BRCA1^{wt}$  Fibroblasten eine massiv erhöhte mRNA-Expression von für unterschiedliche Kollagene kodierende Gene. Da insbesondere Typ I Kollagen als Marker für einen aktivierten Zustand von Fibroblasten gilt, sollte die Expression dieses Proteins im nächsten Schritt mittels Immunfluoreszenzfärbung analysiert werden. Verwendet wurde ein anti-Kollagen-I-Antikörper, der gegen das native Protein gesamter Länge produziert worden war. Folglich sollte sowohl Prokollagen I als auch prozessiertes Kollagen I von diesem erkannt werden können.

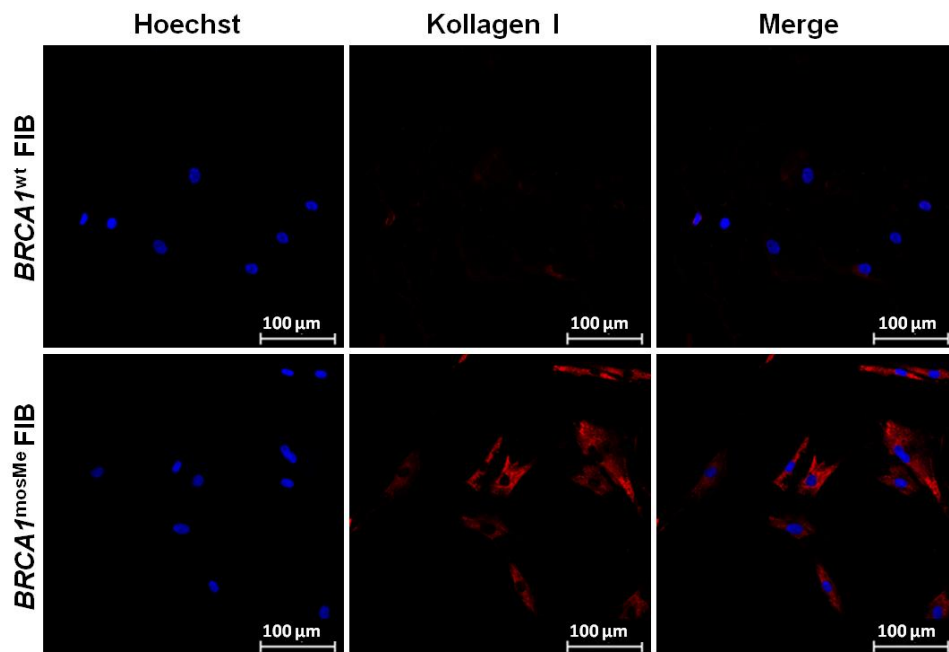


Abb. 27 Repräsentative Aufnahme einer indirekten Immunfluoreszenzfärbung von Typ I Kollagen (rot) an  $BRCA1^{mosMe}$  vs.  $BRCA1^{wt}$  Fibroblasten. Zur Orientierung wurden die Zellkerne mit Hoechst 33342 angefärbt (blau).

In beiden Fibroblastenkulturen konnte spezifisch Kollagen I detektiert werden, wobei das Signal für  $BRCA1^{wt}$  Fibroblasten sehr schwach war und nah an der Detektionsgrenze lag (Abb. 27). Auf Grund der größtenteils intrazellulären Lokalisation war davon auszugehen, dass es sich bei dem detektierten Protein hauptsächlich um Prokollagen I handelte. Extrazelluläres fibrilläres Kollagen I war nur in Ansätzen und nur in  $BRCA1^{mosMe}$  Fibroblasten zu erkennen, was allerdings bei der Immunfluoreszenz von primären Fibroblasten im lockeren Zellverbund nicht anders zu erwarten war. Das Signal akkumulierte um den Zellkern herum und war in der Peripherie der Zellkörper vollständig abwesend.

Die Menge an intrazellulärem Kollagen I war in  $BRCA1^{mosMe}$  Fibroblasten im Vergleich zu  $BRCA1^{wt}$  Fibroblasten sehr stark erhöht. Diese Ergebnisse zeigen, dass sich die aberrante Hochregulation der Kollagene in  $BRCA1^{mosMe}$  Fibroblasten bis auf Proteinebene niederschlägt und so potenziell zu einer veränderten Architektur der EZM führen kann.



### 3.4.7 Quantifizierung von sezernierten Ketonkörpern im Zellkulturüberstand von $BRCA1^{mosMe}$ und $BRCA1^{wt}$ Fibroblasten

CAFs sezernieren auf Grund einer metabolischen Umprogrammierung mehr Ketonkörper als normale Fibroblasten. Benachbarte Krebszellen nutzen diese als leicht zu verwendende Energiequelle. Um zu untersuchen, ob sich analog zu CAFs auch  $BRCA1^{mosMe}$  Fibroblasten auf diese Weise von  $BRCA1^{wt}$  unterscheiden, wurde die Menge an Ketonkörpern in Form von  $\beta$ -Hydroxybutyrat im Zellkulturüberstand beider Kulturen bestimmt.

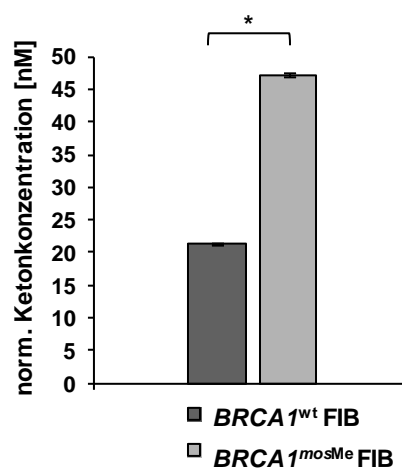


Abb. 28 Ketonkörper-Konzentration in Zellkulturüberständen von  $BRCA1^{mosMe}$  und  $BRCA1^{wt}$  Fibroblasten gemessen mittels kolorimetrischem  $\beta$ -Hydroxybutyrat-Assay. Die Ketonkonzentrationen wurden normalisiert auf  $1 \mu\text{g}$  Gesamtprotein pro Ansatz in einer Vertiefung einer 96-well-Platte. Es wurden jeweils zwei technische Replikate in drei unabhängigen Experimenten analysiert. Dargestellt ist der Mittelwert  $\pm$  SEM. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Studentischem  $t$ -Test mit  $*p < 0,005$ .

Die Konzentration der Ketonkörper im Zellkulturüberstand von  $BRCA1^{mosMe}$  Fibroblasten war im Mittel um das 2,2-fache höher als im Überstand der Kontrollfibroblasten  $BRCA1^{wt}$  (Abb. 28). Das Ergebnis war reproduzierbar und mit einem  $p$ -Wert von 0,002 als statistisch signifikant anzusehen.

### 3.4.8 Zytogenetische Analyse der $BRCA1^{mosMe}$ vs. $BRCA1^{wt}$ Fibroblasten

In unterschiedlichen Zellsystemen konnte gezeigt werden, dass eine  $BRCA1$ -Defizienz zu einer chromosomalen Instabilität führen kann. Um zu analysieren, ob es in  $BRCA1^{mosMe}$  Fibroblasten Hinweise auf chromosomale Rearrangements gibt, die potenziell mit der  $BRCA1$ -Epimutation in Zusammenhang stehen könnten, wurden diese zytogenetisch untersucht.

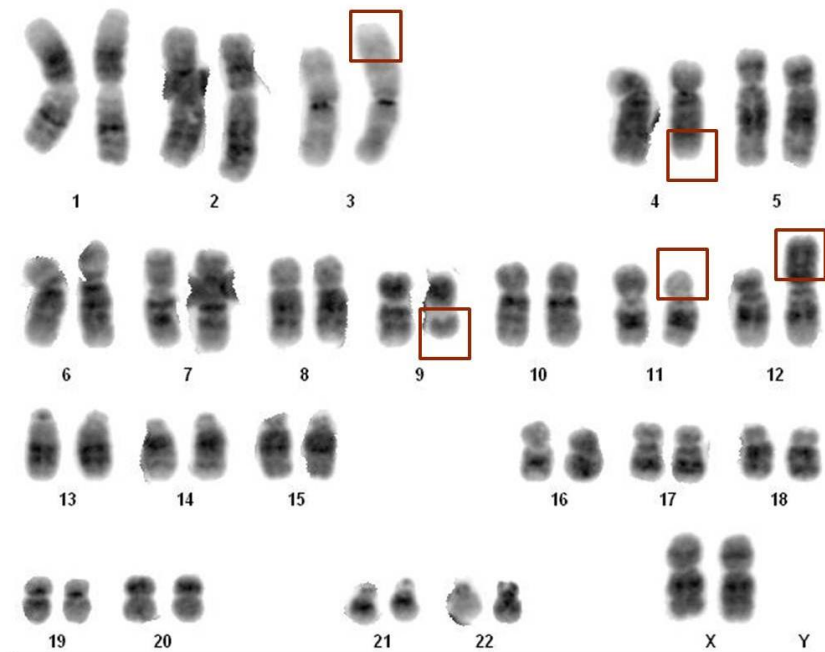
Tab. 20 Statistik der zytogenetischen Analyse der  $BRCA1^{mosMe}$  und  $BRCA1^{wt}$  Fibroblasten.

	Anteil abnormer Metaphasen	Anzahl abnormer Populationen	Karyotypen	#
$BRCA1^{wt}$ Fib.	20% (4/20)	2	46,XX	16
			44,XX,del(2)(q),del(4)(q),-7,-18 *	1
			46,XX,+M	3
$BRCA1^{mosMe}$ Fib.	83,3% (15/18)	8	46,XX	3
			46,XX,der(1),der(1),add(17)(q)	1
			46,XX,add(3)(p),der(4),der(9),der(11),add(12)(p)	7
			46,XX,-4,-5,-6,-12,-15,+5M *	1
			46,XX,t(7,15)(p11,q11),19?	1
			46,XX,del(1)(q),del(3)(p-or-q),-5,-17,+21,+22,+2M	1
			46,XX,add(8)(q),-12,-22,+2M,+ace(12q)	1
			46,XX,del(15)(q22)	1
45,XX,dic(2,12)(q,p)	1			

del=Deletion, M=Markerchromosom, der=derivatives Chromosom, add=zusätzliches Material unbekannter Herkunft, t=Translokation, ace=azentrisch, dic=dizentrisch. Die mit \* markierten Karyotypen sind erfahrungsgemäß auf typische Kultur- und Präparationsartefakte zurückzuführen.

Insgesamt wurden 18 bzw. 20 Metaphasen der  $BRCA1^{wt}$  Fibroblasten und  $BRCA1^{mosMe}$  Fibroblasten analysiert (Tab. 20). Wie zu erwarten, fand sich für 80% der Metaphasen der  $BRCA1^{wt}$  Fibroblasten ein unauffälliger weiblicher Chromosomensatz 46,XX. Lediglich drei Metaphasen zeigten Aberrationen, die in dieser Art häufig durch Kultivierung und Chromosomenpräparation zustande kommen und mit großer Wahrscheinlichkeit Artefakte darstellen.

Unter 18 untersuchten Metaphasen der  $BRCA1^{mosMe}$  Fibroblasten befanden sich nur drei mit unauffälligem Chromosomensatz. 83,3% der Metaphasen wiesen eine Vielzahl chromosomaler Aberrationen auf. Sieben dieser Aberrationsmuster traten jeweils nur in einer einzelnen untersuchten Metaphase auf. Der Karyotyp 46,XX,add(3)(p),der(4),der(9),der(11),add(12)(p) hingegen wurde wiederholt nachgewiesen und fand sich in fast 40% der analysierten Metaphasen. Abb. 29 zeigt exemplarisch eine Metaphase der  $BRCA1^{mosMe}$  Fibroblasten mit dem klonal vorkommenden aberranten Karyotyp.



**Abb. 29 Exemplarische Aufnahme einer G-Bandenfärbung von Metaphase-Chromosomen von  $BRCA1^{mosMe}$  Fibroblasten.** Karyotyp: 46,XX,add(3)(p),der(4),der(9),der(11),add(12)(p). Die roten Kästen markieren chromosomale Rearrangements.

Solch ein wiederholtes Auftreten von multiplen chromosomalen Rearrangements in Kulturen dermaler Fibroblasten wurde in der wissenschaftlichen Literatur bereits beschrieben und als „variegated translocation mosaicism“ bezeichnet [278].

### 3.4.9 Analyse des proliferationsfördernden Effektes von $BRCA1^{mosMe}$ und $BRCA1^{wt}$ Fibroblasten-konditioniertem Medium auf Epithel- und Krebszelllinien

Konditioniertes Medium von CAFs hat *in vitro* einen proliferationsfördernden Effekt auf Epithel- und Krebszelllinien. In den vorangegangenen Experimenten konnte bereits gezeigt werden, dass  $BRCA1^{mosMe}$  Fibroblasten im Vergleich zu  $BRCA1^{wt}$  Fibroblasten Eigenschaften besitzen, die in CAFs für eben diesen Effekt verantwortlich sind. Aus diesem Grund wurde als nächstes untersucht, ob konditioniertes Medium von  $BRCA1^{mosMe}$  Fibroblasten tatsächlich ebenfalls das Wachstum von Epithel- und Krebszelllinien *in vitro* beeinflusst. Als Modellzelllinien wurden HMLE sowie A549 ausgewählt, da diese bereits in Zusammenhang mit CAFs untersucht worden waren und sich als reaktiv für parakrine Signale von Fibroblasten erwiesen haben. Dabei diente HMLE als Modell einer epithelialen, sowie A549 als Model einer kanzerösen Zelllinie.

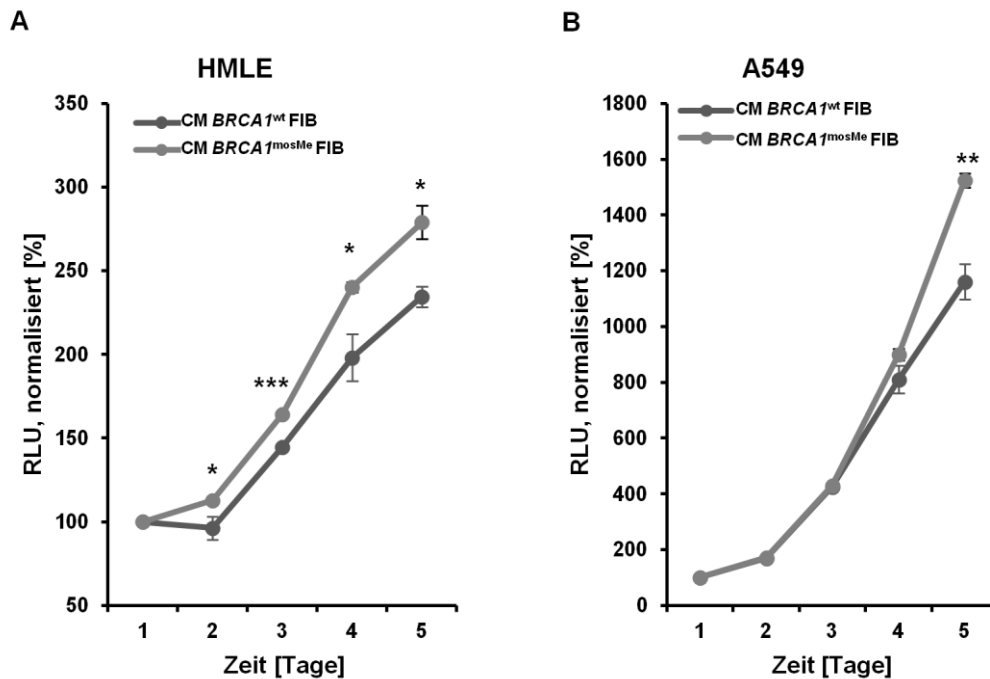


Abb. 30 Proliferationsassay der Zelllinien HMLE und A549 unter Kultivierung in Fibroblasten-konditioniertem Medium von  $BRCA1^{wt}$  und  $BRCA1^{mosMe}$ . Die relative Zahl lebender Zellen wurde mittels CellTiter-Glo<sup>®</sup> Lumineszenz-Zellviabilitätsassay photometrisch bestimmt. Dargestellt sind die RLU (relative light units)  $\pm$ SEM (Standardfehler des Mittelwertes) normalisiert auf die Messwerte des Kontrollansatzes von Tag 0 des Experimentes. Die Anzahl der gemessenen Replikate beläuft sich auf  $n=5$ . Die statistische Auswertung erfolgte mittels Studentschem  $t$ -Test mit  $*p<0,05$ ,  $**p<0,005$ ,  $***p<0,00005$ .

In dem 5-tägigen Experiment wuchsen HMLE unter Einfluss von  $BRCA1^{mosMe}$  konditioniertem Medium schneller als bei  $BRCA1^{wt}$  konditioniertem Medium (Abb. 30). Dabei lagen die gemessenen relativen RLU-Werte für  $BRCA1^{mosMe}$  konditioniertes Medium jeweils 17 bis 44 Prozentpunkte höher. Die Unterschiede waren zu jedem Zeitpunkt der Messung statistisch signifikant. Die in konditioniertem Medium der beiden Kulturen kultivierten A549 Zellen wuchsen bis zum Tag 3 des Experimentes synchron. Ab dem 4 Tag war ein Wachstumsvorsprung der in  $BRCA1^{mosMe}$  konditioniertem Medium kultivierten Zellen gegenüber denen, die in  $BRCA1^{wt}$  konditioniertem Medium kultiviert worden waren, zu verzeichnen. Dieser betrug zum Schluss des Experimentes an Tag 5 422 Prozentpunkte und war mit einem  $p$ -Wert von 0,0007 statistisch signifikant.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass Medium von  $BRCA1^{mosMe}$  verglichen mit  $BRCA1^{wt}$  einen proliferationsfördernden Effekt auf beide untersuchten Zelllinien hatte, wobei der Effekt auf HMLE deutlich größer war. Ob dieser Einfluss ein für die

untersuchten Zelllinien spezifischer ist oder sich auf andere Zelllinien übertragen lässt, ist jedoch nicht beurteilbar.

### 3.5 Separierung des Aberrationsmosaiks durch Einzelzellklonierung der Fibroblastenkulturen $BRCA1^{mosMe}$ und $BRCA1^{wt}$

#### 3.5.1 Klonierungsprozedur und Beobachtungen zur Klonierungseffizienz

Alle bisher gezeigten Ergebnisse wurden durch Analyse der Fibroblastenkultur  $BRCA1^{mosMe}$  generiert. Diese enthält die  $BRCA1$ -Epimutation nicht in allen Zellen, sondern in einem etwa 12%igen Mosaik. Um zu bestätigen, dass die gefundenen molekulargenetischen und zellbiologischen Auffälligkeiten tatsächlich auf die  $BRCA1$ -Epimutation zurückzuführen sind und um diese in einem Aberrations-reinen System weiter zu analysieren, sollten im nächsten Schritt die verschiedenen Zellpopulationen der  $BRCA1^{mosMe}$  Fibroblasten sowie der Kontrollkultur  $BRCA1^{wt}$  durch Einzelzellklonierung separiert werden.

Wie in Kapitel 2.2.1.7 beschrieben, wurde eine Methode zur Einzelzellklonierung entwickelt, die die Klonierung von primären Fibroblasten mit höherer Effizienz als der klassischen Limiting-dilution-Methode erlaubte. Als Ausgangsmaterial wurden jeweils für  $BRCA1^{mosMe}$  und  $BRCA1^{wt}$  junge Kulturen (Passage 4) in ihrer exponentiellen Wachstumsphase verwendet. Pro Kultur wurden jeweils 400 bzw. 200 Deckgläschen mit Zellsuspensionstropfen bestückt und mikroskopisch analysiert (Tab. 21).

Es konnten 133 Deckgläschen mit jeweils einer Zelle für  $BRCA1^{mosMe}$  und 60 für  $BRCA1^{wt}$  mikroskopisch separiert und in 96well-Platten in Kultur genommen werden. Während der ersten Woche zeigten  $BRCA1^{mosMe}$  und  $BRCA1^{wt}$  Fibroblasten ein in etwa vergleichbares Wachstum. In den weiteren Wochen beschleunigte sich das Wachstum einiger Einzelzellklone von  $BRCA1^{mosMe}$  im Vergleich zu  $BRCA1^{wt}$ , sodass diese schneller in größere Kulturgefäße passagiert werden konnten. Nach einer Kultivierungsphase von zwei Wochen erreichten die ersten Einzelzellklone aus  $BRCA1^{mosMe}$  Fibroblasten Konfluenz in der 96-well-Platte und konnten passagiert werden. Nach einem Monat konnten die ersten  $BRCA1^{mosMe}$  Einzelzellklone (EZK) kryokonserviert werden. Insgesamt erreichten 91  $BRCA1^{mosMe}$  EZK Konfluenz in einer 25 cm<sup>2</sup>-Kulturflasche und konnten eingefroren werden. Dies entspricht einer Klonierungseffizienz von 23%.

**Tab. 21 Statistik zur Einzelzell-Klonierungsprozedur der Fibroblastenkulturen  $BRCA1^{wt}$  und  $BRCA1^{mosMe}$**

	$BRCA1^{wt}$ Fibroblasten	$BRCA1^{mosMe}$ Fibroblasten
Anzahl bestückter Deckgläschen	200	400
Anzahl separierter Einzelzellen	60	133
Kultivierungszeit bis erster EZK konfluent in 96well-Platte	15 Tage	12 Tage
Anzahl konfluente EZK in 6well-Platten	10	103
Anzahl kryokonservierte EZK	3	91
Kultivierungszeit bis erster EZK kryokonserviert	54 Tage	28 Tage
Klonierungseffizienz	1,5%	23%

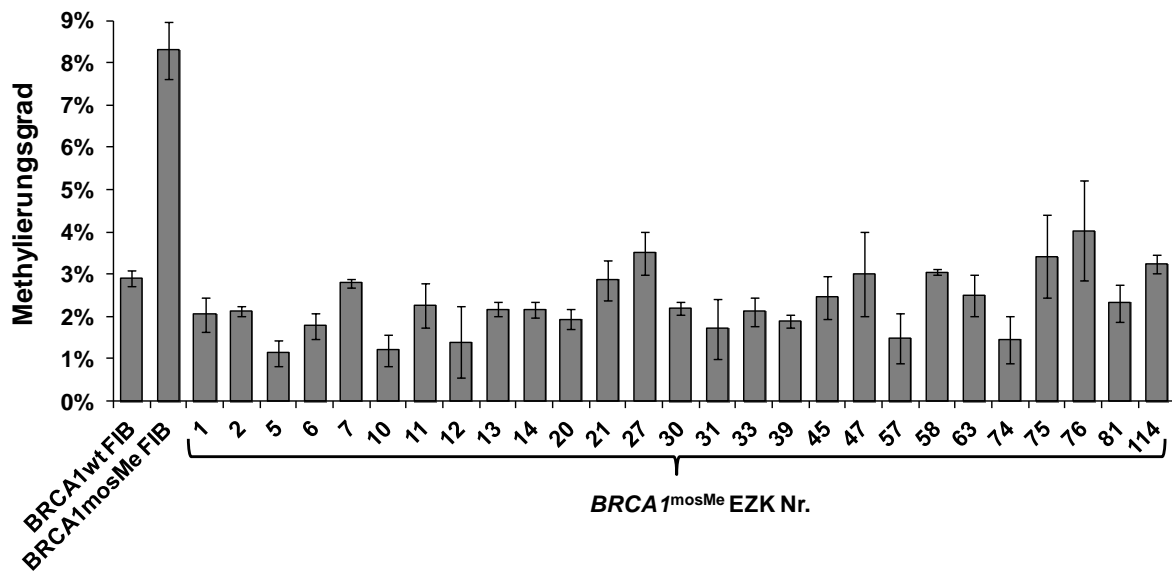
EZK= Einzelzellklon

Viele Einzelzellklone der  $BRCA1^{wt}$  Fibroblastenkultur hingegen stellten das Wachstum wenige Wochen nach Klonierungsbeginn ein und konnten nicht weiter passagiert werden. Das Erreichen der ersten  $BRCA1^{wt}$  EZKs mit einer ausreichenden Zellzahl zur Kryokonservierung dauerte mit 7 Wochen deutlich länger als für  $BRCA1^{mosMe}$  EZK. Insgesamt konnten nur drei EZK der  $BRCA1^{wt}$  Fibroblasten eingefroren werden, wobei diese Kulturen eine sehr langsames Wachstum und größtenteils einen seneszenten Phänotyp aufwiesen. Die Klonierungseffizienz für  $BRCA1^{wt}$  Fibroblasten entsprach demnach nur 1,5%, und war somit deutlich niedriger als für  $BRCA1^{mosMe}$  Fibroblasten.

### 3.5.2 Methylierungsanalyse des $BRCA1$ -Promoters in aus $BRCA1^{mosMe}$ Fibroblasten generierten Einzelzellklonen

Um zu untersuchen, ob die  $BRCA1$ -Epimutation für die überdurchschnittlich gute Klonierbarkeit der  $BRCA1^{mosMe}$  Fibroblastenkultur und das besonders schnelle Wachstum einiger EZK verantwortlich war, wurden 27 repräsentative EZK sowie die Ausgangskulturen  $BRCA1^{mosMe}$  und  $BRCA1^{wt}$  auf den Methylierungsstatus des  $BRCA1$ -Promoters untersucht. Dafür wurden 5 CpGs im Bereich des untranslatierten ersten Exons des  $BRCA1$ -Gens mittels Bisulfit-Pyrosequenzierung analysiert. Die bereits für  $BRCA1^{mosMe}$  Fibroblasten im Vergleich zu  $BRCA1^{mosMe}$  Fibroblasten beschriebene

erhöhte Methylierung konnte in diesem Experiment bestätigt werden. Die Analyse der Einzelzellklone sollte im nächsten Schritt zeigen, ob Klone mit einer heterozygoten *BRCA1*-Epimutation, die rechnerisch etwa 20 bis 25% des Mosaiks ausmachten müssten, separiert worden waren.



**Abb. 31** Methylierungsanalyse des *BRCA1*-Promoters in *BRCA1*<sup>mosMe</sup>, *BRCA1*<sup>wt</sup> Fibroblasten und den aus *BRCA1*<sup>mosMe</sup> gewonnenen Einzelzellklonen. Die Methylierungsgrade (Verhältnis von methylierten zu nicht-methylierten Cytosinen) wurden berechnet als Mittel der Werte aller 5 untersuchten CpG-Stellen. Es wurden drei unabhängige Messungen mit  $n=3$  durchgeführt. Dargestellt sind jeweils der Mittelwert  $\pm$  SEM.

Die Methylierungsgrade der EZK bewegten sich zwischen 1% und 4% und entsprachen somit der für *BRCA1*<sup>wt</sup> Fibroblasten gemessenen Werten (Abb. 31). Es gab keinen Hinweis auf das Vorhandensein eines EZK mit heterozygoter oder homozygoter *BRCA1*-Epimutation.

Da keine Einzelzellklone mit *BRCA1*-Epimutation isoliert worden waren, war eine Charakterisierung der Effekte dieser Aberration in weiteren molekulargenetischen und zellbiologischen Experimenten nicht möglich. Die gewonnenen Einzelzellklone mit normaler *BRCA1*-Promotermethylierung wurden jedoch vor dem Hintergrund einer anderen Fragestellung weiterführend analysiert. Die gewonnenen Ergebnisse sind im Anhang (Kapitel 5) dieser Arbeit kurz zusammengefasst.





---

# 4 Diskussion

Das Tumorsuppressorgen *BRCA1* kodiert für ein aus 1863 Aminosäuren bestehendes multifunktionales Protein, das unter anderem eine Rolle bei DNA-Reparatur, transkriptioneller Regulation, Apoptose, Ubiquitinierung sowie der Zellzyklus-Regulation spielt [153, 279–281]. Mutationen im *BRCA1*-Gen führen, neben einer Erhöhung des allgemeinen Krebsrisikos [167, 282], vor allem zu einer hereditären Form von Brust- und Eierstockkrebs, die durch das lebenszeitlich sehr frühe Auftreten und eine hohe Penetranz gekennzeichnet ist [283]. Es wird vermutet, dass *BRCA1* auch bei der Entstehung sporadischer Tumorarten als treibender Faktor agiert, da in kanzerösem Gewebe häufig somatische Aberrationen und/oder eine epigenetisch vermittelte transkriptionelle Repression des Gens nachgewiesen werden können [284]. Trotz intensiver Forschung konnte der Pathomechanismus der *BRCA1*-assoziierten Kanzerogenese bis heute nicht vollständig aufgeklärt werden. Eine verminderte DNA-Reparatur-Kapazität, die als kausal diskutiert wurde, konnte bisher nur in bereits kanzerös entarteten Zellen jedoch nicht in gesunden primären Zellen genetisch vorbelasteter Individuen bestätigt werden [285–287]. Da sich die Forschungsvorhaben rund um *BRCA1* in den letzten 20 Jahren fast ausschließlich auf Krebszelllinien fokussiert haben, sind die Folgen einer *BRCA1*-Defizienz in Primärzellen aus gesundem Gewebe weitestgehend unerforscht. Neuere Studien zeigen, dass Krebszellen und Tumore nicht als isolierte Entitäten zu betrachten sind, sondern in einer starken Abhängigkeit von ihrer Mikroumgebung, dem größtenteils aus aktivierten Fibroblasten bestehendem Tumorstroma stehen [288]. Erste Experimente zeigen, dass die Umprogrammierung normaler Fibroblasten in solche CAFs durch Repression verschiedener Tumorsuppressorgene, u.a. auch *BRCA1*, möglich ist [46, 289, 290]. Angesichts dieses Konzeptes kommt der Erforschung der Effekte von *BRCA1*-Veränderungen in primären nicht-neoplastischen stromalen Zellen mesenchymalen Ursprungs, so wie Fibroblasten, eine zunehmend bedeutsame Rolle zu. Vor diesem Hintergrund wurde in dieser Arbeit eine umfangreiche Charakterisierung primärer *BRCA1*-defizienter Fibroblasten aus gesundem Gewebe auf molekulargenetischer und

zellbiologischer Ebene vorgenommen, um potenzielle Gemeinsamkeiten zu tumor-nahen Stromalen Zellen wie CAFs aufzudecken .

#### **4.1 Dermale Primärfibroblasten eines monozygoten Zwillingspaars als Untersuchungsmaterial**

Als Untersuchungsmaterial für das experimentelle Vorhaben wurden primäre Hautfibroblasten eines krebsdiskordanten monozygoten Zwillingspaares verwendet.

Fibroblasten sind Hauptbestandteil des Bindegewebes sowie mesenchymaler Herkunft und entstammen somit ontogenetisch aus dem mittleren Keimblatt (Mesoderm). Frisch isolierte dermale Fibroblasten stellen eine homogene Population proliferierender Zellen dar und eigneten sich daher als Material für das hiesige Forschungsvorhaben. Vor allem in den 1990er Jahren wurden Hautfibroblasten von Krebspatienten mit hereditären und sporadischen Tumoren intensiv hinsichtlich ihrer zellbiologischen Eigenschaften wie Proliferation, Migration und morphologischem Phänotyp befohrt [291–294]. Studien, die solche veränderten zellulären Eigenschaften von Fibroblasten mit Mutation spezifischer Tumorsuppressorgene in Zusammenhang bringen, existierten allerdings bis heute nicht.

Das in dieser Arbeit verwendete Material eignete sich ideal zur Untersuchung der durch *BRCA1*-Haploinsuffizienz induzierten Effekte in den Fibroblasten der Probandin mit multiplen Neoplasien, da Fibroblasten ihrer monozygoten Zwillingschwester als isogene Kontrolle zur Verfügung standen. Beide Fibroblastenzelllinien unterschieden sich ausschließlich durch den Methylierungsstatus des *BRCA1*-Promoters [247]. Zwillingsstudien haben sich in der biomedizinischen Forschung fest etabliert [295]. Die besondere Stärke solcher Studien besteht darin, zwischen umweltbedingten und genetischen Auslösern für bestimmte Erkrankungen sowie variabler Penetranz und Expressivität genetischer Erkrankungen differenzieren zu können, ohne dass sehr große Patientenkollektive wie bei Studien mit nicht verwandten Probanden von Nöten sind. Dies gelingt auf Grund der nahezu identischen genetischen Information monozygoter Zwillingspaare. Aus diesem Grund zeigen monogen erbliche Erkrankungen mit vollständiger Penetranz so wie Chorea Huntington oder Neurofibromatose Typ 1 in eineiigen Zwillingspaaren fast 100%ige Konkordanz [296, 297]. Liegt dennoch eine Diskordanz solcher hoch-erblicher monogener Erkrankungen oder Merkmale in einem monozygoten Zwillingspaar vor, so kann dies entweder auf epigenetische Unterschiede

[298] zurückzuführen sein oder auf das Vorliegen einer genetischen Veränderung im Mosaikstatus in einem der Zwillingindividuen [299].

## 4.2 Mosaizismus von *BRCA1*-Aberrationen als Krebsdispositionsfaktor

Das in dieser Arbeit untersuchte Material des Krebs-diskordanten Zwillingspaars ist von besonderem Interesse, da hier sowohl ein somatisches Aberrationsmosaik als auch eine Epimutation in Kombination auftreten. Die *BRCA1*-Epimutation die in etwa 20-25% der Fibroblasten des erkrankten Zwillings zu detektieren war, ist vermutlich in der frühen Embryonalentwicklung nach der Zwillingsteilung entstanden. Auf Grund der Detektion dieser Aberration in Fibroblasten ist davon auszugehen, dass das pathogene Ereignis im mesodermalen Keimblatt stattgefunden haben muss. Da außer Fibroblasten und Saliva keine weiteren Gewebe zur Analyse zur Verfügung standen, konnte keine Aussage über die spezifische Verteilung des Aberrationsmosaiks in verschiedenen Organen der Probandin getroffen werden. Eine selektive und organspezifische Variabilität der *BRCA1*-Epimutationsmosaiks könnte jedoch erklären, warum die Probandin nicht, wie in erster Linie zu erwarten, an *BRCA1*-assoziiertem Brust- oder Eierstockkrebs erkrankte, sondern an einer kindlichen akuten lymphatischen Leukämie und einem Adenokarzinom der Schilddrüse. In einer Metastudie konnte jedoch gezeigt werden, dass pathogene Veränderungen in Genen der *BRCA*-Signalkaskade auch mit einem erhöhten Risiko für bestimmte Formen der Leukämien und Lymphomen einhergehen [168]. Ebenfalls besteht eine Assoziation von *BRCA1*-Mutationen mit Karzinomen der Schilddrüse, da diese häufig in genetisch prädisponierten Individuen als sekundäre Neoplasie auftreten [300].

Zum heutigen Zeitpunkt sind nur zwei Fälle eines konstitutionellen *BRCA1*-Sequenzmutationsmosaiks bekannt [301, 302]. Trotz des geringen Aberrationsgrades von 5% bzw. 30% kam es in beiden Fällen zu einem lebenszeitlich frühen Auftreten von hochgradigem Brusttumoren, die bei dem im Jahr 2012 publizierten Fall sogar synchron und metachron mehrfach auftraten. Dies impliziert, dass das Vorliegen einer Aberration im geringgradigen Mosaik nicht zwangsläufig mit mildereren Krankheitsverläufen verbunden sein muss als in heterozygoten Mutationsträgern. Interessanterweise lassen sich Parallelen zwischen dem in der vorliegenden Arbeit beschriebenen und dem im Jahr 2015 publizierten Fall ziehen. Die Tochter der

beschriebenen Patientin erkrankte im Alter von 18 Monaten an Akuter lymphatischer Leukämie, so wie es für die hier untersuchte Patientin ebenfalls der Fall war.

### 4.3 Einfluss der *BRCA1*-Epimutation auf die Expression

Die in der Pyrosequenzierung gesehene erhöhte Methylierung des *BRCA1*-Promoters in den *BRCA1*<sup>mosMe</sup> Fibroblasten hatte sich bereits im Vorfeld in einem klassischen Bisulfit-Plasmid-Sequenzierungs-Experiment als vollständig methylierte 13 CpGs umfassende Allele dargestellt. Das aberrante Methylierungsmuster konnte somit als echte Epimutation definiert werden, die von stochastischen Methylierungsfehlern zu differenzieren ist.

Eine Hypermethylierung des *BRCA1*-Promoters ist bekanntermaßen ein häufiges Ereignis in der Tumorentstehung. So wird diese in ca. 20% der sporadischen Brusttumore, einem Teil der Ovarialkarzinome sowie in Knochenmark von 38% der von therapieresistenter akuter myeloischen Leukämie betroffener Patienten gefunden [194, 303–305]. Auch konstitutionell vorhandene *BRCA1*-Epimutationen wurden bereits im Vorfeld beschrieben. So konnten bei Patientinnen mit früh auftretendem Brust- oder Ovarialkrebs jedoch ohne *BRCA1/2*-Sequenzmutationen aberrante Methylierungsmuster des *BRCA1*-Promoters im Blut detektiert werden [244, 306, 307], die analog zu Sequenzmutationen als starker Dispositionsfaktor für die Krebsentstehung diskutiert werden.

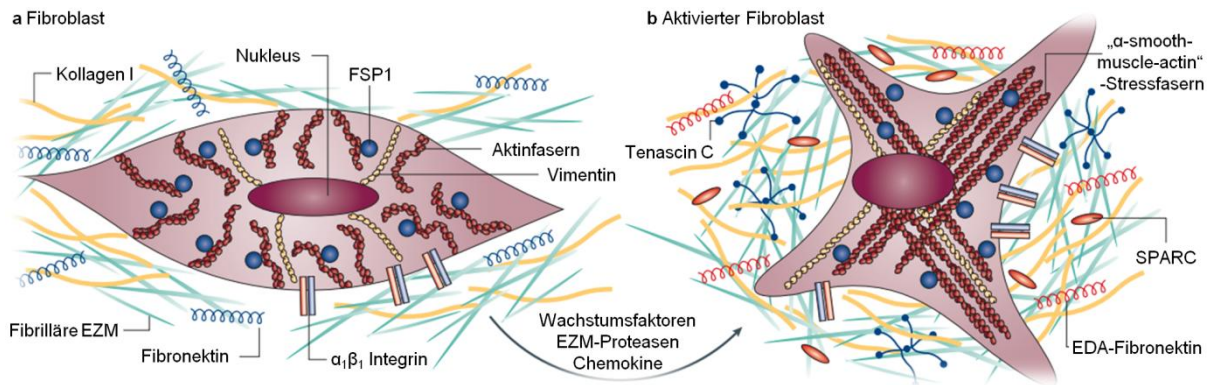
Die epigenetische Stilllegung (Silencing) des *BRCA1*-Promoters ist charakterisiert durch die inverse Korrelation zwischen dem Methylierungsgrad mehrerer aufeinanderfolgender CpG-Stellen und der Genexpression auf mRNA-Ebene [308, 309]. Sowohl in Tumormaterial als auch in Blut von Krebspatienten, bei denen eine Hypermethylierung des *BRCA1*-Promoters detektiert wurde, wird üblicherweise auch eine reduzierte *BRCA1*-Expression auf mRNA-Ebene sowie in vielen Fällen auch auf Proteinebene gefunden [305, 307–310]. Dieser Zusammenhang konnte in der vorliegenden Arbeit ebenfalls für die untersuchten *BRCA1*<sup>mosMe</sup> Fibroblasten bestätigt werden. Hier korrelierte das ~25%ige Epimutationsmosaik verglichen mit den Kontrollfibroblasten *BRCA1*<sup>wt</sup> mit einer um etwa ein Drittel verminderten *BRCA1*-Expression auf mRNA- sowie Proteinebene.

#### 4.4 CAF-spezifisches mRNA-Expressionsprofil in *BRCA1*<sup>mosMe</sup> Fibroblasten

Im Rahmen einer systematischen Charakterisierung der primären *BRCA1*<sup>mosMe</sup> Fibroblasten wurde im ersten Schritt mittels einer Transkriptomanalyse ein Expressionsprofil erstellt und in einem explorativen Verfahren mit publizierten Expressionsdaten anderen Zelltypen verglichen. Dabei zeigte sich eine erstaunliche Übereinstimmung mit Expressionsdaten, die für sogenannte „Cancer-associated fibroblasts“ (CAFs) bzw. Tumor-assoziierte Fibroblasten unterschiedlichen Ursprungs berichtet worden waren. CAFs sind in nächster Umgebung zu Tumoren lokalisiert und fördern sowohl parakrin durch Sekretion tumorogener Substanzen als auch durch Modifikation der extrazellulären Matrix (EZM) deren Wachstum [267]. Neuste Erkenntnisse deuteten darauf hin, dass CAFs bzw. Fibroblasten in CAF-ähnlichem Zustand nicht nur, so wie bisher angenommen, im entarteten Gewebe existieren, sondern auch in gesundem Gewebe krebsprädisponierter Individuen nachweisbar sein können [311]. Aus diesem Grund erschien dieser Ansatzpunkt für das hier bearbeitete Projekt zur Erforschung der Konsequenzen einer *BRCA1*-Epimutation in Fibroblasten aus gesunder Haut reizvoll. Ein detaillierter Abgleich der Expressionsdaten zeigte, dass transkriptionelle CAF-Eigenschaften auch in *BRCA1*<sup>mosMe</sup> Fibroblasten detektiert werden konnten, obwohl diese Zellen aus gesundem nicht-neoplastischem Gewebe entnommen worden waren. Ein großer Anteil derjenigen Gene/Proteine, die in der Literatur als wichtigste Schlüssel-Biomarker für den CAF-Phänotyp beschrieben worden waren, fielen in der Arrayanalyse und/oder in einer RT-qPCR-Analyse als zwischen *BRCA1*<sup>mosMe</sup> und *BRCA1*<sup>wt</sup> Fibroblasten differenziell exprimiert auf (siehe Tab. 18).

Die verstärkte Expression von EZM-Strukturproteinen, die in *BRCA1*<sup>mosMe</sup> Fibroblasten als prägendste Eigenschaft der Expressionssignatur auffiel und unter anderem die Gene *COL11A1*, *COL5A1*, *FLG*, *FN1* und *MGP* betraf, ist eine typische Eigenschaft von CAFs [277, 312]. Vergleichbar mit Myofibroblasten innerhalb einer Wundheilungsreaktion sezernieren CAFs ein fibrilläres Netzwerk bestehend aus Kollagenen, Fibronectin, Proteoglykanen und Glykosaminoglykanen und umhüllen damit das Tumorgewebe [313–315] (siehe Abb. 32). Durch enzymatische Remodellierung der EZM wie zum Beispiel durch kovalente Quervernetzung von Kollagenmolekülen zu Fibrillen entsteht eine desmoplastische Matrix, die sich durch eine einzigartige Steifigkeit auszeichnet. Diese liegt weit über der von normalem

Bindegewebe und beeinflusst entscheidend die Malignität und Metastasierung von Tumoren [316–318].



**Abb. 32 Überblick über die zellulären Veränderungen, die mit der Aktivierung von Fibroblasten einhergehen.** Der aktivierte Zustand ist charakterisiert durch eine verstärkte Expression von Strukturproteinen und einer Verdichtung der EZM. Aktivierte Fibroblasten exprimieren häufig  $\alpha$ -smooth-muscle-actin, was zur Bildung von Stressfibrillen führt und dadurch die Zellmorphologie verändern kann. Abbildung modifiziert nach Kalluri et al. (2006) [312]

Grundvoraussetzung hierfür ist eine stark veränderte Expression von EZM-remodellierenden Enzymen, die folglich als typisches Charakteristikum in CAFs unterschiedlicher Ursprünge gleichermaßen auftritt [269, 270, 319]. Diese konnte in der vorliegenden Arbeit in den Expressionsdaten von  $BRCA1^{mosMe}$  Fibroblasten im Vergleich zu den  $BRCA1^{wt}$  Kontrollfibroblasten ebenfalls beobachtet werden. Dabei waren unter anderem Gene auffällig, die für in der EZM aktive Kollagen-prozessierende Enzyme wie „Lysyl Oxidase-Like 2“, „Procollagen-Lysine, 2-Oxoglutarate 5-Dioxygenase 2“ und „Disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 12“ (LOXL2, PLOD2, ADAM12) kodierten. Eine bioinformatische Analyse mittels des webbasierten Tools „Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery“ (DAVID) bestätigte die stark signifikante Anreicherung EZM-assoziiierter genetischer Ontologien im Expressionsprofil der  $BRCA1^{mosMe}$  Fibroblasten. Die generierten Ergebnisse implizieren, dass  $BRCA1^{mosMe}$  Fibroblasten trotz ihres Ursprungs aus gesunder Haut ähnliches EZM-modulierendes Potenzial besitzen wie Myofibroblasten oder CAFs. Voraussetzung hierfür ist naturgemäß, dass sich die veränderte Expression nicht nur auf transkriptioneller Ebene zeigt sondern sich auch auf Proteinebene niederschlägt. Dies konnte repräsentativ für Typ I Kollagen mittels Immunfluoreszenzfärbung bewiesen werden.

Die bioinformatische Analyse zur Identifizierung möglicher das Transkriptionsprofil bedingender molekularer Effektoren bestätigte die Analogie des Expressionsmusters von *BRCA1*<sup>mosMe</sup> Fibroblasten und CAFs auf einer weiteren Evidenzebene. Als mögliche vorgeschaltete Regulatoren konnten so einige Moleküle identifiziert werden, für die ein Einfluss auf die Bildung und Aufrechterhaltung des CAF-Phänotyps bereits beschrieben wurde, so wie die *TGF-β*-Familie, *TWIST1*, *VEGF*, *FGF2* und *IL6* [269, 273, 312, 320, 321].

TGF-β ist ein Zytokin, das sowohl tumorsupprimierende als auch tumorfördernde Funktionen ausüben kann [322]. Von Tumorzellen in großen Mengen sezerniertes TGF-β triggert durch die Aktivierung des TβRI-Smad-Signalweges die endogene Expression von TGF-β und *CXCL12* und führt dadurch zu der Ausbildung von zwei autokrinen und sich gegenseitig verstärkenden Rückkopplungsschleifen, die entscheidend an der Induktion des CAF-Phänotyps aus NOFs beteiligt sind [323–326]. Sowohl Gene der *TGF-β*-Genfamilie als auch *CXCL12* zeigten in der Transkriptomanalyse der *BRCA1*<sup>mosMe</sup> vs. *BRCA1*<sup>wt</sup> Fibroblasten eine auf das doppelte bis dreifache Niveau erhöhte Expression.

*TWIST1* ist ein Transkriptionsfaktor, der eine essentielle Rolle in der embryonalen Entwicklung von Gewebe mesodermalem Ursprungs spielt. Im Gegensatz zu den meisten gesunden adulten Geweben ist *TWIST1* in epithelialen Krebszellen sowie in CAFs stark exprimiert [273, 327]. In einer aktuellen Studie konnte gezeigt werden, dass die Synthese von *TWIST1* in Fibroblasten eine notwendige und hinreichende Bedingung für die Transdifferenzierung von normalen Fibroblasten (NOFs) zu CAFs darstellt [273]. Das Silencing von *TWIST1* in CAFs resultiert entsprechend in dem Verlust des CAF-Phänotyps und der tumor-fördernden Eigenschaften der Fibroblasten [273]. Die Expression von *TWIST1* in Fibroblasten lässt sich durch Behandlung mit dem proinflammatorischen Zytokin IL6 induzieren und resultiert wiederum in der transkriptionellen Aktivierung des Chemokins *CXCL12*. IL6 zeigte in *BRCA1*<sup>mosMe</sup> Fibroblasten im Vergleich zu *BRCA1*<sup>wt</sup> Fibroblasten eine starke Hochregulation.

Zum heutigen Zeitpunkt existiert nur eine einzige weitere Studie in der eine CAF-ähnliche Expressionssignatur in Fibroblasten aus gesunder Haut nachgewiesen werden konnte. Das dabei analysierte Material stammte von Personen, die durch eine Mutation im Tumorsuppressorgen *PTCH1* eine genetische Prädisposition für Basalzellkarzinome trugen [311]. Da *BRCA1* sowohl mit *PTCH1* als auch mit anderen Genen des Hedgehog-Signalweges regulativ in Beziehung steht [328], kann hier ein konvergenter

Mechanismus in der Induktion des CAF-ähnlichen transkriptionellen Programms durch *BRCA1*- sowie *PTCH1*-Haploinsuffizienz vermutet werden.

Der Vergleich von Genexpressionsmustern primärer unbehandelter Fibroblasten sowie pluripotenter Stammzellen mit und ohne *BRCA1*-Sequenzmutationen zeigte bisher in mehreren Studien im Gegensatz zu der vorliegenden Arbeit keine signifikanten Expressionsunterschiede sowie keine Hinweise auf CAF-spezifische Veränderungen [329–331]. Mögliche Gründe für diese Diskrepanz sind, dass *BRCA1*-Defizienz-spezifische Expressionsveränderungen in Fibroblasten schwer nachzuweisen sind wenn Untersuchungsmaterial von Personen mit unterschiedlichem genetischem Hintergrund sowie unterschiedlichem Alter verglichen werden. Es scheint wahrscheinlich, dass in einem solchen experimentellen Aufbau interindividuelle und altersbedingte Unterschiede einen größeren Einfluss auf die Genexpression haben als die *BRCA1*-spezifischen Veränderungen, sodass diese maskiert werden können. Die Analyse eines Aberrations-diskordanten monozygoten Zwillingspaares, wie in der vorliegenden Arbeit durchgeführt, zeichnet sich aus diesem Grund durch eine stärkere Aussagekraft aus als vergleichbare Studien mit sehr viel größeren genetisch differierten Patientenkollektiven. Außerdem kann nicht ausgeschlossen werden, dass Sequenzmutationen die ein modifiziertes oder trunkiertes *BRCA1*-Protein zur Folge haben, zu einem anderen Expressionsprogramm in Fibroblasten führen als solche Mutationen, die eine erniedrigte Proteinmenge bedingen. Ein gemeinsames signifikantes Expressionsprofil für unterschiedliche Mutationstypen zu erstellen, ist aus diesem Grund naturgemäß schwierig und bedarf vermutlich einer viel größeren Probandenanzahl, als in gegenwärtigen Studien erreicht werden konnte.

## **4.5 Zellbiologischer Vergleich der *BRCA1*<sup>mosMe</sup> vs. *BRCA1*<sup>wt</sup> Fibroblasten hinsichtlich CAF-typischer Eigenschaften**

### **4.5.1 *In vitro* Proliferation**

Die im Rahmen dieser Arbeit generierten Ergebnisse belegen, dass *BRCA1*<sup>mosMe</sup> Fibroblasten eine signifikant stärkere *in vitro* Proliferation aufweisen als *BRCA1*<sup>wt</sup> Fibroblasten. Ein solcher Unterschied wurde auch schon zahlreich für den Vergleich von CAFs und gepaarten NOFs, die z.B. aus den angrenzenden Regionen von Brusttumoren, Zungenplattenepithelkarzinomen sowie Magenkarzinomen isoliert worden waren, beschrieben [332–334]. Interessanterweise wurde eine erhöhte proliferative Kapazität nicht nur in CAFs sondern im Rahmen mehrere Studien in den



80er und 90er Jahren auch in dermalen Fibroblasten aus gesunder Haut von Krebspatienten nachgewiesen [335]. So zeigten Hautfibroblasten von Brustkrebspatienten im Gegensatz zu gesunden Personen keine mit dem Alter des Probanden korrelierende Abnahme des proliferativen Potenzials [336]. Außerdem fiel in Kultur eine geschwächte Kontaktinhibition auf, die zu einer überhöhten Zellsättigung in post-konfluenten Kulturen führte. Diese Besonderheit konnte in der vorliegenden Arbeit ebenfalls bei der Kultivierung von  $BRCA1^{mosMe}$  Fibroblasten beobachtet werden. Analog zu den Ergebnissen der Zellzyklusanalyse von  $BRCA1^{mosMe}$  Fibroblasten konnte in der Studie von Azzarone et al. eine Akkumulation der Zellen in der G2-Phase anstatt eines zu erwartenden erhöhten Anteils an in der S-Phase befindlichen Zellen als potenzieller Grund für das veränderte Wachstumsverhalten gefunden werden [337].

Die Veränderungen des Proliferationsverhaltens und der Zellzyklusverteilung in  $BRCA1$ -haploinsuffizienten Fibroblasten ist mit der Funktion von  $BRCA1$  als Zellzyklusregulator erklärbar [141, 338]. Analog zu dem proliferationssteigernden Effekt der natürlichen  $BRCA1$ -Defizienz in  $BRCA1^{mosMe}$  Fibroblasten wurde ebendieser Effekt in einer immortalisierten Fibroblastenzelllinie beschrieben, in der die  $BRCA1$ -Expression artifiziell durch einen lentiviralen shRNA-Versuchsansatz runterreguliert worden war [289]. Auch in normalen sowie entarteten epithelialen Brustzellen führte eine Inhibierung der  $BRCA1$ -Expression durch Antisense-Oligonukleotide zu einem beschleunigten Wachstum der Zellen [339–341].

#### 4.5.2 *In vitro* Migration

Ebenfalls fiel in  $BRCA1^{mosMe}$  Fibroblasten ein leicht verändertes *in vitro* Migrationsverhalten auf, das sich vor allem durch eine kollektive, gerichtete Konfiguration der Zellen auszeichnete. Ergebnisse aktueller Studien zur Motilität von CAFs zeigen, dass CAFs in der Lage sind, ein kontextspezifisches migratorisches Programm abzuspielen, das durch die Bewegung der Zellen in Zellverbänden innerhalb der Tumormikroumgebung charakterisiert ist [276, 277]. Es wird vermutet, dass dieses Verhalten parakrin durch von Tumorzellen sezernierten Signalen getriggert wird und wiederum kausal mit einem verstärkten metastatischen Verhalten der Krebszellen assoziiert ist [277, 342, 343]. Darüber hinaus berichten andere Studien, dass Hautfibroblasten von Patienten mit hocherblichen Tumoren wie Brustkrebs, Melanomen, Darmkrebs, Retinoblastomen und Wilms-Tumoren auf 3D-Kollagen-Gelmatrizen ein Migrationsverhalten zeigen, das mit ansteigenden Zelldichten verstärkt abläuft, was zwar für tumorigene sowie fetale Fibroblasten, jedoch nicht für normale adulte Fibroblasten typisch ist [344]. Die Detektion dieses abnormen

Migrationsverhaltens in Hautfibroblasten hatte dabei einen starken prädiktiven Wert bezüglich des Auftretens des selben abnormen Verhaltens in Fibroblasten, die aus der Umgebung von Tumoren des selben Patienten entnommen worden waren [344]. Das abnorme migrative Verhalten war ebenfalls in Fibroblasten gesunder Familienmitglieder einiger Brustkrebspatienten zu finden, deren Familienstammbäume eine monogen erbliche Kausalität nahelegten [293, 345]. Während ein migrationssteigernder Effekt eine *BRCA1*-Defizienz in Brustkrebszelllinien bereits gezeigt worden ist, fehlt es noch an Studien zu solchen Einflüssen in primären nicht-neoplastischen Zelltypen [341].

#### 4.5.3 Organisation des Zytoskeletts

Eine weitere für Hautfibroblasten von Krebspatienten bereits beschriebene Auffälligkeit ist das Auftreten von zytoskelettalen Abnormalitäten. Antecol et al. berichteten über eine verstärkte Aktin-Synthese und eine beschleunigte Remodellierung des Aktingerüsts in Fibroblasten von Patienten mit Retinoblastom, Polyposis coli und Basalzellkarzinomen. In einer weiteren Publikation konnte eine Korrelation eines desorganisierten Aktingerüsts, das sich unter anderem durch die Abwesenheit von Aktin-Stressfasern auszeichnet, mit Krebserkrankungen des Fibroblastendonors festgestellt werden [346]. Diese Beobachtung, die mehrfach von Kopelovich et al. insbesondere für Zellen von Patienten mit familiärer adenomatöser Polyposis (FAP) berichtet wurde [346–348], steht somit zu den Ergebnissen dieser Arbeit im Widerspruch, da für *BRCA1*<sup>mosMe</sup> Fibroblasten ein verstärktes Auftreten von Aktin-Stressfasern gezeigt werden konnte. Diese Diskrepanz liegt möglicherweise darin begründet, dass die FAP und *BRCA1*-assoziierte Krebserkrankungen zwei sehr unterschiedliche Entitäten darstellen, deren Entstehung mit Veränderungen von zwei nicht-verwandten Signalwegen assoziiert sind. Zytoskelettale Veränderungen wie die in *BRCA1*<sup>mosMe</sup> Fibroblasten gezeigte mit der verstärkten Expression von  $\alpha$ -SMA verbundene Ausbildung von Aktin-Stressfasern sind ein typisches funktionelles Charakteristikum von aktivierten Fibroblasten wie Myofibroblasten und CAFs [349]. Die Ausbildung dieser kontraktilen Fasern ist eine Voraussetzung sowohl für die Remodellierung der Matrix als auch für die kollektive Migration von aktivierten Fibroblasten. Sie ist damit essentiell wichtig für die tumorfördernde Funktion von CAFs [276, 350, 351].

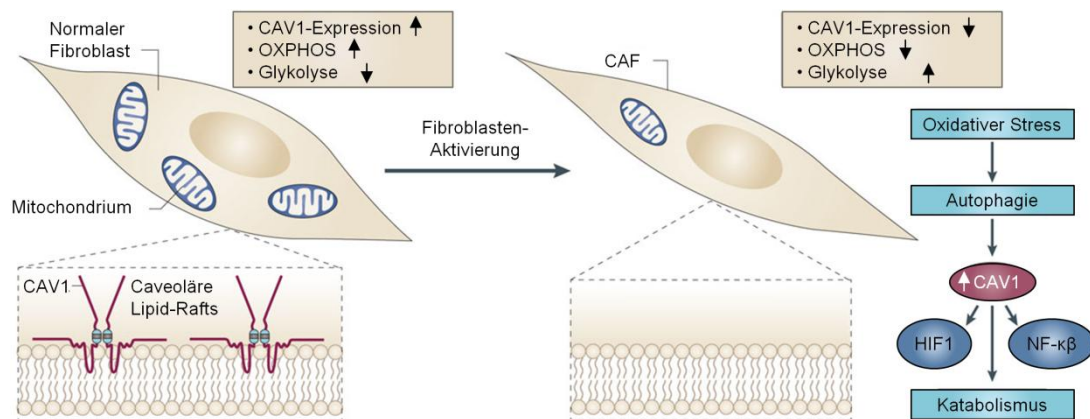
#### 4.5.4 Produktion von Ketonkörpern im Energiestoffwechsel

CAFs fördern das Tumorwachstum nicht nur durch den Aufbau einer vorteilhaften extrazellulären Matrix und die Freisetzung von pro-tumorigenen Zytokinen, sondern auch durch die Bereitstellung von energiereichen Verbindungen. Dieses Konzept der metabolischen Beziehung zwischen CAFs und Krebszellen wurde erstmalig 2009 von der Arbeitsgruppe um M.P. Lisanti postuliert und als „Reverse Warburg effect“ bezeichnet [352]. Gemäß dieses Modells findet die aerobe Glykolyse (auch bekannt als „Warburg effect“) nicht in den Krebszellen selbst, sondern in den benachbarten Fibroblasten statt [39, 353, 354]. Dieser Prozess dient der Bereitstellung von Laktat und Ketonen, die zu den für das anabole Tumorwachstum essentiellen Metaboliten zählen.

Da auch *in vitro* in Zellkulturüberständen von CAFs größere Mengen an Ketonkörpern nachgewiesen werden können als in Überständen gepaarter NOFs, kann davon ausgegangen werden, dass CAFs in der Lage sind, ihren Stoffwechselmodus auch in Abwesenheit von Krebszellen beizubehalten. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass *BRCA1*<sup>mosMe</sup> Fibroblasten eine signifikant höhere Menge des Ketonkörpers  $\beta$ -Hydroxybutyrat sezernieren als die Kontrollfibroblasten *BRCA1*<sup>wt</sup>, obwohl beide aus gesunden Hautpartien entnommen wurden und nicht in Kontakt zu Tumorzellen standen. Diese Ergebnisse geben somit einen Hinweis auf eine veränderte Stoffwechsellage der *BRCA1*<sup>mosMe</sup> Fibroblasten.

Bisher wurde angenommen, dass der erste Schritt der metabolischen CAF-Reprogrammierung notwendigerweise von Krebszellen ausgeht, die über die Freisetzung von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oxidativem Stress ausüben. Dieser schädigt insbesondere die mitochondriale DNA in CAFs und triggert in Folge katabole Prozesse wie Autophagie und Mitophagie (mitochondriale Degradierung). Durch den Abbau funktionsfähiger Mitochondrien schaltet der Energiestoffwechsel von oxidativer Phosphorylierung (OXPHOS) zu aerober Glykolyse um [353–355]. Dieser Prozess ist kausal mit der lysosomalen Degradierung von Caveolin 1 (CAV1), dem proteinösen Hauptbestandteil der Caveoli, sowie der Aktivierung des Hypoxie-induzierten Faktors (HIF1- $\alpha$ ) verbunden [272, 356–358] (siehe Abb. 33). BRCA1 scheint bei der Initiierung dieser durch oxidativen Stress induzierten Reaktionen eine wichtige Rolle zu spielen. So kann BRCA1 die Expression von Caveolin 1 durch Transaktivierung des CAV1-Promoters regulieren [359, 360]. Darüber hinaus wirkt BRCA1 stabilisierend auf HIF1- $\alpha$  ein und reguliert somit dessen nachgeschaltete Signalwege [361]. Des Weiteren dient BRCA1 unter Einfluss von oxidativem Stress als Wächter der genomischen Integrität mit Wirkung sowohl auf das

Kerngenom als auch auf das mitochondriale Genom [125]. Mitochondriale DNA weist eine besondere Sensitivität gegenüber DNA-Schäden auf, die durch reaktive Sauerstoffspezies ausgelöst werden [362], sodass ein Zusammenhang zwischen normaler BRCA1-Funktionalität und dem Status des mitochondrialen Metabolismus durchaus plausibel erscheint.



**Abb. 33 Metabolische Veränderungen, die mit der Aktivierung von Fibroblasten assoziiert sind.** Die Differenzierung von CAFs sowie Myofibroblasten geht mit dem Verlust von Caveolin 1 einher. Dieser induziert den veränderten Phänotyp, der durch einen reduzierten mitochondrialen Metabolismus sowie eine verstärkte Glykolyse charakterisiert ist. Abbildung modifiziert aus Martinez-Outschoorn et al. (2015) [356].

Wie 2012 von Salem et al. berichtet, führte der shRNA-Knockdown von *BRCA1* in einer immortalisierten Fibroblastenzelllinie zur Initiierung eines metabolischen CAF-Phänotyps [289]. In den Fibroblasten fanden sich anschließend Marker einer verstärkten Mitophagie und Autophagie sowie eine verstärkte Ketonproduktion und eine Hochregulation von HIF1- $\alpha$  [289]. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Anwesenheit von oxidativen Stress ausübenden Krebszellen keine notwendige Voraussetzung für die Entstehung von CAFs ist. Die Haploinsuffizienz von *BRCA1* scheint, bei einem normalen Maß an im Gewebe vorhandenem oxidativem Stress, in Fibroblasten einen ähnlichen Effekt auf die Ausprägung eines metabolischen CAF-Phänotyps zu haben wie die Anwesenheit von Krebszellen. Diese Erkenntnisse sind kongruent mit den in dieser Arbeit generierten Daten für *BRCA1*<sup>mosMe</sup> Fibroblasten und erhärten den Zusammenhang zwischen einer *BRCA1*-Defizienz und CAF-spezifischen metabolischen Veränderungen in Fibroblasten.

#### 4.5.5 Chromosomeninstabilität

In einer zytogenetischen Analyse an G-Banden gefärbten Metaphasepräparaten wurde im Rahmen dieser Arbeit in *BRCA1*<sup>mosMe</sup> Fibroblasten ein sogenanntes variiertes Translokationsmosaik („varigated translocation mosaicism“, VTM) beobachtet. Der Begriff VTM wurde 1975 im Zusammenhang mit dem chromosomalen Aberrationsmuster in dermalen Fibroblasten von Patienten mit dem Chromosomeninstabilitäts-Syndrom Morbus Werner (*Progeria adultorum*) eingeführt [278]. Er beschreibt das wiederholte Auftreten einer Vielzahl von chromosomalen Rearrangements, die häufig klonal als spezifisches Set an scheinbar balancierten Translokationen vorkommen.

Monoklonale chromosomale Aberrationen in einem geringen Anteil untersuchter Zellen wurden zwar gelegentlich auch in Fibroblasten gesunder Individuen gefunden [363], jedoch gilt der Nachweis eines ausgeprägten VTM als hochpathologischer Befund [278]. Mehrere Studien zeigten, dass solch typische chromosomale Aberrationsmuster als Konsequenz einer Exposition gegenüber ionisierender Strahlung entstehen können, wie z.B. bei der Ganzkörperbestrahlung zur Vorbereitung einer Knochenmarkstransplantation. Der Anteil aberranter Zellen schwankte dabei zwischen den untersuchten Patienten (49 - 88 %) und reduzierte sich im Laufe weniger Monate bis Jahre, sodass nach durchschnittlich 9 Monaten kaum noch aberrante Zellklone nachzuweisen waren [364].

Die Persistenz aberranter Zellklone in *BRCA1*<sup>mosMe</sup> Fibroblasten noch fast 30 Jahre nach der Bestrahlung spricht für das Vorliegen einer gestörten Chromosomenstabilität bei der untersuchten Patientin. Ein Zusammenhang dieser Störung mit der *BRCA1*-Haploinsuffizienz erscheint plausibel, da *BRCA1* als DNA-Reparatur-Gen eine wichtige Rolle bei der Erhaltung der genomischen Integrität spielt.

Es konnte gezeigt werden, dass die mammographische Bestrahlung in Fibroblasten von Individuen mit homozygoter bzw. *compound*-heterozygoten *BRCA2*-Mutation(en) zu umfangreichen chromosomalen Rearrangements führte. In Fibroblasten mit heterozygoter *BRCA1*-Aberration war dies jedoch nur für einige wenige Fälle zu beobachten [365]. Im Gegensatz zu *BRCA1*-defizienten nicht-neoplastischen mesenchymalen Zellen ist die extrem starke Anreicherung von chromosomalen Umbauten in *BRCA1*-defizienten Epithelzellen, Krebszelllinien und humanen sowie murinen Tumoren bekannt und vielfach beschrieben [366–370].

Die Existenz von großen chromosomalen Rearrangements in CAFs ist derzeit Gegenstand kontroverser Diskussionen. So zeigten einige Studien enorme genetische

Instabilität in CAFs aus Ovarial- und Brustkrebszellen, die in ihrem Ausmaß der in epithelialen Zellen beobachteten Instabilität gleicht und eine Loss-of-Heterozygosity (LOH)-Frequenz von nahezu 60% aufweist [371, 372]. Andere Studien konnten jedoch Aberrationen der Genkopienzahl oder LOH nur in einem sehr geringen Prozentsatz von CAFs von Brust- und Ovarialkrebsproben nachweisen und argumentieren gegen eine grundsätzliche genomische Instabilität als Charakteristikum von CAFs [373, 374].

#### 4.5.6 Proliferationsmodulierendes Potenzial

Die Auswirkungen von durch CAFs ausgesendeten parakrinen Signalen auf benachbarte Krebszellen sind vielfältig, jedoch nur partiell mechanistisch aufgeklärt. Es ist bekannt, dass CAFs durch Sezernierung der Zytokine TGF- $\beta$  und CXCL12 potente Initiatoren invasiven und metastatischen Verhaltens von Krebszellen darstellen. Dies wird durch die Einleitung einer epithelial-mesenchymalen Transition (EMT) getriggert, die dazu führt, dass polarisierte epitheliale Krebszellen einen motilen mesenchymalen Phänotyp annehmen [375–377]. Das stromal bereit gestellte CXCL12 führt neben anderen pro-tumorigenen Effekten in benachbarten Tumoren zu einem verstärkten Wachstum und Angiogenese. Dies konnte mehrfach im Xenograft-Mausmodellen durch Ko-Injektion von humanen Tumorzellen und CAFs beobachtet werden [325, 378, 379]. Die funktionelle Komponente scheint dabei ausschließlich die sezernierte Fraktion zu spielen, da sich in *in vitro* Experimenten das konditionierte Medium von CAFs als ausreichend erweist, um diesen wachstumsmodulierenden Effekt auf Krebszellen auszuüben [380, 381].

Die vorliegende Daten dieser Arbeit zeigen, dass sowohl die Lungenkrebszelllinie A549 als auch die nicht-tumoröse Brustepithelzelllinie HMLE in Anwesenheit von konditioniertem Medium von *BRCA1*<sup>mosMe</sup> Fibroblasten deutlich schneller proliferierten als mit dem konditioniertem Medium der Kontrollfibroblasten *BRCA1*<sup>wt</sup>. Der naheliegende Zusammenhang zwischen einer *BRCA1*-Defizienz, einem proliferationsfördernden Effekt auf Krebszellen sowie einer starken Krebsdisposition wird durch die Ergebnisse einer Studie gestützt, in der eine *shBRCA1*-Fibroblastenzelllinie mit MDA-MB-231 Krebszellen in eine immunsupprimierte Xenograft-Maus ko-injiziert wurden. Die veränderten Fibroblasten führten dabei im Vergleich zu Kontrollfibroblasten zum Wachstum von Tumoren mit mehr als doppelter Größe [289]. Folglich erscheint es plausibel, dass auch *in vivo* in Individuen, deren stromale Zellen durch eine konstitutive *BRCA1*-Defizienz tumorigene proliferationsmodulierende Eigenschaften besitzen, aus neoplastisch entarteten Zellen mit einer vergleichbar höheren Wahrscheinlichkeit solide Tumore entstehen.

## 4.6 Zusammenfassende Diskussion: Ursprünge des CAF-Phänotyps in Fibroblasten aus nicht-neoplastischem Gewebe und Auswirkungen auf die Krebs-Disposition

Die Ursprünge von CAFs im Tumorstroma zu verstehen, stellt auf Grund des hohen Potenzials für die Optimierung von Krebstherapie und -prävention eine der wichtigsten wissenschaftlichen Fragestellungen auf dem Forschungsgebiet der Tumor-Stroma-Interaktionen dar. Es existieren bereits experimentelle Belege dafür, dass CAFs aus einer Vielzahl von möglichen Zelltypen wie Epithelzellen, mesenchymalen Stammzellen, normalen residenten Fibroblasten oder Endothelzellen entstehen können. Die Transition zum CAF erfolgt dabei über Transdifferenzierungsprozesse wie Epithelial-mesenchymale Transition (EMT), Mesothelial-mesenchymale Transition (MMT) oder Endothelial-mesenchymale Transition (EndMT) [312, 321, 324, 375, 382]. Allen bisher beforschten Konzepten ist dabei gemein, dass die primäre Existenz oder Ko-Evolution von angrenzenden Tumorzellen Voraussetzung für die Genese von CAFs ist. Diese initiieren und stimulieren die Transformation der verschiedenen Zelltypen zu CAFs durch Sezernierung von Wachstumsfaktoren wie TGF- $\beta$  und CXCL12 [320, 383].

Aktuelle Studien konnten allerdings zeigen, dass normale Fibroblasten *in vitro* auch in kompletter Abwesenheit von Krebszellen CAF-typische, phänotypische und funktionelle Eigenschaften annehmen können, wenn durch einen shRNA-Knockdown die Expression eines der Tumorsuppressorgene *BRCA1*, *RB*, *TP53* oder *PTEN* reduziert wird [46, 289, 290]. Unter Berücksichtigung dieser Beobachtungen scheint es naheliegend, dass auch eine konstitutionelle Haploinsuffizienz dieser Tumorsuppressorgene z.B. durch Sequenz- oder Epimutationen *in vivo* einen Einfluss auf die Konstitution stromaler Zellen haben muss.

Die These, dass die veränderten Eigenschaften mesenchymaler Zellen eine Schlüsselrolle bei der Kanzerogenese in genetisch prädisponierten Individuen spielen, wird bereits seit 1985 von der Gruppe um Seth und Ana Schor von der Universität Dundee postuliert, nachdem sie ein aberrantes Migrationsverhalten in dermalen Fibroblasten von Tumorsyndrom-Patienten und deren Verwandten nachweisen konnten [292, 294, 345, 384, 385]. Zu diesem frühen Zeitpunkt existierten allerdings kaum Erkenntnisse über die Funktion und Relevanz der Tumormikroumgebung, sodass damals keine Parallelen zwischen den Eigenschaften genetisch prädisponierter Fibroblasten und CAFs gezogen werden konnten.

Das dieser Arbeit zugrundeliegende Forschungsvorhaben ist unseres Wissens nach das erste, welches sich mit der umfangreichen Charakterisierung primärer Fibroblasten mit natürlich bedingter *BRCA1*-Haploinsuffizienz hinsichtlich ihres aktivierten Tumorstroma-ähnlichen Zustandes beschäftigt. Dabei stellten die *BRCA1*<sup>wt</sup> Fibroblasten der gesunden monozygoten Schwester eine einzigartige isogene Kontrolle dar. Der Nachweis CAF-typischer Eigenschaften auf transkriptioneller und funktioneller Ebene in den *BRCA1*<sup>mosMe</sup> Fibroblasten der Patientin mit multiplen Neoplasien gibt einen Hinweis darauf, dass die Ausprägung eines CAF-Phänotyps kein exklusiv in Abhängigkeit von Tumoren stattfindender Prozess sein kann, sondern vielmehr konvergente Entstehungsmechanismen existieren müssen, die auch die genetische Kodierung dieses speziellen Fibroblastenzustandes einschließen.

Trotz der Tatsache, dass die untersuchten *BRCA1*<sup>mosMe</sup> Fibroblasten ein nur etwa 20-25%iges Aberrationsmosaik darstellen, waren die detektierten CAF-typischen Unterschiede zu den Kontrollfibroblasten *BRCA1*<sup>wt</sup> auf transkriptioneller und zellbiologischer Ebene sehr stark ausgeprägt. Es ist anzunehmen, dass die CAF-ähnliche Transdifferenzierung der von der *BRCA1*-Epimutation betroffenen Zellpopulation in einer parakrinen Kettenreaktion auch zu Veränderung der benachbarten Fibroblasten mit normalem *BRCA1*-Methylierungsstatus geführt haben muss. Solche Amplifikationen mittels para- und autokrinen Rückkopplungsschleifen sind ein bekanntes Phänomen in CAFs und basieren vor allem auf der verstärkten Expression von *TGF-β* und *CXCL12*, die ebenfalls in *BRCA1*<sup>mosMe</sup> Fibroblasten detektiert werden konnten.

Hinsichtlich der in *BRCA1*<sup>mosMe</sup> Fibroblasten beobachteten potenziell tumorigenen Eigenschaften liegt der Schluss nahe, dass die Beschaffenheit der *BRCA1*<sup>mosMe</sup> Fibroblasten kausal mit der diskordanten Krebsanamnese in dem Zwillingspaar verbunden ist. Diese These setzt voraus, dass CAFs bzw. CAF-ähnliche Zellen nicht nur das Potenzial haben, Krebswachstum zu fördern, sondern auch dieses *de novo* zu initiieren. Dieses Konzept wurde in der wissenschaftlichen Fachwelt lange Zeit diskutiert und in Frage gestellt. Mittlerweile belegen aber zahlreiche experimentelle Befunde, dass CAFs allein in der Lage sind, epitheliale Hyperplasie und sogar die neoplastische Transformation von prämaligen epithelialen Zellen einzuleiten [321, 386–389].

Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten primären Hautfibroblasten stellen dabei ein Modell dar, welches den Zustand der mesenchymalen Zellen in den von Neoplasien betroffenen Organen, nämlich Knochenmark und Schilddrüse, der erkrankten Patientin



widerspiegelt. Tatsächlich sind CAFs und somit wahrscheinlich auch CAF-ähnliche Fibroblasten nicht nur von hoher Relevanz für die Entstehung von soliden Tumoren wie Schilddrüsenadenomen, sondern auch von hämatologischen Neoplasien. Mesenchymale stromale Zellen, die aus Knochenmark von Patienten mit akuter Leukämie und multiplen Myelomen isoliert worden waren, zeigten analog zu den Ergebnissen dieser Arbeit multiple abnorme CAF-typische Eigenschaften, die den Krankheitsverlauf negativ beeinflussen und für eine Chemoresistenz verantwortlich sein können [390–394].

Da es sich bei dem im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Material um primäre Zellen eines individuellen Zwillingspaars handelt, sind die erhobenen Daten als erweiterte Fallstudie zu werten. Naturgemäß kann aus diesem Grund nicht vollständig ausgeschlossen werden, dass die zwischen  $BRCA1^{mosMe}$  und  $BRCA1^{wt}$  Fibroblasten detektierten Unterschiede auf andere genetische oder nicht-genetische Faktoren als die  $BRCA1$ -Epimutation zurückzuführen sind. Ebenfalls kann nicht sicher prognostiziert werden, ob solche Effekte auch auf andere Krebs-prädisponierte Individuen mit  $BRCA1$ -Sequenzmutationen übertragbar sind. Sehr viele der zum heutigen Zeitpunkt bekannten  $BRCA1$ -Mutationen führen zu einem in der Aminosäuresequenz veränderten oder trunkierten  $BRCA1$ -Protein im Gegensatz zu Epimutationen, die eine Expressionsreduktion bewirken. Unter Berücksichtigung der vielfältigen experimentellen Evidenzen, die im Vorfeld zitiert wurden und die Plausibilität der in dieser Arbeit postulierten These erhärten, kann davon ausgegangen werden, dass die vorliegende Studie als Pilotstudie zur Erforschung der durch  $BRCA1$ -Defizienz hervorgerufenen stromalen Veränderungen in hereditären Krebserkrankungen dienen kann.

#### **4.7 Implikationen zur Entwicklung chemopräventiver Maßnahmen für genetisch prädisponierte Individuen**

Die Erforschung und detaillierte Charakterisierung der veränderten stromalen Eigenschaften in mesenchymalen Zellen Krebs-prädisponierter Individuen und deren mechanistische Funktion bei der Kanzerogenese birgt ein enormes Potenzial für die Entwicklung von chemopräventiven Maßnahmen, die den Ausbruch der Krebserkrankung verhindern können. Ein denkbarer Ansatz ist dabei der Einsatz von bereits in der Entwicklung befindlichen, gegen das Tumorstroma gerichteten Krebstherapeutika [268, 395, 396] zur Regulation der abnormen stromalen Konstitution vor Initiation der Krebserkrankung. Grundsätzlich kommen für die zur Stroma-

gerichtete Therapie und Prävention zwei Strategien in Frage: 1. Die Unterbrechung des pro-tumorigenen Signalings zwischen CAFs und Tumorzellen; sowie 2. Die Verhinderung der Aufrechterhaltung des CAF-Phänotyps mit allen seinen typischen Eigenschaften.

Ein vielversprechendes Therapieziel ist der TGF- $\beta$ -Signalweg, dessen Blockierung mittels neutralisierender Antikörper, Antisense-Oligonukleotiden oder Kleinmolekül-Inhibitoren im Rahmen einiger klinischer Studien zu vorteiligen, lebensverlängernden Effekten in Patienten mit verschiedenen Krebsleiden geführt hat. Weitere sich in präklinischen oder klinischen Studien befindliche Therapeutika, die auf die Inhibition anderer für die CAF-Funktion essentieller Faktoren wie FAP- $\alpha$ , CXCL12, PDGF abzielen, werden für die Therapie von Brustkrebs, chronischer myeloischer Leukämie und Hautkrebs getestet [268, 320, 395–398]. Nachteile dieser Strategien sind jedoch, dass sie in Prozesse und Signalwege eingreifen, deren Multifunktionalität nicht nur für pathogene Prozesse eine Rolle spielt, sondern vor allem für die Aufrechterhaltung von normalen physiologischen Vorgängen verantwortlich ist. Die durch Inhibition solcher Prozesse zu erwartenden Off-target Effekte können daher so stark ausgeprägt sein, dass diese im Rahmen einer präventiven Maßnahme den Nutzen übersteigen und daher nicht anwendbar sind. Nebenwirkungen, die z.B. in klinischen Studien mit TGF- $\beta$  blockierenden Agenzien beobachtet werden konnten, reichten von Hautläsionen und transienten Blutbildveränderungen bis zu schwerwiegenden systemischen Inflammationen [399, 400]. Es bleibt zu klären, ob die Anpassung dieser Therapien durch Dosisreduktion eine Vermeidung dieser adversen Effekte erzielen kann.

Ein anderer chemopräventiver Ansatzpunkt ist die Kompensation von oxidativem Stress, der in *BRCA1*-defizienten Zellen nicht effizient bekämpft werden kann und zu mitochondrialer Dysfunktion, Autophagie und metabolen Veränderungen führt. Der Einfluss von oxidativem Stress und antioxidativen Agenzien auf die Tumormikroumgebung wurde mit Hilfe eines *in vitro* Ko-Kultivierungsmodells mit *BRCA1*-null HCC1937 Brustkrebszellen und *hTERT*-immortalisierten humanen Fibroblasten von Martinez-Outschoorn et al. untersucht [359]. Dabei konnte festgestellt werden, dass die Fibroblasten eine verstärkte Produktion von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> aufwiesen, die jedoch durch die exogene genetische Komplementierung des *BRCA1*-Gens in den Krebszellen verhindert werden konnte. Gleiches konnte für den durch die Ko-Kultivierung induzierten Verlust von CAV1 sowie die Induktion der MCT4-Expression beobachtet werden, die beide funktionelle Marker von oxidativem Stress darstellen. Interessanterweise hatte die Behandlung mit starken Antioxidantien wie N-Acetyl-Cystein (NAC) und Tempol exakt denselben Effekt auf den Zustand der Fibroblasten

wie die *BRCA1*-Komplementierung. Diese Ergebnisse implizieren, dass antioxidative Substanzen potente Modulatoren der fibroblastischen Phänotypen und Funktionen sein können. Es bedarf allerdings der Klärung, ob solch ein Effekt auf *BRCA1*-haploinsuffiziente Fibroblasten auch in Abwesenheit von Krebszellen besteht und somit die Entwicklung von CAF-ähnlichen Zuständen auf diese Weise unterbunden werden kann. Die Gabe von NAC, Resveratrol und Selen wurde bereits mehrfach als präventive Maßnahme in Patienten mit *BRCA1*-Mutationen vorgeschlagen, da diese nachweislich zu einer Reduktion von reaktiven Sauerstoffspezies und oxidativen DNA-Schäden führt. In klinischen Studien konnte gezeigt werden, dass sich die Erkrankungsprognosen durch diese antioxidativen Mittel tatsächlich deutlich positiv beeinflussen lassen [401–403].

#### 4.8 Schlussfolgerung und Ausblick

Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführte *in vitro* Charakterisierung von Hautfibroblasten mit einer epigenetisch determinierten *BRCA1*-Haploinsuffizienz deckte eine Vielzahl von veränderten molekulargenetischen, zellbiologischen und funktionellen Eigenschaften auf und stellte auf Grund dieser spezifischen Beobachtungen einen Zusammenhang zu Fibroblasten der Tumorumgebung (sog. CAFs) her. Zur Ergänzung der bisher durchgeführten Experimente werden im Weiteren Ko-Injektions-Experimente der *BRCA1*<sup>mosMe</sup> Fibroblasten mit verschiedenen Krebszelllinien in immunsupprimierten Xenograft-Mäuse erfolgen, um die Relevanz des CAF-ähnlichen Phänotyps dieser Zellen auch in einem *in vivo* Modell beurteilen zu können.

Darüber hinaus soll untersucht werden, ob die in dieser Arbeit detektierten Auffälligkeiten auch in Fibroblasten eines größeren Patientenkollektivs mit *BRCA1*-Sequenz oder Epimutationen nachgewiesen werden können. Durch Analyse von sowohl gesunden aber genetisch prädisponierten Individuen und bereits erkrankten Patienten kann geklärt werden, ob die veränderten Eigenschaften der Fibroblasten von Geburt an vorhanden sind oder ob zu deren Ausprägung ein weiterer initiierender Faktor von Nöten ist. Die Erforschung dieses Sachverhalts birgt ein enormes Potenzial für die Diagnostik und Vorsorge hereditärer Krebserkrankungen. Wird eine vollständige Korrelation zwischen der *BRCA1*-Defizienz und dem konstitutiven CAF-Phänotyp in gesundem Gewebe bewiesen, so kann dies als Maß für die Pathogenität von neuen oder bezüglich ihrer Pathogenität noch nicht klassifizierten Mutationen dienen. Sollte der CAF-Phänotyp jedoch erst im Laufe des Lebens entstehen, kommt dieser als Indikator

für den bevorstehenden Ausbruch einer Krebserkrankung in genetisch prädisponierten Individuen in Frage.

Die vorliegende Arbeit zeigte die außerordentliche Eignung von Fibroblasten monozygoter Zwillinge mit Mosaikaberrationen und krebsdiskordanter Anamnese für die Erforschung der veränderten Stromaeigenschaften in hereditären Tumordispositionssyndromen. Solche Konstellationen wurden bisher selten in der Literatur beschrieben und bieten Zugang zu außergewöhnlichem Untersuchungsmaterial. Dies liegt wahrscheinlich darin begründet, dass geringgradige Aberrationsmosaik in der Vergangenheit mit den vorhandenen Analysemethoden kaum zu detektieren waren. Mit der Entwicklung neuer Sequenziermethoden (Next Generation Sequencing) steht nun allerdings eine Technologie bereit, die der Identifizierung weiterer Krebs-diskordanter Zwillingspaare mit Mosaikaberrationen in Tumorsuppressorgenen dienen und dadurch weiterführende Forschung auf diesem Gebiet ermöglichen wird.

Die in der vorliegenden Arbeit belegten Ähnlichkeiten von *BRCA1*-haploinsuffizienten Hautfibroblasten und CAFs zeigen eine neue Perspektive für die Erforschung hereditärer Krebserkrankungen auf. Das Wissen um die stromale Beteiligung bei der Kanzerogenese birgt das Potenzial, die Komplexität dieses Prozesses sowohl in hereditären als auch in sporadischen Fällen besser verstehen und somit potenziell beeinflussen zu können.

# 5 Anhang

## 5.1 Weiterführende Charakterisierung der aus $BRCA1^{mosMe}$ Fibroblasten hervorgegangenen Einzelzellklone

### 5.1.1 Genomische qPCR-Analyse der Einzelzellklone zur Detektion von partiellen Deletionen der Gene $RSPO3$ und $NREP$

Nebenbefundlich wurden in einer vorhergehenden Arbeit in den  $BRCA1^{mosMe}$  Fibroblasten partielle Mosaik-Deletionen der Gene  $RSPO3$  und  $NREP$  mittels genomischer SNP-Array-Experimente festgestellt. Die Deletionen betrafen die Promoterregion sowie Exon 1 von  $RSPO3$  sowie das gesamte Gen  $NREP$ .

Die Ausgangsfibroblastenkulturen  $BRCA1^{mosMe}$  und  $BRCA1^{wt}$  sowie 23 aus  $BRCA1^{mosMe}$  generierten Einzelzellklone (EZK) wurden mittels genomischer qPCR auf diese bekannten Deletionen untersucht. Die Analyse bestätigte die um ca. 25% erniedrigten Genkopienwerte für  $RSPO3$  und  $NREP$  in  $BRCA1^{mosMe}$  Fibroblasten im Vergleich zu  $BRCA1^{wt}$  Fibroblasten und einem Fibroblasten-Kontrollkollektiv (Abb. 34 und Abb. 35). Diese Daten sprechen für im 50%igen Mosaik vorliegende heterozygote Deletion der beiden Gene in den  $BRCA1^{mosMe}$  Fibroblasten.

Die Ergebnisse der genomischen qPCR der 23 klonalen Zelllinien stützten ebenfalls diese Hypothese (Abb. 34 und Abb. 35). Für alle analysierten Einzelzellklone ergaben sich Genkopienwerte von entweder  $\sim 0,5$ , was einer heterozygoten Deletion entspricht, oder  $\sim 1$ , was einer vollständigen doppelten Genkopienanzahl entspricht. Interessanterweise zeigte das Experiment eine vollständige Korrelation der Deletionen von  $RSPO3$  und  $NREP$  in 14 von 23 analysierten Klonen. Die Abwesenheit von Messwerten zwischen 0,5 und 1 bewies den Erfolg der Klonierungsprozedur und zeigt, dass das somatische Zellmosaik des  $BRCA1^{mosMe}$  Fibroblasten vollständig in klonale Zelllinien separiert worden war. Eine Korrelation des Deletionsstatus mit der Wachstumsgeschwindigkeit der Einzelzellklone war nicht feststellbar.

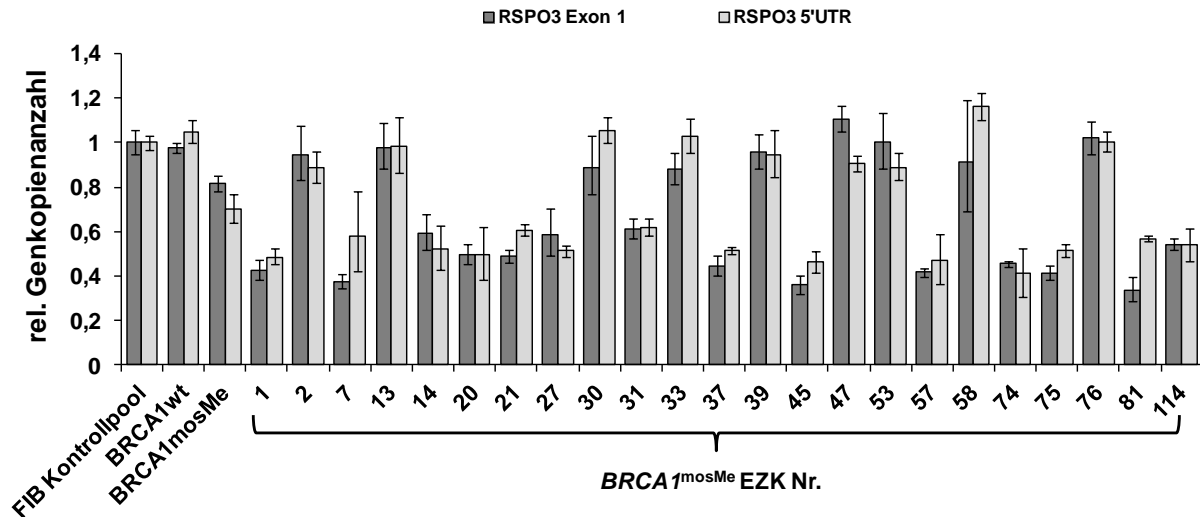


Abb. 34 *RSPO3*-Genkopienanzahl in *BRCA1<sup>wt</sup>* und *BRCA1<sup>mosMe</sup>* Fibroblasten sowie in aus *BRCA1<sup>mosMe</sup>* generierten Einzelzellklonen gemessen mittels genomischer SYBR-Green qPCR. Die relative Genkopienanzahl wurde berechnet als  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  und auf das Referenzgen *RFC3* sowie ein Fibroblasten-Kontrollkollektiv normalisiert. Die Fehlerbalken zeigen  $\pm RCN_{\min/\max} = 2^{-(\Delta\Delta C_t \pm T \cdot SD(\Delta C_t))}$  mit  $T$ =Konfidenzniveau und  $SD$ =Standardabweichung. Die Anzahl der gemessenen Replikate beläuft sich auf  $n=3$ . Die Nummerierung der EZK wurde anhand des Zeitpunkts der Kryokonservierung gewählt und korreliert somit mit der Wachstumsgeschwindigkeit.

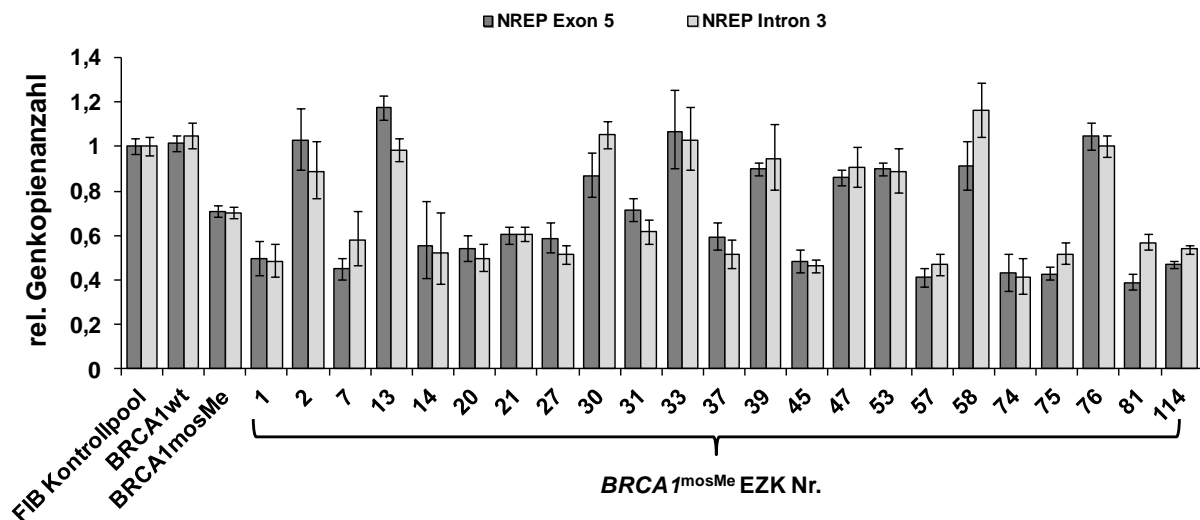


Abb. 35 *NREP*-Genkopienanzahl in *BRCA1<sup>wt</sup>* und *BRCA1<sup>mosMe</sup>* Fibroblasten sowie in aus *BRCA1<sup>mosMe</sup>* generierten Einzelzellklonen gemessen mittels genomischer SYBR-Green qPCR. Die relative Genkopienanzahl wurde berechnet als  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  und auf das Referenzgen *RFC3* sowie ein Fibroblasten-Kontrollkollektiv normalisiert. Die Fehlerbalken zeigen  $\pm RCN_{\min/\max} = 2^{-(\Delta\Delta C_t \pm T \cdot SD(\Delta C_t))}$  mit  $T$ =Konfidenzniveau und  $SD$ =Standardabweichung. Die Anzahl der gemessenen Replikate beläuft sich auf  $n=3$ . Die Nummerierung der EZK wurde anhand des Zeitpunkts der Kryokonservierung gewählt und korreliert somit mit der Wachstumsgeschwindigkeit.

### 5.1.2 Zytogenetische Analyse der Einzelzellklone

Es folgte eine zytogenetische Analyse einer kleinen Auswahl von Einzelzellklonen an G-Banden-gefärbten Chromosomenpräparaten (Daten nicht gezeigt). Dabei zeigte sich, dass das Vorhandensein der Deletionen der Gene *RSPO3* und *NREP* in den Einzelzellklonen vollständig mit dem klonalen aberranten Karyotyp 46,XX,add(3)(p),der(4),der(9),der(11),add(12)(p) korrelierte, der schon in der Ausgangskultur *BRCA1*<sup>mosMe</sup> detektiert worden war. Die Ergebnisse implizieren, dass die Deletionen nicht als unabhängiges Ereignis, sondern als Teil eines komplexen chromosomalen Rearrangements zu werten sind.

Die zytogenetische Analyse der EZK ohne Deletion der Gene *RSPO3* und *NREP* ergab andere aberrante Karyotypen, die ebenfalls in der Untersuchung der Ausgangsfibroblasten bereits nachgewiesen worden waren. Keiner der untersuchten EZK zeigte einen unauffälligen Karyotyp ohne chromosomale Umbauten.

### 5.1.3 Transkriptomanalyse der *BRCA1*<sup>mosMe</sup> Einzelzellklone

#### 5.1.3.1 Identifizierung differenziell exprimierter Gene

Zur näheren Charakterisierung der Einzelzellklone wurden transkriptomweite Expressionsanalysen durchgeführt und die Expressionprofile der EZK mit (*RSPO3/NREP*<sup>+/-</sup> EZK ) und ohne (*RSPO3/NREP*<sup>+/+</sup> EZK ) *RSPO3*- und *NREP*-Deletionen verglichen. Pro Gruppe wurden drei Einzelzellklone auf einem Whole Transcript Array (Hugene 2.0 ST) der Firma Affymetrix untersucht. Zur Identifizierung signifikant differenziell exprimierter Gene wurde eine „analysis of variance“ (ANOVA) durchgeführt. Dabei wurden Gene mit einer mindestens 2-fachen Hoch- oder Runterregulation und einem p-Wert kleiner als 0,05 als signifikant differenziell exprimiert betrachtet. In *RSPO3/NREP*<sup>+/-</sup> EZK waren im Vergleich zu *RSPO3/NREP*<sup>+/+</sup> EZK 153 Gene stärker sowie 120 Gene schwächer exprimiert. Die 100 am stärksten differenziell exprimierten Gene sind in Tab. 22 und Tab. 23 dargestellt. Die partiellen Deletionen des Gens *NREP* spiegelten sich in der Transkriptionsanalyse in erniedrigten Expressionwerten in *RSPO3/NREP*<sup>+/-</sup> EZK wider (FC (*NREP*)= -2,29). Überraschenderweise war die Expression von *RSPO3* in den EZK mit der partiellen Deletion des Gens sogar stark erhöht (FC (*RSPO3*)= 4,51).

**Tab. 22 Top 100 der in RSPO3/NREP<sup>+/-</sup> EZK im Vergleich zu RSPO3/NREP<sup>+/+</sup> EZK stärker exprimierten Gene. FC steht für den Expressionsunterschied („fold change“).**

Transkript ID	FC	p-Wert	Gen	Transkript ID	FC	p-Wert	Gen
16705507	18,56	0,0264	<i>SRGN</i>	16858496	2,72	0,0121	<i>CNN1</i>
16997816	16,65	0,0034	<i>EDIL3</i>	16968680	2,70	0,0060	<i>SPP1</i>
16997802	13,10	0,0053	<i>HAPLN1</i>	16811638	2,68	0,0209	<i>SEMA7A</i>
16716478	12,15	0,0107	<i>ANKRD1</i>	17056984	2,67	0,0045	<i>INHBA</i>
16976211	8,31	0,0035	<i>IGFBP7</i>	17111738	2,67	0,0470	<i>OPHN1</i>
16698185	7,83	0,0019	<i>CHI3L1</i>	16821174	2,67	0,0416	<i>VAT1L</i>
17095887	7,81	0,0049	<i>ASPEN</i>	16802413	2,66	0,0001	<i>CORO2B</i>
16826230	5,80	0,0279	<i>NETO2</i>	16751554	2,64	0,0045	<i>KRT18</i>
16784760	5,29	0,0069	<i>DACT1</i>	16767422	2,63	0,0198	<i>PTPRB</i>
16852858	5,16	0,0144	<i>SERPINB7</i>	16768923	2,63	0,0123	<i>SLC9A7P1</i>
16932914	5,06	0,0389	<i>ZNF280B</i>	16960114	2,53	0,0132	<i>PLOD2</i>
16693308	5,03	0,0169	<i>FLG</i>	17012546	2,53	0,0072	<i>TMEM200A</i>
16967831	4,93	0,0307	<i>EPGN</i>	16861647	2,50	0,0091	<i>KCNK6</i>
17088159	4,89	0,0018	<i>FAM225A</i>	16823928	2,49	0,0318	<i>LITAF</i>
17070013	4,86	0,0034	<i>RDH10</i>	16888865	2,48	0,0039	<i>GLS</i>
16950440	4,74	0,0097	<i>OXTR</i>	16723422	2,44	0,0061	<i>KIAA1549L</i>
16965798	4,52	0,0137	<i>PCDH7</i>	16829085	2,43	0,0444	<i>SLC7A5</i>
16780929	4,48	0,0071	<i>COL4A1</i>	16785127	2,42	0,0084	<i>RHOJ</i>
16769569	4,24	0,0012	<i>NUAK1</i>	16746310	2,41	0,0066	<i>OPCML-IT2</i>
17056426	4,24	0,0060	<i>PDE1C</i>	17072159	2,41	0,0059	<i>OTTHUMG165053</i>
17004612	4,19	0,0116	<i>DSP</i>	16871622	2,40	0,0217	<i>COX7A1</i>
16871915	4,02	0,0009	<i>PPP1R14A</i>	16821660	2,40	0,0404	<i>FOXC2</i>
17115996	3,82	0,0407	<i>KRT18P10</i>	17106997	2,34	0,0248	<i>MST4</i>
16672214	3,79	0,0012	<i>PEAR1</i>	16711909	2,31	0,0092	<i>FRMD4A</i>
16746290	3,77	0,0049	<i>OPCML</i>	17023517	2,31	0,0155	<i>SAMD3</i>
16673126	3,72	0,0321	<i>RGS4</i>	16709936	2,30	0,0377	<i>PPAPDC1A</i>
16819082	3,58	0,0202	<i>LPCAT2</i>	16776431	2,29	0,0091	<i>COL4A2</i>
17114272	3,57	0,0489	<i>GPC4</i>	16971382	2,29	0,0372	<i>DCLK2</i>
17079353	3,50	0,0083	<i>GDF6</i>	16998823	2,29	0,0192	<i>NREP</i>
16777715	3,48	0,0064	<i>FLT1</i>	17061298	2,28	0,0449	<i>RELN</i>
16716350	3,41	0,0376	<i>ACTA2</i>	16677556	2,28	0,0367	<i>TGFB2</i>
16763600	3,40	0,0058	<i>AMIGO2</i>	16697674	2,27	0,0077	<i>LINC00862</i>
16844585	3,29	0,0312	<i>KRTAP2-3</i>	17012281	2,27	0,0015	<i>TPD52L1</i>
16763295	3,26	0,0240	<i>PRICKLE1</i>	16875274	2,24	0,0419	<i>TFPT</i>
16883498	3,25	0,0082	<i>NPAS2</i>	16754269	2,24	0,0448	<i>TRHDE</i>
16928608	3,05	0,0022	<i>OTTHUMG150945</i>	17051872	2,23	0,0045	<i>CALD1</i>
16870443	3,01	0,0226	<i>CRLF1</i>	16877297	2,23	0,0052	<i>TRIB2</i>
16901624	2,97	0,0413	<i>MALL</i>	16835672	2,22	0,0064	<i>ITGA3</i>
17012632	2,95	0,0068	<i>ENPP1</i>	16861630	2,21	0,0008	<i>SPINT2</i>
16831442	2,92	0,0002	<i>TRPV2</i>	16690908	2,20	0,0215	<i>KCND3</i>
16914972	2,87	0,0369	<i>DOK5</i>	16864393	2,19	0,0104	<i>ATF5</i>
16938654	2,87	0,0239	<i>KRT18P15</i>	16983569	2,19	0,0003	<i>C5orf17</i>
17018039	2,81	0,0082	<i>HLA-DPA1</i>	17007965	2,19	0,0069	<i>KCTD20</i>
16722081	2,81	0,0002	<i>MICAL2</i>	17010198	2,18	0,0021	<i>RIMS1</i>
16705810	2,79	0,0052	<i>UNC5B</i>	16679596	2,17	0,0182	<i>KIF26B</i>
16661031	2,78	0,0428	<i>EXTL1</i>	16849576	2,16	0,0466	<i>LGALS3BP</i>
16779667	2,74	0,0252	<i>PCDH9</i>	16798938	2,16	0,0324	<i>SCG5</i>
16919158	2,74	0,0009	<i>TGM2</i>	16789334	2,16	0,0210	<i>TDRD9</i>
17013657	2,74	0,0460	<i>ULBP1</i>	16690211	2,15	0,0466	<i>COL11A1</i>
16995047	2,73	0,0306	<i>ADAMTS12</i>	17087430	2,15	0,0469	<i>COL15A1</i>

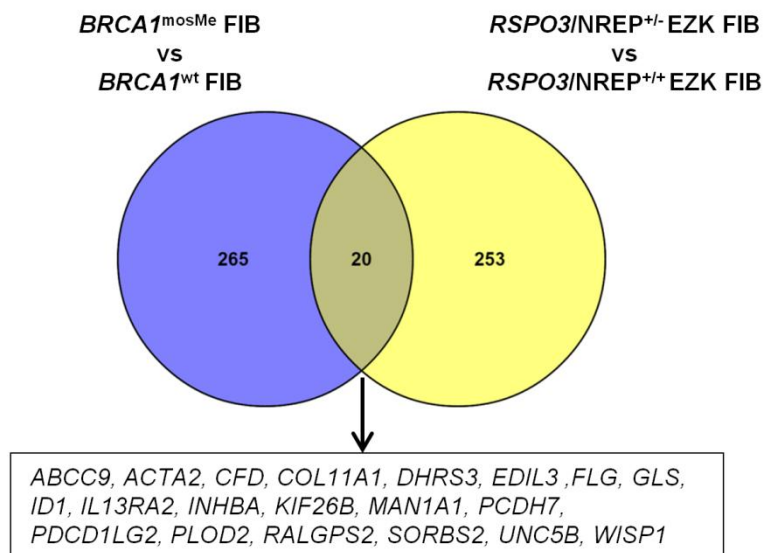


Tab. 23 Top 100 der in RSPO3/NREP<sup>+/-</sup> EZK im Vergleich zu RSPO3/NREP<sup>+/+</sup> EZK schwächer exprimierten Gene. FC steht für den Expressionsunterschied („fold change“).

Transkript ID	FC	p-Wert	Gen	Transkript ID	FC	p-Wert	Gen
16914084	-11,89	0,0027	WISP2	16774303	-2,94	0,0259	RGCC
16906471	-9,40	0,0033	MSTN	17097869	-2,93	0,0159	MEGF9
16961449	-8,44	0,0002	SLC7A14	16935905	-2,92	0,0181	KIAA1644
16743673	-7,66	0,0009	MMP27	16837226	-2,92	0,0087	SNORA38B
16962536	-6,74	0,0056	MASP1	16942576	-2,91	0,0398	MITF
16978236	-6,67	0,0164	ADH1B	16854809	-2,89	0,0004	KC6
16853399	-6,06	0,0031	COLEC12	16724861	-2,89	0,0357	SERPING1
17019689	-6,01	0,0426	ENPP5	17055390	-2,84	0,0016	DGKB
16755173	-5,71	0,0008	PLXNC1	17019698	-2,82	0,0370	RCAN2
16778067	-5,67	0,0017	DCLK1	16702007	-2,79	0,0278	AKR1C3
16854301	-5,51	0,0013	ANKRD29	17089549	-2,79	0,0006	DNM1
16906346	-5,51	0,0037	DIRC1	16853807	-2,77	0,0212	LOC100287082
16829728	-5,30	0,0177	ASPA	16972993	-2,72	0,0115	TLR3
16850216	-5,27	0,0030	SECTM1	16693082	-2,71	0,0198	SELENBP1
16762154	-5,10	0,0011	ABCC9	16675158	-2,70	0,0034	PRG4
16983611	-4,98	0,0103	LOC643401	16945543	-2,65	0,0014	COL6A6
16824572	-4,83	0,0006	GPRC5B	16855600	-2,64	0,0012	CCBE1
16850958	-4,78	0,0055	APCDD1	16714725	-2,63	0,0216	TMEM26
16963113	-4,70	0,0130	APOD	16788023	-2,62	0,0041	BDKRB2
17113448	-4,69	0,0266	IL13RA2	17088797	-2,59	0,0089	OR1J4
17012392	-4,51	0,0036	RSPO3	16990288	-2,58	0,0268	PCDHB16
16837391	-4,41	0,0015	KCNJ2	16668420	-2,56	0,0237	CSF1
16990284	-4,34	0,0010	PCDHB8	16692834	-2,56	0,0005	CTSS
16964888	-4,08	0,0116	HTRA3	16744205	-2,55	0,0145	ARHGAP20
17059165	-4,07	0,0046	HGF	16868481	-2,54	0,0190	OLFM2
17019820	-3,96	0,0029	PTCHD4	17004198	-2,53	0,0017	FOXF2
16931237	-3,91	0,0082	FBLN1	16852463	-2,51	0,0068	RAB27B
16856299	-3,86	0,0099	CFD	16965519	-2,51	0,0447	SOD3
16785789	-3,70	0,0388	GALNT16	16788033	-2,50	0,0070	OTTHUMG171410
16992265	-3,63	0,0188	RANBP17	17099076	-2,49	0,0336	PTGES
16924620	-3,58	0,0180	ADAMTS5	17009316	-2,48	0,0468	ENPP4
16986655	-3,50	0,0248	THBS4	16978417	-2,48	0,0484	SLC39A8
16914478	-3,49	0,0130	EYA2	16691776	-2,47	0,0197	LOC100996920
16960084	-3,47	0,0067	SLC9A9	16832147	-2,45	0,0180	ALDH3A2
16743614	-3,46	0,0368	ANGPTL5	16743735	-2,45	0,0204	MMP3
16967771	-3,46	0,0056	IL8	16893349	-2,45	0,0056	SNED1
16938133	-3,34	0,0167	GALNT15	16801473	-2,41	0,0294	AQP9
17072135	-3,34	0,0231	NOV	16889268	-2,39	0,0316	AOX1
16998682	-3,33	0,0106	EFNA5	16801487	-2,37	0,0053	LIPC
16848262	-3,26	0,0001	MIR4524A	16712879	-2,31	0,0081	SVIL
16745870	-3,20	0,0062	CDON	16760691	-2,30	0,0197	C1R
16994597	-3,20	0,0027	FAM134B	16818114	-2,30	0,0115	HSD3B7
16901161	-3,19	0,0011	TBC1D8	16961551	-2,30	0,0157	PLD1
16848219	-3,18	0,0323	ABCA6	16896561	-2,29	0,0270	CYP1B1
17095566	-3,07	0,0148	SHC3	16735178	-2,29	0,0099	DCHS1
16751190	-3,06	0,0271	METTL7A	16851309	-2,28	0,0042	GREB1L
16980051	-3,00	0,0088	CLGN	17017641	-2,27	0,0213	TNXB
16832104	-2,99	0,0161	SLC47A1	16703407	-2,26	0,0069	APBB1IP
16705283	-2,95	0,0056	OTTHUMG18330	16816186	-2,26	0,0261	C16orf45
16848097	-2,94	0,0231	FAM20A	16840318	-2,26	0,0027	LOC728392

### 5.1.3.2 Komparative Analyse der Expressionsprofile von *BRCA1*<sup>mosMe</sup> vs. *BRCA1*<sup>wt</sup> Fibroblasten und *RSPO3/NREP*<sup>+/-</sup> vs. *RSPO3/NREP*<sup>+/+</sup> Einzelzellklone

Um auszuschließen, dass das in *BRCA1*<sup>mosMe</sup> Fibroblasten identifizierte CAF-spezifische Expressionsprofil auf die *RSPO3*- und/oder *NREP*-Deletion zurückzuführen sein könnte wurde die Gesamtheit der differenziell exprimierten Gene von *BRCA1*<sup>mosMe</sup> vs. *BRCA1*<sup>wt</sup> Fibroblasten sowie von *RSPO3/NREP*<sup>+/-</sup> vs. *RSPO3/NREP*<sup>+/+</sup> Einzelzellklonen verglichen. Beide Experimente wiesen weniger als 10% gemeinsam differenziell exprimierte Gene auf (Abb. 36). Davon waren 16 Gene nicht mit CAF-typischen Expressionsmustern assoziiert. Vier der gemeinsamen Gene, *ACTA2*, *COL11A1*, *FLG* und *PLOD2*, waren Teil der CAF-spezifischen Signatur die in *BRCA1*<sup>mosMe</sup> Fibroblasten identifiziert worden war. In *BRCA1*<sup>mosMe</sup> Fibroblasten waren diese Gene, wie für CAF-ähnliche Zellen typisch, stärker exprimiert als in den Kontrollfibroblasten *BRCA1*<sup>wt</sup>. Im Gegensatz dazu zeigten *RSPO3/NREP*<sup>+/-</sup> EZK eine niedrigere Expression dieser Gene als die EZK ohne die Deletionen (*RSPO3/NREP*<sup>+/+</sup> EZK). Zusammenfassend ließ sich aus den gewonnenen Daten kein Hinweis darauf ableiten, dass das CAF-spezifische Expressionsprofil der Ausgangskultur *BRCA1*<sup>mosMe</sup> mit den Deletionen der Gene *RSPO3* oder *NREP* in Zusammenhang steht.



**Abb. 36** Komparative Venn-Analyse der differenziell exprimierten Gene zwischen *BRCA1*<sup>wt</sup> vs. *BRCA1*<sup>mosMe</sup> Fibroblasten und *RSPO3/NREP*<sup>+/-</sup> vs. *RSPO3/NREP*<sup>+/+</sup> Einzelzellklonen-Fibroblasten. Die Analyse wurde durchgeführt mittels des Online-Tools VENNY [404].

# 6 Literatur

- [1] Mayo CH HW (1926) Carcinoma of the right segment of the colon. *Ann Surg* 83:357–63.
- [2] forsa Gesellschaft für Sozialforschung und statistische Analysen mbH (2014) Umfrage: Angst vor Krankheiten in Deutschland.
- [3] Harris Interactive for MetLife Foundation (2011) Survey: Most feared diseases in U.S.
- [4] Cancer Research UK (2011) YouGov Survey: Most feared diseases in UK.
- [5] Hanahan D, Weinberg R a, Francisco S (2000) The Hallmarks of Cancer. *Horm Res* 100:57–70.
- [6] Bericht des Zentrums für Krebsregisterdaten am Robert-Koch-Institut und der Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (2013) Krebs in Deutschland 2009/2010;
- [7] Bundesamt Statistische Pressestelle (2015) Pressemitteilung.
- [8] Kaatsch P, Spix J (2014) German Childhood Cancer Registry GCCR; Annual report 2013/14. Inst. Med. Biostat. Epidemiol. Informatics Univ. Med. Cent. Johannes Gutenb. Univ.
- [9] Evan GI, Vousden KH (2001) Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature* 411:342–8.
- [10] Maser RS, DePinho RA (2002) Connecting chromosomes, crisis, and cancer. *Science* 297:565–9.
- [11] Negrini S, Gorgoulis VG, Halazonetis TD (2010) Genomic instability--an evolving hallmark of cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11:220–228.
- [12] Stehelin D, Varmus HE, Bishop JM, Vogt PK (1976) DNA related to the transforming gene(s) of avian sarcoma viruses is present in normal avian DNA. *Nature* 260:170–3.

- [13] Weinberg RA (2007) *The Biology of Cancer*. New York, Garland Science.
- [14] Todd R, Wong DT Oncogenes. *Anticancer Res* 19:4729–46.
- [15] Shortt J, Johnstone RW (2012) Oncogenes in cell survival and cell death. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. doi: 10.1101/cshperspect.a009829
- [16] Anderson MW, Reynolds SH, You M, Maronpot RM (1992) Role of proto-oncogene activation in carcinogenesis. *Environ Health Perspect* 98:13–24.
- [17] Croce CM (2008) Oncogenes and cancer. *N Engl J Med* 358:502–11.
- [18] Nowell PC (2007) Discovery of the Philadelphia chromosome: a personal perspective. *J Clin Invest* 117:2033–5.
- [19] C NP, Hungerford DA (1960) Chromosome studies on normal and leukemic human leukocytes. *J Natl Cancer Inst* 25:85–109.
- [20] Kurzrock R, Kantarjian HM, Druker BJ, Talpaz M (2003) Philadelphia chromosome-positive leukemias: from basic mechanisms to molecular therapeutics. *Ann Intern Med* 138:819–30.
- [21] Knudson AG (2002) Cancer genetics. *Am J Med Genet* 111:96–102.
- [22] Lai AZ, Gujral TS, Mulligan LM (2007) RET signaling in endocrine tumors: delving deeper into molecular mechanisms. *Endocr Pathol* 18:57–67.
- [23] Marsh DJ, Mulligan LM, Eng C (1997) RET proto-oncogene mutations in multiple endocrine neoplasia type 2 and medullary thyroid carcinoma. *Horm Res* 47:168–78.
- [24] Mulligan LM, Kwok JB, Healey CS, Elsdon MJ, Eng C, Gardner E, Love DR, Mole SE, Moore JK, Papi L (1993) Germ-line mutations of the RET proto-oncogene in multiple endocrine neoplasia type 2A. *Nature* 363:458–60.
- [25] Nordling CO (1953) A new theory on cancer-inducing mechanism. *Br J Cancer* 7:68–72.
- [26] Knudson a G (1971) Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 68:820–823.
- [27] Tischfield JA (1997) Loss of heterozygosity or: how I learned to stop worrying and love mitotic recombination. *Am J Hum Genet* 61:995–9.
- [28] Balmain A, Gray J, Ponder B (2003) The genetics and genomics of cancer. *Nat Genet* 33 Suppl:238–44.

- 
- [29] Jaenisch R, Bird A (2003) Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat Genet* 33 Suppl:245–54.
- [30] Jones P a, Baylin SB (2002) The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet* 3:415–28.
- [31] Zilberman D (2007) The human promoter methylome. *Nat Genet* 39:442–3.
- [32] Sharma S, Kelly TK, Jones PA (2010) Epigenetics in cancer. *Carcinogenesis* 31:27–36.
- [33] Vogelstein B, Kinzler KW (2004) Cancer genes and the pathways they control. *Nat Med* 10:789–799.
- [34] Kinzler KW, Vogelstein B (1997) Cancer-susceptibility genes. Gatekeepers and caretakers. *Nature* 386:761, 763.
- [35] Macleod K (2000) Tumor suppressor genes. *Curr Opin Genet Dev* 10:81–93.
- [36] Michor F, Iwasa Y, Nowak M a (2004) Dynamics of cancer progression. *Nat Rev Cancer* 4:197–205.
- [37] Deininger P (1999) Genetic instability in cancer: caretaker and gatekeeper genes. *Ochsner J* 1:206–9.
- [38] van Heemst D, den Reijer PM, Westendorp RGJ (2007) Ageing or cancer: a review on the role of caretakers and gatekeepers. *Eur J Cancer* 43:2144–52.
- [39] Brauer HA, Makowski L, Hoadley KA, Casbas-Hernandez P, Lang LJ, Romàn-Pèrez E, D’Arcy M, Freerman AJ, Perou CM, Troester MA (2013) Impact of tumor microenvironment and epithelial phenotypes on metabolism in breast cancer. *Clin Cancer Res* 19:571–85.
- [40] Levitt NC, Hickson ID (2002) Caretaker tumour suppressor genes that defend genome integrity. *Trends Mol Med* 8:179–86.
- [41] Vogelstein B, Papadopoulos N, Velculescu VE, Zhou S, Diaz L a, Kinzler KW (2013) Cancer genome landscapes. *Science* 339:1546–58.
- [42] Quadrato G, Di Giovanni S (2012) Gatekeeper between quiescence and differentiation: p53 in axonal outgrowth and neurogenesis. *Int Rev Neurobiol* 105:71–89.
- [43] Golomb L, Volarevic S, Oren M (2014) p53 and ribosome biogenesis stress: the essentials. *FEBS Lett* 588:2571–9.

- [44] Srivastava S, Grizzle WE (2010) Biomarkers and the genetics of early neoplastic lesions. *Cancer Biomark* 9:41–64.
- [45] Kinzler KW, Vogelstein B (1998) Landscaping the cancer terrain. *Science* 280:1036–7.
- [46] Drake LE, Macleod KF (2014) Tumour suppressor gene function in carcinoma-associated fibroblasts: from tumour cells via EMT and back again? *J Pathol* 232:283–8.
- [47] Bissell MJ, Radisky D (2001) Putting tumours in context. *Nat Rev Cancer* 1:46–54.
- [48] Zheng L, Li S, Boyer TG, Lee WH (2000) Lessons learned from BRCA1 and BRCA2. *Oncogene* 19:6159–75.
- [49] Ainsley Weston CCH (2003) Gene-Environment Interactions and Interindividual Variation. *Cancer Med.*
- [50] Zhu Y, Ghosh P, Charnay P, Burns DK, Parada LF (2002) Neurofibromas in NF1: Schwann cell origin and role of tumor environment. *Science* 296:920–2.
- [51] Walkley CR, Shea JM, Sims NA, Purton LE, Orkin SH (2007) Rb Regulates Interactions between Hematopoietic Stem Cells and Their Bone Marrow Microenvironment. *Cell* 129:1081–1095.
- [52] Boveri T (2008) Concerning the origin of malignant tumours by Theodor Boveri. Translated and annotated by Henry Harris. *J Cell Sci* 121 Suppl:1–84.
- [53] Boveri T (1914) Zur Frage der Entstehung maligner Tumoren. Fischer Jena
- [54] Bauer KH (1928) Mutationstheorie der Geschwulst-Entstehung.
- [55] Nickels S, Truong T, Hein R, Stevens K, Buck K, Behrens S, Eilber U, Schmidt M, Häberle L, Vrieling A, Gaudet M, Figueroa J, Schoof N, et al. (2013) Evidence of gene-environment interactions between common breast cancer susceptibility loci and established environmental risk factors. *PLoS Genet* 9:e1003284.
- [56] Brennan P (2002) Gene-environment interaction and aetiology of cancer: what does it mean and how can we measure it? *Carcinogenesis* 23:381–7.
- [57] Lichtenstein P, Holm N V, Verkasalo PK, Iliadou A, Kaprio J, Koskenvuo M, Pukkala E, Skytthe A, Hemminki K (2000) Environmental and heritable factors in the causation of cancer--analyses of cohorts of twins from Sweden, Denmark, and Finland. *N Engl J Med* 343:78–85.

- [58] Anand P, Kunnumakkara AB, Kunnumakara AB, Sundaram C, Harikumar KB, Tharakan ST, Lai OS, Sung B, Aggarwal BB (2008) Cancer is a preventable disease that requires major lifestyle changes. *Pharm Res* 25:2097–116.
- [59] Robey RB, Weisz J, Kuemmerle NB, Salzberg AC, Berg A, Brown DG, Kubik L, Palorini R, Al-Mulla F, Al-Temaimi R, Colacci A, Mondello C, Raju J, et al. (2015) Metabolic reprogramming and dysregulated metabolism: cause, consequence and/or enabler of environmental carcinogenesis? *Carcinogenesis* 36 Suppl 1:S203–31.
- [60] Chen Z-M, Peto R, Iona A, Guo Y, Chen Y-P, Bian Z, Yang L, Zhang W-Y, Lu F, Chen J-S, Collins R, Li L-M, China Kadoorie Biobank Collaborative Group (2015) Emerging tobacco-related cancer risks in China: A nationwide, prospective study of 0.5 million adults. *Cancer* 121 Suppl:3097–106.
- [61] Parkin DM (2006) The global health burden of infection-associated cancers in the year 2002. *Int J Cancer* 118:3030–44.
- [62] Milner R, Wombwell H, Eckersley S, Barnes D, Warwicker J, Van Dorp E, Rowlinson R, Dearden S, Hughes G, Harbron C, Wellings B, Hodgson D, Womack C, et al. (2013) Validation of the BRCA1 antibody MS110 and the utility of BRCA1 as a patient selection biomarker in immunohistochemical analysis of breast and ovarian tumours. *Virchows Arch* 462:269–79.
- [63] zur Hausen H, de Villiers E-M (2014) Cancer “causation” by infections—individual contributions and synergistic networks. *Semin Oncol* 41:860–75.
- [64] Irigaray P, Newby JA, Clapp R, Hardell L, Howard V, Montagnier L, Epstein S, Belpomme D (2007) Lifestyle-related factors and environmental agents causing cancer: an overview. *Biomed Pharmacother* 61:640–58.
- [65] Pfeifer GP, Denissenko MF, Olivier M, Tretyakova N, Hecht SS, Hainaut P (2002) Tobacco smoke carcinogens, DNA damage and p53 mutations in smoking-associated cancers. *Oncogene* 21:7435–51.
- [66] Zhong Y, Carmella SG, Upadhyaya P, Hochalter JB, Rauch D, Oliver A, Jensen J, Hatsukami D, Wang J, Zimmerman C, Hecht SS (2011) Immediate consequences of cigarette smoking: rapid formation of polycyclic aromatic hydrocarbon diol epoxides. *Chem Res Toxicol* 24:246–52.
- [67] Hainaut P, Pfeifer GP (2001) Patterns of p53 G→T transversions in lung cancers reflect the primary mutagenic signature of DNA-damage by tobacco smoke. *Carcinogenesis* 22:367–74.
- [68] Gibbons DL, Byers LA, Kurie JM (2014) Smoking, p53 mutation, and lung cancer. *Mol Cancer Res* 12:3–13.

- [69] Cerdá C, Sánchez C, Climent B, Vázquez A, Iradi A, El Amrani F, Bediaga A, Sáez GT (2014) Oxidative stress and DNA damage in obesity-related tumorigenesis. *Adv Exp Med Biol* 824:5–17.
- [70] Bełtowski J, Wójcicka G, Górny D, Marciniak A (2000) The effect of dietary-induced obesity on lipid peroxidation, antioxidant enzymes and total plasma antioxidant capacity. *J Physiol Pharmacol* 51:883–96.
- [71] Il'yasova D, Wang F, Spasojevic I, Base K, D'Agostino RB, Wagenknecht LE (2012) Urinary F2-isoprostanes, obesity, and weight gain in the IRAS cohort. *Obesity (Silver Spring)* 20:1915–21.
- [72] Luperini BCO, Almeida DC, Porto MP, Marcondes JPC, Prado RP, Rasera I, Oliveira MRM, Salvadori DMF (2015) Gene polymorphisms and increased DNA damage in morbidly obese women. *Mutat Res* 776:111–7.
- [73] Berwick M, Vineis P (2000) Markers of DNA repair and susceptibility to cancer in humans: an epidemiologic review. *J Natl Cancer Inst* 92:874–897.
- [74] Nagel ZD, Margulies CM, Chaim IA, McRee SK, Mazzucato P, Ahmad A, Abo RP, Butty VL, Forget AL, Samson LD (2014) Multiplexed DNA repair assays for multiple lesions and multiple doses via transcription inhibition and transcriptional mutagenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111:E1823–32.
- [75] Roberts SA, Spreadborough AR, Bulman B, Barber JB, Evans DG, Scott D (1999) Heritability of cellular radiosensitivity: a marker of low-penetrance predisposition genes in breast cancer? *Am J Hum Genet* 65:784–94.
- [76] Smith TR, Levine EA, Freimanis RI, Akman SA, Allen GO, Hoang KN, Liu-Mares W, Hu JJ (2008) Polygenic model of DNA repair genetic polymorphisms in human breast cancer risk. *Carcinogenesis* 29:2132–8.
- [77] Mohrenweiser HW, Wilson DM, Jones IM (2003) Challenges and complexities in estimating both the functional impact and the disease risk associated with the extensive genetic variation in human DNA repair genes. *Mutat Res* 526:93–125.
- [78] Mohrenweiser HW, Xi T, Vázquez-Matías J, Jones IM (2002) Identification of 127 amino acid substitution variants in screening 37 DNA repair genes in humans. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 11:1054–64.
- [79] Thorstenson YR, Shen P, Tusher VG, Wayne TL, Davis RW, Chu G, Oefner PJ (2001) Global analysis of ATM polymorphism reveals significant functional constraint. *Am J Hum Genet* 69:396–412.



- 
- [80] Cornetta T, Festa F, Testa A, Cozzi R (2006) DNA damage repair and genetic polymorphisms: assessment of individual sensitivity and repair capacity. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 66:537–45.
- [81] Slager SL, Rabe KG, Achenbach SJ, Vachon CM, Goldin LR, Strom SS, Lanasa MC, Spector LG, Rassenti LZ, Leis JF, Camp NJ, Glenn M, Kay NE, et al. (2011) Genome-wide association study identifies a novel susceptibility locus at 6p21 . 3 among familial CLL. *Cancer* 117:1911–1916.
- [82] Savage SA, Mirabello L, Wang Z, Gastier-Foster JM, Gorlick R, Khanna C, Flanagan AM, Tirabosco R, Andrulis IL, Wunder JS, Gokgoz N, Patiño-Garcia A, Sierrasesúmaga L, et al. (2013) Genome-wide association study identifies two susceptibility loci for osteosarcoma. *Nat Genet* 45:799–803.
- [83] Fachal L, Dunning AM (2015) From candidate gene studies to GWAS and post-GWAS analyses in breast cancer. *Curr Opin Genet Dev* 30:32–41.
- [84] Easton DF, Eeles RA (2008) Genome-wide association studies in cancer. *Hum Mol Genet* 17:R109–15.
- [85] Pharoah PDP, Antoniou A, Bobrow M, Zimmern RL, Easton DF, Ponder BAJ (2002) Polygenic susceptibility to breast cancer and implications for prevention. *Nat Genet* 31:33–6.
- [86] Mavaddat N, Pharoah PDP, Michailidou K, Tyrer J, Brook MN, Bolla MK, Wang Q, Dennis J, Dunning AM, Shah M, Luben R, Brown J, Bojesen SE, et al. (2015) Prediction of breast cancer risk based on profiling with common genetic variants. *J Natl Cancer Inst.* doi: 10.1093/jnci/djv036
- [87] Pérez-Morales R, Méndez-Ramírez I, Moreno-Macias H, Mendoza-Posadas AD, Martínez-Ramírez OC, Castro-Hernández C, Gonsebatt ME, Rubio J (2014) Genetic susceptibility to lung cancer based on candidate genes in a sample from the Mexican Mestizo population: a case-control study. *Lung* 192:167–73.
- [88] Machiela MJ, Chen C-Y, Chen C, Chanock SJ, Hunter DJ, Kraft P (2011) Evaluation of polygenic risk scores for predicting breast and prostate cancer risk. *Genet Epidemiol* 35:506–14.
- [89] National Institute for Clinical Excellence (NICE). (2013) Familial breast cancer: Classification and care of people at risk of familial breast cancer and management of breast cancer and related risks in people with a family history of breast cancer (CG164). London NICE
- [90] Burch PR (1963) Human cancer: Mendelian inheritance or vertical transmission? *Nature* 197:1042–5.

- [91] Newman B, Austin MA, Lee M, King MC (1988) Inheritance of human breast cancer: evidence for autosomal dominant transmission in high-risk families. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85:3044–8.
- [92] Nagy R, Sweet K, Eng C (2004) Highly penetrant hereditary cancer syndromes. *Oncogene* 23:6445–70.
- [93] Friend SH, Bernards R, Rogelj S, Weinberg RA, Rapaport JM, Albert DM, Dryja TP A human DNA segment with properties of the gene that predisposes to retinoblastoma and osteosarcoma. *Nature* 323:643–6.
- [94] Lee WH, Bookstein R, Hong F, Young LJ, Shew JY, Lee EY (1987) Human retinoblastoma susceptibility gene: cloning, identification, and sequence. *Science* 235:1394–9.
- [95] Weinberg RA (1995) The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell* 81:323–30.
- [96] Linzer DI, Levine AJ (1979) Characterization of a 54K dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells. *Cell* 17:43–52.
- [97] Malkin D, Li FP, Strong LC, Fraumeni JF, Nelson CE, Kim DH, Kassel J, Gryka MA, Bischoff FZ, Tainsky MA (1990) Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms. *Science* 250:1233–8.
- [98] Miki Y, Swensen J, Shattuck-eidens D, Futreal PA, Harshman K, Tavtigian S, Liu Q, Cochran C, Bennett LM, Ding W, Bell R, Rosenthal J, Hussey C, et al. (1994) Strong Candidate for the Breast and Ovarian Cancer. *Science* (80- ) 266:66–71.
- [99] Wooster R, Neuhausen SL, Mangion J, Quirk Y, Ford D, Collins N, Nguyen K, Seal S, Tran T, Averill D (1994) Localization of a breast cancer susceptibility gene, BRCA2, to chromosome 13q12-13. *Science* 265:2088–2090.
- [100] van Steeg H, Kraemer KH (1999) Xeroderma pigmentosum and the role of UV-induced DNA damage in skin cancer. *Mol Med Today* 5:86–94.
- [101] Kraemer KH, Patronas NJ, Schiffmann R, Brooks BP, Tamura D, DiGiovanna JJ (2007) Xeroderma pigmentosum, trichothiodystrophy and Cockayne syndrome: a complex genotype-phenotype relationship. *Neuroscience* 145:1388–96.
- [102] Kraemer KH DJ Xeroderma Pigmentosum. 2003 Jun 20 [Updated 2014 Feb 13]. In: Pagon RA, Adam MP, Ardinger HH, et al., editors. GeneReviews® [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2015. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1397/>.

- 
- [103] Fletcher O, Houlston RS (2010) Architecture of inherited susceptibility to common cancer. *Nat Rev Cancer* 10:353–361.
- [104] Smith TM, Lee MK, Szabo CI, Jerome N, McEuen M, Taylor M, Hood L, King MC (1996) Complete genomic sequence and analysis of 117 kb of human DNA containing the gene BRCA1. *Genome Res* 6:1029–49.
- [105] Xu CF, Brown MA, Nicolai H, Chambers JA, Griffiths BL, Solomon E (1997) Isolation and characterisation of the NBR2 gene which lies head to head with the human BRCA1 gene. *Hum Mol Genet* 6:1057–62.
- [106] Chen Y, Farmer AA, Chen CF, Jones DC, Chen PL, Lee WH (1996) BRCA1 is a 220-kDa nuclear phosphoprotein that is expressed and phosphorylated in a cell cycle-dependent manner. *Cancer Res* 56:3168–72.
- [107] Meza JE, Brzovic PS, King MC, Klevit RE (1999) Mapping the functional domains of BRCA1. Interaction of the ring finger domains of BRCA1 and BARD1. *J Biol Chem* 274:5659–65.
- [108] Koonin E V, Altschul SF, Bork P (1996) BRCA1 protein products ... Functional motifs... *Nat Genet* 13:266–8.
- [109] Chen CF, Li S, Chen Y, Chen PL, Sharp ZD, Lee WH (1996) The nuclear localization sequences of the BRCA1 protein interact with the importin-alpha subunit of the nuclear transport signal receptor. *J Biol Chem* 271:32863–8.
- [110] Hu YF, Miyake T, Ye Q, Li R (2000) Characterization of a novel trans-activation domain of BRCA1 that functions in concert with the BRCA1 C-terminal (BRCT) domain. *J Biol Chem* 275:40910–5.
- [111] Callebaut I, Mornon JP (1997) From BRCA1 to RAP1: a widespread BRCT module closely associated with DNA repair. *FEBS Lett* 400:25–30.
- [112] Henderson BR (2012) The BRCA1 Breast Cancer Suppressor: Regulation of Transport, Dynamics, and Function at Multiple Subcellular Locations. *Scientifica (Cairo)* 2012:796808.
- [113] Lafarge S, Montané M-H (2003) Characterization of Arabidopsis thaliana ortholog of the human breast cancer susceptibility gene 1: AtBRCA1, strongly induced by gamma rays. *Nucleic Acids Res* 31:1148–55.
- [114] Szabo CI, Wagner LA, Francisco L V, Roach JC, Argonza R, King MC, Ostrander EA (1996) Human, canine and murine BRCA1 genes: sequence comparison among species. *Hum Mol Genet* 5:1289–98.

- [115] Joukov V, Chen J, Fox EA, Green JB, Livingston DM (2001) Functional communication between endogenous BRCA1 and its partner, BARD1, during *Xenopus laevis* development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:12078–83.
- [116] Abel KJ, Xu J, Yin GY, Lyons RH, Meisler MH, Weber BL (1995) Mouse Brca1: localization sequence analysis and identification of evolutionarily conserved domains. *Hum Mol Genet* 4:2265–73.
- [117] Ramirez CJ, Fleming MA, Potter JD, Ostrander GK, Ostrander EA (2004) Marsupial BRCA1: conserved regions in mammals and the potential effect of missense changes. *Oncogene* 23:1780–8.
- [118] Narod S a, Foulkes WD (2004) BRCA1 and BRCA2: 1994 and beyond. *Nat Rev Cancer* 4:665–76.
- [119] Scully R, Ganesan S, Vlasakova K, Chen J, Socolovsky M, Livingston DM (1999) Genetic analysis of BRCA1 function in a defined tumor cell line. *Mol Cell* 4:1093–9.
- [120] Fleck O, Nielsen O (2004) DNA repair. *J Cell Sci* 117:515–7.
- [121] Bernstein C, Bernstein H, Payne CM, Garewal H (2002) DNA repair/pro-apoptotic dual-role proteins in five major DNA repair pathways: fail-safe protection against carcinogenesis. *Mutat Res* 511:145–78.
- [122] Helleday T, Eshtad S, Nik-Zainal S (2014) Mechanisms underlying mutational signatures in human cancers. *Nat Rev Genet* 15:585–598.
- [123] Scully R, Chen J, Plug A, Xiao Y, Weaver D, Feunteun J, Ashley T, Livingston DM (1997) Association of BRCA1 with Rad51 in mitotic and meiotic cells. *Cell* 88:265–75.
- [124] Tarsounas M, Davies D, West SC (2003) BRCA2-dependent and independent formation of RAD51 nuclear foci. *Oncogene* 22:1115–1123.
- [125] Coene ED, Hollinshead MS, Waeytens AAT, Schelfhout VRJ, Eechaute WP, Shaw MK, Van Oostveldt PM V, Vaux DJ (2005) Phosphorylated BRCA1 is predominantly located in the nucleus and mitochondria. *Mol Biol Cell* 16:997–1010.
- [126] Zhang J, Willers H, Feng Z, Ghosh JC, Kim S, Weaver DT, Chung JH, Powell SN, Xia F (2004) Chk2 phosphorylation of BRCA1 regulates DNA double-strand break repair. *Mol Cell Biol* 24:708–18.
- [127] Gatei M, Scott SP, Filippovitch I, Soronika N, Lavin MF, Weber B, Khanna KK (2000) Role for ATM in DNA damage-induced phosphorylation of BRCA1. *Cancer Res* 60:3299–304.

- [128] Wang Y, Cortez D, Yazdi P, Neff N, Elledge SJ, Qin J (2000) BASC, a super complex of BRCA1-associated proteins involved in the recognition and repair of aberrant DNA structures. *Genes Dev* 14:927–39.
- [129] Gudmundsdottir K, Ashworth A (2006) The roles of BRCA1 and BRCA2 and associated proteins in the maintenance of genomic stability. *Oncogene* 25:5864–74.
- [130] Le Page F, Randrianarison V, Marot D, Cabannes J, Perricaudet M, Feunteun J, Sarasin A (2000) BRCA1 and BRCA2 are necessary for the transcription-coupled repair of the oxidative 8-oxoguanine lesion in human cells. *Cancer Res* 60:5548–52.
- [131] Hartman A-R, Ford JM (2002) BRCA1 induces DNA damage recognition factors and enhances nucleotide excision repair. *Nat Genet* 32:180–4.
- [132] Bau D-T, Mau Y-C, Shen C-Y (2006) The role of BRCA1 in non-homologous end-joining. *Cancer Lett* 240:1–8.
- [133] Jiang G, Plo I, Wang T, Rahman M, Cho JH, Yang E, Lopez BS, Xia F (2013) BRCA1-Ku80 protein interaction enhances end-joining fidelity of chromosomal double-strand breaks in the G1 phase of the cell cycle. *J Biol Chem* 288:8966–76.
- [134] Gudas JM, Li T, Nguyen H, Jensen D, Rauscher FJ, Cowan KH (1996) Cell cycle regulation of BRCA1 messenger RNA in human breast epithelial cells. *Cell Growth Differ* 7:717–23.
- [135] Rajan J V, Wang M, Marquis ST, Chodosh LA (1996) Brca2 is coordinately regulated with Brca1 during proliferation and differentiation in mammary epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:13078–83.
- [136] Reed SI, Bailly E, Dulic V, Hengst L, Resnitzky D, Slingerland J (1994) G1 control in mammalian cells. *J Cell Sci Suppl* 18:69–73.
- [137] Kuerbitz SJ, Plunkett BS, Walsh W V, Kastan MB (1992) Wild-type p53 is a cell cycle checkpoint determinant following irradiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:7491–7495.
- [138] Fabbro M, Savage K, Hobson K, Deans AJ, Powell SN, McArthur GA, Khanna KK (2004) BRCA1-BARD1 complexes are required for p53Ser-15 phosphorylation and a G1/S arrest following ionizing radiation-induced DNA damage. *J Biol Chem* 279:31251–8.
- [139] Shorrocks J, Tobi SE, Latham H, Peacock JH, Eeles R, Eccles D, McMillan TJ (2004) Primary fibroblasts from BRCA1 heterozygotes display an abnormal G1/S cell cycle checkpoint following UVA irradiation but show normal levels of micronuclei following oxidative stress or mitomycin C treatment. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 58:470–8.

- [140] Larner JM, Lee H, Hamlin JL (1997) S phase damage sensing checkpoints in mammalian cells. *Cancer Surv* 29:25–45.
- [141] Xu B, Kim St, Kastan MB (2001) Involvement of Brca1 in S-phase and G(2)-phase checkpoints after ionizing irradiation. *Mol Cell Biol* 21:3445–50.
- [142] Taniguchi T, Garcia-Higuera I, Andreassen PR, Gregory RC, Grompe M, D’Andrea AD (2002) S-phase-specific interaction of the Fanconi anemia protein, FANCD2, with BRCA1 and RAD51. *Blood* 100:2414–2420.
- [143] Hussain S, Wilson JB, Medhurst AL, Hejna J, Witt E, Ananth S, Davies A, Masson J-Y, Moses R, West SC, de Winter JP, Ashworth A, Jones NJ, et al. (2004) Direct interaction of FANCD2 with BRCA2 in DNA damage response pathways. *Hum Mol Genet* 13:1241–8.
- [144] Yu X, Chen J (2004) DNA damage-induced cell cycle checkpoint control requires CtIP, a phosphorylation-dependent binding partner of BRCA1 C-terminal domains. *Mol Cell Biol* 24:9478–86.
- [145] Cuddihy AR, O’Connell MJ (2003) Cell-cycle responses to DNA damage in G2. *Int Rev Cytol* 222:99–140.
- [146] O’Connell MJ, Raleigh JM, Verkade HM, Nurse P (1997) Chk1 is a wee1 kinase in the G2 DNA damage checkpoint inhibiting cdc2 by Y15 phosphorylation. *EMBO J* 16:545–54.
- [147] Tibbetts RS (2000) Functional interactions between BRCA1 and the checkpoint kinase ATR during genotoxic stress. *Genes Dev* 14:2989–3002.
- [148] Okada S, Ouchi T (2003) Cell cycle differences in DNA damage-induced BRCA1 phosphorylation affect its subcellular localization. *J Biol Chem* 278:2015–20.
- [149] Bochar DA, Wang L, Beniya H, Kinev A, Xue Y, Lane WS, Wang W, Kashanchi F, Shiekhattar R (2000) BRCA1 is associated with a human SWI/SNF-related complex: linking chromatin remodeling to breast cancer. *Cell* 102:257–65.
- [150] Peng M, Litman R, Jin Z, Fong G, Cantor SB (2006) BACH1 is a DNA repair protein supporting BRCA1 damage response. *Oncogene* 25:2245–53.
- [151] Baer R, Ludwig T (2002) The BRCA1/BARD1 heterodimer, a tumor suppressor complex with ubiquitin E3 ligase activity. *Curr Opin Genet Dev* 12:86–91.
- [152] Gu Y, Bouwman P, Greco D, Saarela J, Yadav B, Jonkers J, Kuznetsov SG (2014) Suppression of BRCA1 sensitizes cells to proteasome inhibitors. *Cell Death Dis* 5:e1580.

- [153] Shabbeer S, Omer D, Berneman D, Weitzman O, Alpaugh A, Pietraszkiewicz A, Metsuyanin S, Shainskaya A, Papa MZ, Yarden RI (2013) BRCA1 targets G2/M cell cycle proteins for ubiquitination and proteasomal degradation. *Oncogene* 32:5005–16.
- [154] Yu X, Fu S, Lai M, Baer R, Chen J (2006) BRCA1 ubiquitinates its phosphorylation-dependent binding partner CtIP. *Genes Dev* 20:1721–6.
- [155] Kalb R, Mallery DL, Larkin C, Huang JTJ, Hiom K (2014) BRCA1 is a histone-H2A-specific ubiquitin ligase. *Cell Rep* 8:999–1005.
- [156] Huen MSY, Sy SMH, Chen J (2010) BRCA1 and its toolbox for the maintenance of genome integrity. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11:138–48.
- [157] Jiang Q, Greenberg RA (2015) Deciphering the BRCA1 Tumor Suppressor Network. *J Biol Chem* 290:17724–32.
- [158] Zhu Q, Pao GM, Huynh AM, Suh H, Tonnu N, Nederlof PM, Gage FH, Verma IM (2011) BRCA1 tumour suppression occurs via heterochromatin-mediated silencing. *Nature* 477:179–84.
- [159] Mann GJ, Thorne H, Balleine RL, Butow PN, Clarke CL, Edkins E, Evans GM, Fereday S, Haan E, Gattas M, Giles GG, Goldblatt J, Hopper JL, et al. (2006) Analysis of cancer risk and BRCA1 and BRCA2 mutation prevalence in the kConFab familial breast cancer resource. *Breast Cancer Res* 8:R12.
- [160] Petrucelli N, Daly MB, Feldman GL (2010) Hereditary breast and ovarian cancer due to mutations in BRCA1 and BRCA2. *Genet Med* 12:245–59.
- [161] Ferla R, Calò V, Cascio S, Rinaldi G, Badalamenti G, Carreca I, Surmacz E, Colucci G, Bazan V, Russo A (2007) Founder mutations in BRCA1 and BRCA2 genes. *Ann Oncol* 18 Suppl 6:vi93–8.
- [162] Manchanda R, Loggenberg K, Sanderson S, Burnell M, Wardle J, Gessler S, Side L, Balogun N, Desai R, Kumar A, Dorkins H, Wallis Y, Chapman C, et al. (2015) Population testing for cancer predisposing BRCA1/BRCA2 mutations in the Ashkenazi-Jewish community: a randomized controlled trial. *J Natl Cancer Inst* 107:379.
- [163] Evans DG, Shenton A, Woodward E, Lalloo F, Howell A, Maher ER (2008) Penetrance estimates for BRCA1 and BRCA2 based on genetic testing in a Clinical Cancer Genetics service setting: risks of breast/ovarian cancer quoted should reflect the cancer burden in the family. *BMC Cancer* 8:155.
- [164] Feuer EJ, Wun LM, Boring CC, Flanders WD, Timmel MJ, Tong T (1993) The lifetime risk of developing breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 85:892–7.

- [165] Liede A, Karlan BY, Narod SA (2004) Cancer risks for male carriers of germline mutations in BRCA1 or BRCA2: a review of the literature. *J Clin Oncol* 22:735–42.
- [166] Brose MS, Rebbeck TR, Calzone KA, Stopfer JE, Nathanson KL, Weber BL (2002) Cancer risk estimates for BRCA1 mutation carriers identified in a risk evaluation program. *J Natl Cancer Inst* 94:1365–72.
- [167] Friedenson B (2005) BRCA1 and BRCA2 pathways and the risk of cancers other than breast or ovarian. *MedGenMed* 7:60.
- [168] Friedenson B (2007) The BRCA1/2 pathway prevents hematologic cancers in addition to breast and ovarian cancers. *BMC Cancer* 7:152.
- [169] Mersch J, Jackson MA, Park M, Nebgen D, Peterson SK, Singletary C, Arun BK, Litton JK (2015) Cancers associated with BRCA1 and BRCA2 mutations other than breast and ovarian. *Cancer* 121:269–75.
- [170] Kadouri L, Hubert A, Rotenberg Y, Hamburger T, Sagi M, Nechushtan C, Abeliovich D, Peretz T (2007) Cancer risks in carriers of the BRCA1/2 Ashkenazi founder mutations. *J Med Genet* 44:467–71.
- [171] Gruber SB, Petersen GM (2002) Cancer risks in BRCA1 carriers: time for the next generation of studies. *J Natl Cancer Inst* 94:1344–5.
- [172] Ludwig T, Chapman DL, Papaioannou VE, Efstratiadis A (1997) Targeted mutations of breast cancer susceptibility gene homologs in mice: Lethal phenotypes of Brca1, Brca2, Brca1/Brca2, Brca1/p53, and Brca2/p53 nullizygous embryos. *Genes Dev* 11:1226–1241.
- [173] Hakem R, de la Pompa JL, Sirard C, Mo R, Woo M, Hakem A, Wakeham A, Potter J, Reitmair A, Billia F, Firpo E, Hui CC, Roberts J, et al. (1996) The tumor suppressor gene Brca1 is required for embryonic cellular proliferation in the mouse. *Cell* 85:1009–23.
- [174] Gowen LC, Johnson BL, Latour AM, Sulik KK, Koller BH (1996) Brca1 deficiency results in early embryonic lethality characterized by neuroepithelial abnormalities. *Nat Genet* 12:191–194.
- [175] Domchek SM, Tang J, Stopfer J, Lilli DR, Hamel N, Tischkowitz M, Monteiro ANA, Messick TE, Powers J, Yonker A, Couch FJ, Goldgar DE, Davidson HR, et al. (2013) Biallelic deleterious BRCA1 mutations in a woman with early-onset ovarian cancer. *Cancer Discov* 3:399–405.
- [176] Sawyer SL, Tian L, Kähkönen M, Schwartzentruber J, Kircher M, University of Washington Centre for Mendelian Genomics, FORGE Canada Consortium, Majewski J, Dymant DA, Innes AM, Boycott KM, Moreau LA, Moilanen JS, et al. (2015) Biallelic mutations in BRCA1 cause a new Fanconi anemia subtype. *Cancer Discov* 5:135–42.



- [177] Lee EY-HP, Abbondante S (2014) Tissue-specific tumor suppression by BRCA1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111:4353–4.
- [178] Wu J, Williams D, Walter GA, Thompson WE, Sidell N (2014) Estrogen increases Nrf2 activity through activation of the PI3K pathway in MCF-7 breast cancer cells. *Exp Cell Res* 328:351–60.
- [179] Nguyen T, Nioi P, Pickett CB (2009) The Nrf2-antioxidant response element signaling pathway and its activation by oxidative stress. *J Biol Chem* 284:13291–5.
- [180] Gorrini C, Baniasadi PS, Harris IS, Silvester J, Inoue S, Snow B, Joshi PA, Wakeham A, Molyneux SD, Martin B, Bouwman P, Cescon DW, Elia AJ, et al. (2013) BRCA1 interacts with Nrf2 to regulate antioxidant signaling and cell survival. *J Exp Med* 210:1529–44.
- [181] Gorrini C, Gang BP, Bassi C, Wakeham A, Baniasadi SP, Hao Z, Li WY, Cescon DW, Li Y-T, Molyneux S, Penrod N, Lupien M, Schmidt EE, et al. (2014) Estrogen controls the survival of BRCA1-deficient cells via a PI3K-NRF2-regulated pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111:4472–7.
- [182] Park JJ, Irvine RA, Buchanan G, Koh SS, Park JM, Tilley WD, Stallcup MR, Press MF, Coetzee GA (2000) Breast cancer susceptibility gene 1 (BRCA1) is a coactivator of the androgen receptor. *Cancer Res* 60:5946–9.
- [183] Yeh S, Hu YC, Rahman M, Lin HK, Hsu CL, Ting HJ, Kang HY, Chang C (2000) Increase of androgen-induced cell death and androgen receptor transactivation by BRCA1 in prostate cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:11256–61.
- [184] Da Silva L, Lakhani SR (2010) Pathology of hereditary breast cancer. *Mod Pathol* 23 Suppl 2:S46–51.
- [185] Lakhani SR, Jacquemier J, Sloane JP, Gusterson BA, Anderson TJ, van de Vijver MJ, Farid LM, Venter D, Antoniou A, Storer-Isser A, Smyth E, Steel CM, Haites N, et al. (1998) Multifactorial analysis of differences between sporadic breast cancers and cancers involving BRCA1 and BRCA2 mutations. *J Natl Cancer Inst* 90:1138–45.
- [186] Chappuis PO, Nethercot V, Foulkes WD (2000) Clinico-pathological characteristics of BRCA1- and BRCA2-related breast cancer. *Semin Surg Oncol* 18:287–95.
- [187] Turner NC, Reis-Filho JS (2006) Basal-like breast cancer and the BRCA1 phenotype. *Oncogene* 25:5846–53.
- [188] Smith PD, Crossland S, Parker G, Osin P, Brooks L, Waller J, Philp E, Crompton MR, Gusterson BA, Allday MJ, Crook T (1999) Novel p53 mutants selected in BRCA-associated

tumours which dissociate transformation suppression from other wild-type p53 functions. *Oncogene* 18:2451–9.

[189] Greenblatt MS, Chappuis PO, Bond JP, Hamel N, Foulkes WD (2001) TP53 mutations in breast cancer associated with BRCA1 or BRCA2 germ-line mutations: distinctive spectrum and structural distribution. *Cancer Res* 61:4092–7.

[190] Futreal PA, Liu Q, Shattuck-Eidens D, Cochran C, Harshman K, Tavtigian S, Bennett LM, Haugen-Strano A, Swensen J, Miki Y (1994) BRCA1 mutations in primary breast and ovarian carcinomas. *Science* 266:120–2.

[191] Cleton-Jansen AM, Collins N, Lakhani SR, Weissenbach J, Devilee P, Cornelisse CJ, Stratton MR (1995) Loss of heterozygosity in sporadic breast tumours at the BRCA2 locus on chromosome 13q12-q13. *Br J Cancer* 72:1241–4.

[192] Wilson CA, Ramos L, Villaseñor MR, Anders KH, Press MF, Clarke K, Karlan B, Chen JJ, Scully R, Livingston D, Zuch RH, Kanter MH, Cohen S, et al. (1999) Localization of human BRCA1 and its loss in high-grade, non-inherited breast carcinomas. *Nat Genet* 21:236–40.

[193] Russell PA, Pharoah PD, De Foy K, Ramus SJ, Symmonds I, Wilson A, Scott I, Ponder BA, Gayther SA (2000) Frequent loss of BRCA1 mRNA and protein expression in sporadic ovarian cancers. *Int J Cancer* 87:317–21.

[194] Esteller M, Silva JM, Dominguez G, Bonilla F, Matias-Guiu X, Lerma E, Bussaglia E, Prat J, Harkes IC, Repasky EA, Gabrielson E, Schutte M, Baylin SB, et al. (2000) Promoter hypermethylation and BRCA1 inactivation in sporadic breast and ovarian tumors. *J Natl Cancer Inst* 92:564–569.

[195] Kulis M, Esteller M (2010) DNA methylation and cancer. *Adv Genet* 70:27–56.

[196] Baldwin RL, Nemeth E, Tran H, Shvartsman H, Cass I, Narod S, Karlan BY (2000) BRCA1 promoter region hypermethylation in ovarian carcinoma: a population-based study. *Cancer Res* 60:5329–33.

[197] Catteau A, Harris WH, Xu CF, Solomon E (1999) Methylation of the BRCA1 promoter region in sporadic breast and ovarian cancer: correlation with disease characteristics. *Oncogene* 18:1957–65.

[198] Turner N, Tutt A, Ashworth A (2004) Hallmarks of “BRCAness” in sporadic cancers. *Nat Rev Cancer* 4:814–9.

[199] Rice JC, Ozcelik H, Maxeiner P, Andrulis I, Futscher BW (2000) Methylation of the BRCA1 promoter is associated with decreased BRCA1 mRNA levels in clinical breast cancer specimens. *Carcinogenesis* 21:1761–5.

- 
- [200] Waddington CH (2012) The epigenotype. 1942. *Int J Epidemiol* 41:10–3.
- [201] Egger G, Liang G, Aparicio A, Jones PA (2004) Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature* 429:457–63.
- [202] Stower H (2011) Epigenetics: Dynamic DNA methylation. *Nat Rev Genet* 13:75.
- [203] Li B, Carey M, Workman JL (2007) The role of chromatin during transcription. *Cell* 128:707–19.
- [204] Kouzarides T (2007) Chromatin modifications and their function. *Cell* 128:693–705.
- [205] Volpe TA, Kidner C, Hall IM, Teng G, Grewal SIS, Martienssen RA (2002) Regulation of heterochromatic silencing and histone H3 lysine-9 methylation by RNAi. *Science* 297:1833–7.
- [206] Djupedal I, Ekwall K (2009) Epigenetics: heterochromatin meets RNAi. *Cell Res* 19:282–95.
- [207] Meda F, Folci M, Baccarelli A, Selmi C (2011) The epigenetics of autoimmunity. *Cell Mol Immunol* 8:226–36.
- [208] Tsankova N, Renthal W, Kumar A, Nestler EJ (2007) Epigenetic regulation in psychiatric disorders. *Nat Rev Neurosci* 8:355–67.
- [209] Sawan C, Vaissière T, Murr R, Herceg Z (2008) Epigenetic drivers and genetic passengers on the road to cancer. *Mutat Res Mol Mech Mutagen* 642:1–13.
- [210] Hotchkiss RD (1948) The quantitative separation of purines, pyrimidines, and nucleosides by paper chromatography. *J Biol Chem* 175:315–32.
- [211] Schübeler D (2015) Function and information content of DNA methylation. *Nature* 517:321–6.
- [212] Lister R, Pelizzola M, Dowen RH, Hawkins RD, Hon G, Tonti-Filippini J, Nery JR, Lee L, Ye Z, Ngo Q-M, Edsall L, Antosiewicz-Bourget J, Stewart R, et al. (2009) Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences. *Nature* 462:315–22.
- [213] Bird AP CpG-rich islands and the function of DNA methylation. *Nature* 321:209–13.
- [214] Bird A, Taggart M, Frommer M, Miller OJ, Macleod D (1985) A fraction of the mouse genome that is derived from islands of nonmethylated, CpG-rich DNA. *Cell* 40:91–9.
- [215] Jones PA (2012) Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. *Nat Rev Genet* 13:484–92.

- [216] Fazzari MJ, Grealley JM (2004) Epigenomics: beyond CpG islands. *Nat Rev Genet* 5:446–55.
- [217] Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, Devon K, Dewar K, Doyle M, FitzHugh W, Funke R, Gage D, Harris K, et al. (2001) Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409:860–921.
- [218] Larsen F, Gundersen G, Lopez R, Prydz H (1992) CpG islands as gene markers in the human genome. *Genomics* 13:1095–107.
- [219] Zhu J, He F, Hu S, Yu J (2008) On the nature of human housekeeping genes. *Trends Genet* 24:481–4.
- [220] Wolffe AP, Matzke MA (1999) Epigenetics: regulation through repression. *Science* 286:481–6.
- [221] Medvedeva YA, Khamis AM, Kulakovskiy I V, Ba-Alawi W, Bhuyan MSI, Kawaji H, Lassmann T, Harbers M, Forrest ARR, Bajic VB, FANTOM consortium (2014) Effects of cytosine methylation on transcription factor binding sites. *BMC Genomics* 15:119.
- [222] Tate PH, Bird AP (1993) Effects of DNA methylation on DNA-binding proteins and gene expression. *Curr Opin Genet Dev* 3:226–31.
- [223] Choy M-K, Movassagh M, Goh H-G, Bennett MR, Down TA, Foo RSY (2010) Genome-wide conserved consensus transcription factor binding motifs are hyper-methylated. *BMC Genomics* 11:519.
- [224] Wang H, Maurano MT, Qu H, Varley KE, Gertz J, Pauli F, Lee K, Canfield T, Weaver M, Sandstrom R, Thurman RE, Kaul R, Myers RM, et al. (2012) Widespread plasticity in CTCF occupancy linked to DNA methylation. *Genome Res* 22:1680–8.
- [225] Chatterjee R, Vinson C (2012) CpG methylation recruits sequence specific transcription factors essential for tissue specific gene expression. *Biochim Biophys Acta* 1819:763–70.
- [226] Li L, Chen B-F, Chan W-Y (2015) An Epigenetic Regulator: Methyl-CpG-Binding Domain Protein 1 (MBD1). *Int J Mol Sci* 16:5125–5140.
- [227] Nan X, Ng HH, Johnson CA, Laherty CD, Turner BM, Eisenman RN, Bird A (1998) Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. *Nature* 393:386–9.

- [228] Gama-Sosa MA, Slagel VA, Trewyn RW, Oxenhandler R, Kuo KC, Gehrke CW, Ehrlich M (1983) The 5-methylcytosine content of DNA from human tumors. *Nucleic Acids Res* 11:6883–94.
- [229] Eden A, Gaudet F, Waghmare A, Jaenisch R (2003) Chromosomal instability and tumors promoted by DNA hypomethylation. *Science* 300:455.
- [230] Hansen KD, Timp W, Bravo HC, Sabunciyan S, Langmead B, McDonald OG, Wen B, Wu H, Liu Y, Diep D, Briem E, Zhang K, Irizarry RA, et al. (2011) Increased methylation variation in epigenetic domains across cancer types. *Nat Genet* 43:768–75.
- [231] Ehrlich M (2002) DNA methylation in cancer: too much, but also too little. *Oncogene* 21:5400–13.
- [232] Weber M, Hellmann I, Stadler MB, Ramos L, Pääbo S, Rebhan M, Schübeler D (2007) Distribution, silencing potential and evolutionary impact of promoter DNA methylation in the human genome. *Nat Genet* 39:457–66.
- [233] Costello JF, Frühwald MC, Smiraglia DJ, Rush LJ, Robertson GP, Gao X, Wright FA, Feramisco JD, Peltomäki P, Lang JC, Schuller DE, Yu L, Bloomfield CD, et al. (2000) Aberrant CpG-island methylation has non-random and tumour-type-specific patterns. *Nat Genet* 24:132–8.
- [234] Lange CPE, Campan M, Hinoue T, Schmitz RF, van der Meulen-de Jong AE, Slingerland H, Kok PJMJ, van Dijk CM, Weisenberger DJ, Shen H, Tollenaar RAEM, Laird PW (2012) Genome-Scale Discovery of DNA-Methylation Biomarkers for Blood-Based Detection of Colorectal Cancer. *PLoS One* 7:e50266.
- [235] Issa J-P (2004) CpG island methylator phenotype in cancer. *Nat Rev Cancer* 4:988–93.
- [236] Hughes LAE, Melotte V, de Schrijver J, de Maat M, Smit VTHBM, Bovée JVMG, French PJ, van den Brandt PA, Schouten LJ, de Meyer T, van Criekinge W, Ahuja N, Herman JG, et al. (2013) The CpG island methylator phenotype: what's in a name? *Cancer Res* 73:5858–68.
- [237] Shih AH, Abdel-Wahab O, Patel JP, Levine RL (2012) The role of mutations in epigenetic regulators in myeloid malignancies. *Nat Rev Cancer* 12:599–612.
- [238] Roy DM, Walsh LA, Chan TA (2014) Driver mutations of cancer epigenomes. *Protein Cell* 5:265–296.
- [239] Witte T, Plass C, Gerhauser C (2014) Pan-cancer patterns of DNA methylation. *Genome Med* 6:66.

- [240] Hitchins MP (2015) Constitutional epimutation as a mechanism for cancer causality and heritability? *Nat Rev Cancer* 15:625–34.
- [241] Horsthemke B (2006) Epimutations in human disease. *Curr Top Microbiol Immunol* 310:45–59.
- [242] Moulton T, Crenshaw T, Hao Y, Moosikasuwon J, Lin N, Dembitzer F, Hensle T, Weiss L, McMorro L, Loew T (1994) Epigenetic lesions at the H19 locus in Wilms' tumour patients. *Nat Genet* 7:440–7.
- [243] Vu TH, Chuyen N V, Li T, Hoffman AR (2003) Loss of imprinting of IGF2 sense and antisense transcripts in Wilms' tumor. *Cancer Res* 63:1900–5.
- [244] Hansmann T, Pliushch G, Leubner M, Kroll P, Endt D, Gehrig A, Preisler-Adams S, Wieacker P, Haaf T (2012) Constitutive promoter methylation of BRCA1 and RAD51C in patients with familial ovarian cancer and early-onset sporadic breast cancer. *Hum Mol Genet* 21:4669–79.
- [245] Snell C, Krypuy M, Wong EM, Loughrey MB, Dobrovic A (2008) BRCA1 promoter methylation in peripheral blood DNA of mutation negative familial breast cancer patients with a BRCA1 tumour phenotype. *Breast Cancer Res* 10:R12.
- [246] Wong EM, Southey MC, Fox SB, Brown MA, Dowty JG, Jenkins MA, Giles GG, Hopper JL, Dobrovic A (2011) Constitutional methylation of the BRCA1 promoter is specifically associated with BRCA1 mutation-associated pathology in early-onset breast cancer. *Cancer Prev Res (Phila)* 4:23–33.
- [247] Galetzka D, Hansmann T, El Hajj N, Weis E, Irmscher B, Ludwig M, Schneider-Rätzke B, Kohlschmidt N, Beyer V, Bartsch O, Zechner U, Spix C, Haaf T (2012) Monozygotic twins discordant for constitutive BRCA1 promoter methylation, childhood cancer and secondary cancer. *Epigenetics* 7:47–54.
- [248] Hitchins MP (2013) The role of epigenetics in Lynch syndrome. *Fam Cancer* 12:189–205.
- [249] Miyakura Y, Sugano K, Akasu T, Yoshida T, Maekawa M, Saitoh S, Sasaki H, Nomizu T, Konishi F, Fujita S, Moriya Y, Nagai H (2004) Extensive but hemiallelic methylation of the hMLH1 promoter region in early-onset sporadic colon cancers with microsatellite instability. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2:147–56.
- [250] Suter CM, Martin DIK, Ward RL (2004) Germline epimutation of MLH1 in individuals with multiple cancers. *Nat Genet* 36:497–501.
- [251] Gazzoli I, Loda M, Garber J, Syngal S, Kolodner RD (2002) A hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma case associated with hypermethylation of the MLH1 gene in normal tissue

and loss of heterozygosity of the unmethylated allele in the resulting microsatellite instability-high tumor. *Cancer Res* 62:3925–8.

[252] Hitchins MP, Lynch HT (2014) Dawning of the epigenetic era in hereditary cancer. *Clin Genet* 85:413–6.

[253] Goel A, Nguyen T-P, Leung H-CE, Nagasaka T, Rhee J, Hotchkiss E, Arnold M, Banerji P, Koi M, Kwok C-T, Packham D, Lipton L, Boland CR, et al. (2011) De novo constitutional MLH1 epimutations confer early-onset colorectal cancer in two new sporadic Lynch syndrome cases, with derivation of the epimutation on the paternal allele in one. *Int J Cancer* 128:869–78.

[254] Hitchins M, Williams R, Cheong K, Halani N, Lin VAP, Packham D, Ku S, Buckle A, Hawkins N, Burn J, Gallinger S, Goldblatt J, Kirk J, et al. (2005) MLH1 germline epimutations as a factor in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Gastroenterology* 129:1392–9.

[255] Hitchins MP, Wong JLL, Suthers G, Suter CM, Martin DIK, Hawkins NJ, Ward RL (2007) Inheritance of a cancer-associated MLH1 germ-line epimutation. *N Engl J Med* 356:697–705.

[256] Kwok C-T, Vogelaar IP, van Zelst-Stams WA, Mensenkamp AR, Ligtenberg MJ, Rapkins RW, Ward RL, Chun N, Ford JM, Ladabaum U, McKinnon WC, Greenblatt MS, Hitchins MP (2014) The MLH1 c.-27C>A and c.85G>T variants are linked to dominantly inherited MLH1 epimutation and are borne on a European ancestral haplotype. *Eur J Hum Genet* 22:617–24.

[257] Hitchins MP, Rapkins RW, Kwok C-T, Srivastava S, Wong JLL, Khachigian LM, Polly P, Goldblatt J, Ward RL (2011) Dominantly Inherited Constitutional Epigenetic Silencing of MLH1 in a Cancer-Affected Family Is Linked to a Single Nucleotide Variant within the 5' UTR. *Cancer Cell* 20:200–213.

[258] Reid LC (1979) Cloning. *Methods Enzymol* 58:152–64.

[259] Mülhardt C (2007) The Experimenter Series: Molecular Biology And Genomics. Elsevier Ltd

[260] Chomczynski P, Sacchi N (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162:156–9.

[261] Weis E (2011) genetische und epigenetische Faktoren für die Zweittumorentstehung nach Tumoren im Kindes- und Jugendalter “ Dissertation Eva-Maria Weis. Diss

[262] Irmscher B (2013) „ Untersuchung des DNA-Reparaturverhaltens monozygoter Zwillinge mit unterschiedlicher Krebsdisposition “. Diss

- [263] Guendel I, Carpio L, Pedati C, Schwartz A, Teal C, Kashanchi F, Kehn-Hall K (2010) Methylation of the tumor suppressor protein, BRCA1, influences its transcriptional cofactor function. *PLoS One* 5:e11379.
- [264] Jin K, Sukumar S (2010) BRCA1: linking HOX to breast cancer suppression. *Breast Cancer Res* 12:306.
- [265] Rinn JL, Bondre C, Gladstone HB, Brown PO, Chang HY (2006) Anatomic demarcation by positional variation in fibroblast gene expression programs. *PLoS Genet* 2:e119.
- [266] PubMed Help [Internet]. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US). <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>.
- [267] Madar S, Goldstein I, Rotter V (2013) “Cancer associated fibroblasts”--more than meets the eye. *Trends Mol Med* 19:447–53.
- [268] Togo S, Polanska UM, Horimoto Y, Orimo A (2013) Carcinoma-associated fibroblasts are a promising therapeutic target. *Cancers (Basel)* 5:149–69.
- [269] Kharaishvili G, Simkova D, Bouchalova K, Gachechiladze M, Narsia N, Bouchal J (2014) The role of cancer-associated fibroblasts, solid stress and other microenvironmental factors in tumor progression and therapy resistance. *Cancer Cell Int* 14:41.
- [270] Valcz G, Sipos F, Tulassay Z, Molnar B, Yagi Y (2014) Importance of carcinoma-associated fibroblast-derived proteins in clinical oncology. *J Clin Pathol* 67:1026–31.
- [271] Polanska UM, Orimo A (2013) Carcinoma-associated fibroblasts: non-neoplastic tumour-promoting mesenchymal cells. *J Cell Physiol* 228:1651–7.
- [272] Guido C, Whitaker-Menezes D, Capparelli C, Balliet R, Lin Z, Pestell RG, Howell A, Aquila S, Andò S, Martinez-Outschoorn U, Sotgia F, Lisanti MP (2012) Metabolic reprogramming of cancer-associated fibroblasts by TGF- $\beta$  drives tumor growth: connecting TGF- $\beta$  signaling with “Warburg-like” cancer metabolism and L-lactate production. *Cell Cycle* 11:3019–35.
- [273] Lee K-W, Yeo S-Y, Sung CO, Kim S-H (2015) Twist1 is a key regulator of cancer-associated fibroblasts. *Cancer Res* 75:73–85.
- [274] Ilkow CS, Marguerie M, Batenchuk C, Mayer J, Ben Neriah D, Cousineau S, Falls T, Jennings VA, Boileau M, Bellamy D, Bastin D, de Souza CT, Alkayyal A, et al. (2015) Reciprocal cellular cross-talk within the tumor microenvironment promotes oncolytic virus activity. *Nat Med* 21:530–6.



- [275] Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Wacker HH, Schwab U, Stein H (1984) Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol* 133:1710–1715.
- [276] Karagiannis GS, Schaeffer DF, Cho CKJ, Musrap N, Saraon P, Batruch I, Grin A, Mitrovic B, Kirsch R, Riddell RH, Diamandis EP (2014) Collective migration of cancer-associated fibroblasts is enhanced by overexpression of tight junction-associated proteins claudin-11 and occludin. *Mol Oncol* 8:178–195.
- [277] Karagiannis GS, Poutahidis T, Erdman SE, Kirsch R, Riddell RH, Diamandis EP (2012) Cancer-Associated Fibroblasts Drive the Progression of Metastasis through both Paracrine and Mechanical Pressure on Cancer Tissue. *Mol Cancer Res*. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-12-0307
- [278] Hoehn H, Bryant EM, Au K, Norwood TH, Boman H, Martin GM (1975) Variegated translocation mosaicism in human skin fibroblast cultures. *Cytogenet Cell Genet* 15:282–98.
- [279] Deng C-X, Wang R-H (2003) Roles of BRCA1 in DNA damage repair: a link between development and cancer. *Hum Mol Genet* 12 Spec No:R113–23.
- [280] Shao N, Chai YL, Shyam E, Reddy P, Rao VN (1996) Induction of apoptosis by the tumor suppressor protein BRCA1. *Oncogene* 13:1–7.
- [281] Brugarolas J, Jacks T (1997) Double indemnity: p53, BRCA and cancer. p53 mutation partially rescues developmental arrest in Brca1 and Brca2 null mice, suggesting a role for familial breast cancer genes in DNA damage repair. *Nat Med* 3:721–2.
- [282] Moran A, O'Hara C, Khan S, Shack L, Woodward E, Maher ER, Lalloo F, Evans DGR (2012) Risk of cancer other than breast or ovarian in individuals with BRCA1 and BRCA2 mutations. *Fam Cancer* 11:235–42.
- [283] Antoniou A, Pharoah PDP, Narod S, Risch HA, Eyfjord JE, Hopper JL, Loman N, Olsson H, Johannsson O, Borg A, Pasini B, Radice P, Manoukian S, et al. (2003) Average risks of breast and ovarian cancer associated with BRCA1 or BRCA2 mutations detected in case Series unselected for family history: a combined analysis of 22 studies. *Am J Hum Genet* 72:1117–30.
- [284] Rhiem K, Todt U, Wappenschmidt B, Klein A, Wardelmann E, Schmutzler RK (2010) Sporadic breast carcinomas with somatic BRCA1 gene deletions share genotype/phenotype features with familial breast carcinomas. *Anticancer Res* 30:3445–3449.
- [285] Kotsopoulos J, Chen Z, Vallis KA, Poll a, Ainsworth P, Narod SA (2007) DNA repair capacity as a possible biomarker of breast cancer risk in female BRCA1 mutation carriers. *Br J Cancer* 96:118–25.

- [286] Vogel W, Surowy H (2007) Reduced DNA repair in BRCA1 mutation carriers undetectable before onset of breast cancer? *Br J Cancer* 97:1184–6; author reply 1187.
- [287] Cardinale F, Bruzzi P, Bolognesi C (2012) Role of micronucleus test in predicting breast cancer susceptibility: a systematic review and meta-analysis. *Br J Cancer* 106:780–90.
- [288] Cirri P, Chiarugi P (2011) Cancer associated fibroblasts: the dark side of the coin. *Am J Cancer Res* 1:482–97.
- [289] Salem AF, Howell A, Sartini M, Sotgia F, Lisanti MP (2012) Downregulation of stromal BRCA1 drives breast cancer tumor growth via upregulation of HIF-1 $\alpha$ , autophagy and ketone body production. *Cell Cycle* 11:4167–73.
- [290] Pickard A, Cichon A-C, Barry A, Kieran D, Patel D, Hamilton P, Salto-Tellez M, James J, McCance DJ (2012) Inactivation of Rb in stromal fibroblasts promotes epithelial cell invasion. *EMBO J* 31:3092–103.
- [291] Antecol MH, Darveau A, Sonenberg N, Mukherjee BB (1986) Altered biochemical properties of actin in normal skin fibroblasts from individuals predisposed to dominantly inherited cancers. *Cancer Res* 46:1867–73.
- [292] Schor SL, Schor AM, Durning P, Rushton G (1985) Skin fibroblasts obtained from cancer patients display foetal-like migratory behaviour on collagen gels. *J Cell Sci* 73:235–44.
- [293] Haggie JA, Sellwood RA, Howell A, Birch JM, Schor SL (1987) Fibroblasts from relatives of patients with hereditary breast cancer show fetal-like behaviour in vitro. *Lancet* 1:1455–7.
- [294] Schor SL, Schor AM, Rushton G (1988) Fibroblasts from cancer patients display a mixture of both foetal and adult-like phenotypic characteristics. *J Cell Sci* 90 ( Pt 3):401–7.
- [295] Boomsma D, Busjahn A, Peltonen L (2002) Classical twin studies and beyond. *Nat Rev Genet* 3:872–882.
- [296] Sudarsky L, Myers RH, Walshe TM (1983) Huntington's disease in monozygotic twins reared apart. *J Med Genet* 20:408–411.
- [297] Rieley MB, Stevenson DA, Viskochil DH, Tinkle BT, Martin LJ, Schorry EK (2011) Variable expression of neurofibromatosis 1 in monozygotic twins. *Am J Med Genet Part A* 155:478–485.
- [298] Castillo-Fernandez JE, Spector TD, Bell JT (2014) Epigenetics of discordant monozygotic twins: implications for disease. *Genome Med* 6:60.

- [299] Biesecker LG, Spinner NB (2013) A genomic view of mosaicism and human disease. *Nat Rev Genet* 14:307–20.
- [300] Shih HA, Nathanson KL, Seal S, Collins N, Stratton MR, Rebbeck TR, Weber BL (2000) BRCA1 and BRCA2 mutations in breast cancer families with multiple primary cancers. *Clin Cancer Res* 6:4259–4264.
- [301] Friedman E, Efrat N, Soussan-Gutman L, Dvir A, Kaplan Y, Ekstein T, Nykamp K, Powers M, Rabideau M, Sorenson J, Topper S (2015) Low-level constitutional mosaicism of a de novo BRCA1 gene mutation. *Br J Cancer* 112:765–8.
- [302] Delon I, Taylor A, Molenda A, Drummond J, Oakhill K, Girling A, Liu H, Whittaker J, Treacy R, Tischkowitz M (2013) A germline mosaic BRCA1 exon deletion in a woman with bilateral basal-like breast cancer. *Clin Genet* 84:297–299.
- [303] Bianco T, Chenevix-Trench G, Walsh DC, Cooper JE, Dobrovic A (2000) Tumour-specific distribution of BRCA1 promoter region methylation supports a pathogenetic role in breast and ovarian cancer. *Carcinogenesis* 21:147–151.
- [304] Wilcox CB, Baysal BE, Gallion HH, Strange MA, DeLoia JA (2005) High-resolution methylation analysis of the BRCA1 promoter in ovarian tumors. *Cancer Genet Cytogenet* 159:114–122.
- [305] Scardocci A, Guidi F, D'Alo' F, Gumiero D, Fabiani E, Diruscio A, Martini M, Larocca LM, Zollino M, Hohaus S, Leone G, Voso MT (2006) Reduced BRCA1 expression due to promoter hypermethylation in therapy-related acute myeloid leukaemia. *Br J Cancer* 95:1108–1113.
- [306] Al-Moghrabi N, Al-Qasem AJS, Aboussekhra A (2011) Methylation-related mutations in the BRCA1 promoter in peripheral blood cells from cancer-free women. *Int J Oncol* 39:129–35.
- [307] Al-Moghrabi N, Nofel A, Al-Yousef N, Madkhali S, Bin Amer SM, Alaiya A, Shinwari Z, Al-Tweigeri T, Karakas B, Tulbah A, Aboussekhra A (2014) The molecular significance of methylated BRCA1 promoter in white blood cells of cancer-free females. *BMC Cancer* 14:830.
- [308] Magdinier F, Billard LM, Wittmann G, Frappart L, Benchaïb M, Lenoir GM, Guérin JF, Dante R (2000) Regional methylation of the 5' end CpG island of BRCA1 is associated with reduced gene expression in human somatic cells. *FASEB J* 14:1585–1594.
- [309] Li Q, Wei W, Jiang YI, Yang H, Liu J (2015) Promoter methylation and expression changes of BRCA1 in cancerous tissues of patients with sporadic breast cancer. *Oncol Lett* 9:1807–1813.

- [310] Matros E, Wang ZC, Lodeiro G, Miron A, Iglehart JD, Richardson AL (2005) BRCA1 promoter methylation in sporadic breast tumors: Relationship to gene expression profiles. *Breast Cancer Res Treat* 91:179–186.
- [311] Valin A, Barnay-Verdier S, Robert T, Ripoche H, Brellier F, Chevallier-Lagente O, Avril M-F, Magnaldo T (2009) PTCH1 +/- dermal fibroblasts isolated from healthy skin of Gorlin syndrome patients exhibit features of carcinoma associated fibroblasts. *PLoS One* 4:e4818.
- [312] Kalluri R, Zeisberg M (2006) Fibroblasts in cancer. *Nat Rev Cancer* 6:392–401.
- [313] Hinz B, Phan SH, Thannickal VJ, Galli A, Bochaton-Piallat M-L, Gabbiani G (2007) The myofibroblast: one function, multiple origins. *Am J Pathol* 170:1807–1816.
- [314] Hanahan D, Weinberg RA (2011) Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* 144:646–674.
- [315] Kunz-Schughart LA, Knuechel R (2002) Tumor-associated fibroblasts (Part I): Active stromal participants in tumor development and progression? *Histol Histopathol* 17:599–621.
- [316] Kumar S, Weaver VM (2009) Mechanics, malignancy, and metastasis: The force journey of a tumor cell. *Cancer Metastasis Rev* 28:113–127.
- [317] Wei SC, Fattet L, Tsai JH, Guo Y, Pai VH, Majeski HE, Chen AC, Sah RL, Taylor SS, Engler AJ, Yang J (2015) Matrix stiffness drives epithelial-mesenchymal transition and tumour metastasis through a TWIST1-G3BP2 mechanotransduction pathway. *Nat Cell Biol* 17:678–88.
- [318] Schrader J, Gordon-Walker TT, Aucott RL, van Deemter M, Quaas A, Walsh S, Benten D, Forbes SJ, Wells RG, Iredale JP (2011) Matrix stiffness modulates proliferation, chemotherapeutic response, and dormancy in hepatocellular carcinoma cells. *Hepatology* 53:1192–1205.
- [319] Singer CF, Gschwantler-Kaulich D, Fink-Retter A, Haas C, Hudelist G, Czerwenka K, Kubista E (2008) Differential gene expression profile in breast cancer-derived stromal fibroblasts. *Breast Cancer Res Treat* 110:273–281.
- [320] Calon a, Tauriello DVF, Batlle E (2014) TGF-beta in CAF-mediated tumor growth and metastasis. *Semin Cancer Biol* 25:15–22.
- [321] Erez N, Truitt M, Olson P, Arron ST, Hanahan D (2010) Cancer-Associated Fibroblasts Are Activated in Incipient Neoplasia to Orchestrate Tumor-Promoting Inflammation in an NF-kappaB-Dependent Manner. *Cancer Cell* 17:135–47.

- 
- [322] Bachman KE, Park BH (2005) Duel nature of TGF-beta signaling: tumor suppressor vs. tumor promoter. *Curr Opin Oncol* 17:49–54.
- [323] Allinen M, Beroukhi R, Cai L, Brennan C, Lahti-Domenici J, Huang H, Porter D, Hu M, Chin L, Richardson A, Schnitt S, Sellers WR, Polyak K (2004) Molecular characterization of the tumor microenvironment in breast cancer. *Cancer Cell* 6:17–32.
- [324] Kojima Y, Acar A, Eaton EN, Mellody KT, Scheel C, Ben-Porath I, Onder TT, Wang ZC, Richardson AL, Weinberg RA, Orimo A (2010) Autocrine TGF-beta and stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) signaling drives the evolution of tumor-promoting mammary stromal myofibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:20009–14.
- [325] Orimo A, Gupta PB, Sgroi DC, Arenzana-Seisdedos F, Delaunay T, Naeem R, Carey VJ, Richardson AL, Weinberg RA (2005) Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion. *Cell* 121:335–348.
- [326] Jakowlew SB (2006) Transforming growth factor-beta in cancer and metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 25:435–457.
- [327] Sung CO, Lee KW, Han S, Kim SH (2011) Twist1 is up-regulated in gastric cancer-associated fibroblasts with poor clinical outcomes. *Am J Pathol* 179:1827–1838.
- [328] De Luca P, Moiola CP, Zalazar F, Gardner K, Vazquez ES, De Siervi A (2013) BRCA1 and p53 regulate critical prostate cancer pathways. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 16:233–8.
- [329] Kote-Jarai Z, Matthews L, Osorio A, Shanley S, Giddings I, Moreews F, Locke I, Evans DG, Eccles D, Williams RD, Girolami M, Campbell C, Eeles R (2006) Accurate prediction of BRCA1 and BRCA2 heterozygous genotype using expression profiling after induced DNA damage. *Clin Cancer Res* 12:3896–901.
- [330] Kote-Jarai Z, Williams RD, Cattini N, Copeland M, Giddings I, Wooster R, TePoele RH, Workman P, Gusterson B, Peacock J, Gui G, Campbell C, Eeles R (2004) Gene expression profiling after radiation-induced DNA damage is strongly predictive of BRCA1 mutation carrier status. *Clin Cancer Res* 10:958–63.
- [331] Soyombo AA, Wu Y, Kolski L, Rios JJ, Rakheja D, Chen A, Kehler J, Hampel H, Coughran A, Ross TS (2013) Analysis of induced pluripotent stem cells from a BRCA1 mutant family. *Stem cell reports* 1:336–49.
- [332] Peng Q, Zhao L, Hou Y, Sun Y, Wang L, Luo H, Peng H, Liu M (2013) Biological Characteristics and Genetic Heterogeneity between Carcinoma-Associated Fibroblasts and Their Paired Normal Fibroblasts in Human Breast Cancer. *PLoS One*. doi: 10.1371/journal.pone.0060321

- [333] Li H, Zhang J, Chen S-W, Liu L-L, Li L, Gao F, Zhuang S-M, Wang L-P, Li Y, Song M (2015) Cancer-associated fibroblasts provide a suitable microenvironment for tumor development and progression in oral tongue squamous cancer. *J Transl Med* 13:198.
- [334] Yu B, Chen X, Li J, Qu Y, Su L, Peng Y, Huang J, Yan J, Yu Y, Gu Q, Zhu Z, Liu B (2013) Stromal fibroblasts in the microenvironment of gastric carcinomas promote tumor metastasis via upregulating TAGLN expression. *BMC Cell Biol* 14:17.
- [335] Azzarone B, Pedulla D, Romanzi CA (1976) Spontaneous transformation of human skin fibroblasts derived from neoplastic patients. *Nature* 262:74–75.
- [336] Azzarone B, Mareel M, Billard C, Scemama P, Chaponnier C, Macieira-Coelho A (1984) Abnormal properties of skin fibroblasts from patients with breast cancer. *Int J Cancer* 33:759–64.
- [337] Azzarone B, Macieira-Coelho A (1987) Further characterization of the defects of skin fibroblasts from cancer patients. *J Cell Sci* 87 ( Pt 1):155–162.
- [338] Mullan PB, Quinn JE, Harkin DP (2006) The role of BRCA1 in transcriptional regulation and cell cycle control. *Oncogene* 25:5854–63.
- [339] Furuta S, Jiang X, Gu B, Cheng E, Chen P-L, Lee W-H (2005) Depletion of BRCA1 impairs differentiation but enhances proliferation of mammary epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:9176–81.
- [340] Thompson ME, Jensen RA, Obermiller PS, Page DL, Holt JT (1995) Decreased expression of BRCA1 accelerates growth and is often present during sporadic breast cancer progression. *Nat Genet* 9:444–50.
- [341] Promkan M, Liu G, Patmasiriwat P, Chakrabarty S (2009) BRCA1 modulates malignant cell behavior, the expression of survivin and chemosensitivity in human breast cancer cells. *Int J Cancer* 125:2820–2828.
- [342] Scheel C, Eaton EN, Li SHJ, Chaffer CL, Reinhardt F, Kah KJ, Bell G, Guo W, Rubin J, Richardson AL, Weinberg RA (2011) Paracrine and autocrine signals induce and maintain mesenchymal and stem cell states in the breast. *Cell* 145:926–940.
- [343] Elenbaas B, Weinberg RA (2001) Heterotypic signaling between epithelial tumor cells and fibroblasts in carcinoma formation. *Exp Cell Res* 264:169–184.
- [344] Durning P, Schor SL, Sellwood RA (1984) Fibroblasts from patients with breast cancer show abnormal migratory behaviour in vitro. *Lancet* 2:890–2.

- [345] Schor SL, Haggie JA, Durning P, Howell A, Smith L, Sellwood RA, Crowther D (1986) Occurrence of a fetal fibroblast phenotype in familial breast cancer. *Int J Cancer* 37:831–836.
- [346] Kopelovich L, Lipkin M, Blattner WA, Fraumeni JF (1980) Organization of actin-containing cables in cultured skin fibroblasts from individuals at high risk of colon cancer. *Int J Cancer* 26:301–307.
- [347] Higgins PJ, Kopelovich L (1991) Analysis of actin microfilaments and cell-to-substrate adhesive structures in human fibroblasts from individuals genetically predisposed to colonic carcinoma. *Exp Cell Res* 195:395–400.
- [348] Kopelovich L, Conlon S, Pollack R (1977) Defective organization of actin in cultured skin fibroblasts from patients with inherited adenocarcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74:3019–3022.
- [349] Brentnall TA, Lai LA, Coleman J, Bronner MP, Pan S, Chen R (2012) Arousal of cancer-associated stroma: Overexpression of palladin activates fibroblasts to promote tumor invasion. *PLoS One*. doi: 10.1371/journal.pone.0030219
- [350] Mar PK, Roy P, Yin HL, Cavanagh HD, Jester J V (2001) Stress fiber formation is required for matrix reorganization in a corneal myofibroblast cell line. *Exp Eye Res* 72:455–66.
- [351] Ao M, Brewer BM, Yang L, Franco Coronel OE, Hayward SW, Webb DJ, Li D (2015) Stretching fibroblasts remodels fibronectin and alters cancer cell migration. *Sci Rep* 5:8334.
- [352] Pavlides S, Whitaker-Menezes D, Castello-Cros R, Flomenberg N, Witkiewicz AK, Frank PG, Casimiro MC, Wang C, Fortina P, Addya S, Pestell RG, Martinez-Outschoorn UE, Sotgia F, et al. (2009) The reverse Warburg effect: aerobic glycolysis in cancer associated fibroblasts and the tumor stroma. *Cell Cycle* 8:3984–4001.
- [353] Martinez-Outschoorn UE, Lin Z, Trimmer C, Flomenberg N, Wang C, Pavlides S, Pestell RG, Howell A, Sotgia F, Lisanti MP (2011) Cancer cells metabolically “fertilize” the tumor microenvironment with hydrogen peroxide, driving the Warburg effect: implications for PET imaging of human tumors. *Cell Cycle* 10:2504–20.
- [354] Bonuccelli G, Tsigos A, Whitaker-Menezes D, Pavlides S, Pestell RG, Chiavarina B, Frank PG, Flomenberg N, Howell A, Martinez-Outschoorn UE, Sotgia F, Lisanti MP (2010) Ketones and lactate “fuel” tumor growth and metastasis: Evidence that epithelial cancer cells use oxidative mitochondrial metabolism. *Cell Cycle* 9:3506–14.
- [355] Martinez-Outschoorn UE, Lin Z, Whitaker-Menezes D, Howell A, Lisanti MP, Sotgia F (2012) Ketone bodies and two-compartment tumor metabolism: stromal ketone production fuels mitochondrial biogenesis in epithelial cancer cells. *Cell Cycle* 11:3956–63.

- [356] Martinez-Outschoorn UE, Sotgia F, Lisanti MP (2015) Caveolae and signalling in cancer. *Nat Rev Cancer* 15:225–37.
- [357] Martinez-Outschoorn UE, Balliet RM, Rivadeneira DB, Chiavarina B, Pavlides S, Wang C, Whitaker-Menezes D, Daumer KM, Lin Z, Witkiewicz AK, Flomenberg N, Howell A, Pestell RG, et al. (2010) Oxidative stress in cancer associated fibroblasts drives tumor-stroma co-evolution: A new paradigm for understanding tumor metabolism, the field effect and genomic instability in cancer cells. *Cell Cycle* 9:3256–76.
- [358] Martinez-Outschoorn UE, Lisanti MP, Sotgia F (2014) Catabolic cancer-associated fibroblasts transfer energy and biomass to anabolic cancer cells, fueling tumor growth. *Semin Cancer Biol* 25:47–60.
- [359] Martinez-Outschoorn UE, Balliet R, Lin Z, Whitaker-Menezes D, Birbe RC, Bombonati A, Pavlides S, Lamb R, Sneddon S, Howell A, Sotgia F, Lisanti MP (2012) BRCA1 mutations drive oxidative stress and glycolysis in the tumor microenvironment: implications for breast cancer prevention with antioxidant therapies. *Cell Cycle* 11:4402–13.
- [360] Wang Y, Yu J, Zhan Q (2008) BRCA1 regulates caveolin-1 expression and inhibits cell invasiveness. *Biochem Biophys Res Commun* 370:201–206.
- [361] Kang HJ, Kim HJ, Rih J-K, Mattson TL, Kim KW, Cho C-H, Isaacs JS, Bae I (2006) BRCA1 plays a role in the hypoxic response by regulating HIF-1 $\alpha$  stability and by modulating vascular endothelial growth factor expression. *J Biol Chem* 281:13047–56.
- [362] Yakes FM, Van Houten B (1997) Mitochondrial DNA damage is more extensive and persists longer than nuclear DNA damage in human cells following oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:514–519.
- [363] Littlefield LG, Mailhes JB (1975) Observations of de novo clones of cytogenetically aberrant cells in primary fibroblast cell strains from phenotypically normal women. *Am J Hum Genet* 27:190–197.
- [364] Rubin CM, Nesbit ME, Kim TH, Kersey JH, Arthur DC (1992) Chromosomal abnormalities in skin following total body or total lymphoid irradiation. *Genes Chromosomes Cancer* 4:141–145.
- [365] Frankenberg-Schwager M, Gregus A (2012) Chromosomal instability induced by mammography X-rays in primary human fibroblasts from BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. *Int J Radiat Biol* 88:846–857.
- [366] Evers B, Jonkers J (2006) Mouse models of BRCA1 and BRCA2 deficiency: past lessons, current understanding and future prospects. *Oncogene* 25:5885–5897.



- [367] Weaver Z, Montagna C, Xu X, Howard T, Gadina M, Brodie SG, Deng C-X, Ried T (2002) Mammary tumors in mice conditionally mutant for *Brcal* exhibit gross genomic instability and centrosome amplification yet display a recurring distribution of genomic imbalances that is similar to human breast cancer. *Oncogene* 21:5097–5107.
- [368] Deng CX, Scott F (2000) Role of the tumor suppressor gene *Brcal* in genetic stability and mammary gland tumor formation. *Oncogene* 19:1059–1064.
- [369] Tirkkonen M, Johannsson O, Agnarsson BA, Olsson H, Ingvarsson S, Karhu R, Tanner M, Isola J, Barkardottir RB, Borg A, Kallioniemi OP (1997) Distinct somatic genetic changes associated with tumor progression in carriers of *BRCA1* and *BRCA2* germ-line mutations. *Cancer Res* 57:1222–1227.
- [370] Grigorova M, Staines JM, Ozdag H, Caldas C, Edwards PAW (2004) Possible causes of chromosome instability: Comparison of chromosomal abnormalities in cancer cell lines with mutations in *BRCA1*, *BRCA2*, *CHK2* and *BUB1*. In: *Cytogenet. Genome Res.* pp 333–340
- [371] Tuhkanen H, Anttila M, Kosma VM, Ylä-Herttua S, Heinonen S, Kuronen A, Juhola M, Tammi R, Tammi M, Mannermaa A (2004) Genetic alterations in the peritumoral stromal cells of malignant and borderline epithelial ovarian tumors as indicated by allelic imbalance on chromosome 3p. *Int J Cancer* 109:247–252.
- [372] Fukino K, Shen L, Matsumoto S, Morrison CD, Mutter GL, Eng C (2004) Combined total genome loss of heterozygosity scan of breast cancer stroma and epithelium reveals multiplicity of stromal targets. *Cancer Res* 64:7231–7236.
- [373] Hosein AN, Wu M, Arcand SL, Lavallée S, Hébert J, Tonin PN, Basik M (2010) Breast carcinoma-associated fibroblasts rarely contain p53 mutations or chromosomal aberrations. *Cancer Res* 70:5770–5777.
- [374] Qiu W, Hu M, Sridhar A, Opeskin K, Fox S, Shipitsin M, Trivett M, Thompson ER, Ramakrishna M, Goringe KL, Polyak K, Haviv I, Campbell IG (2008) No evidence of clonal somatic genetic alterations in cancer-associated fibroblasts from human breast and ovarian carcinomas. *Nat Genet* 40:650–655.
- [375] Zeisberg EM, Potenta S, Xie L, Zeisberg M, Kalluri R (2007) Discovery of endothelial to mesenchymal transition as a source for carcinoma-associated fibroblasts. *Cancer Res* 67:10123–8.
- [376] Yu Y, Xiao C-H, Tan L-D, Wang Q-S, Li X-Q, Feng Y-M (2014) Cancer-associated fibroblasts induce epithelial-mesenchymal transition of breast cancer cells through paracrine TGF- $\beta$  signalling. *Br J Cancer* 110:724–32.

- [377] Giannoni E, Bianchini F, Masieri L, Serni S, Torre E, Calorini L, Chiarugi P (2010) Reciprocal activation of prostate cancer cells and cancer-associated fibroblasts stimulates epithelial-mesenchymal transition and cancer stemness. *Cancer Res* 70:6945–6956.
- [378] Huang T-H, Chu T-Y (2013) Repression of miR-126 and upregulation of adrenomedullin in the stromal endothelium by cancer-stromal cross talks confers angiogenesis of cervical cancer. *Oncogene* 1–12.
- [379] Vicent S, Sayles LC, Vaka D, Khatri P, Gevaert O, Chen R, Zheng Y, Gillespie AK, Clarke N, Xu Y, Shrager J, Hoang CD, Plevritis S, et al. (2012) Cross-species functional analysis of cancer-associated fibroblasts identifies a critical role for CLCF1 and IL-6 in non-small cell lung cancer in vivo. *Cancer Res* 72:5744–5756.
- [380] Subramaniam KS, Tham ST, Mohamed Z, Woo YL, Mat Adenan NA, Chung I (2013) Cancer-associated fibroblasts promote proliferation of endometrial cancer cells. *PLoS One* 8:e68923.
- [381] Xu LN, Xu BN, Cai J, Yang JB, Lin N (2013) Tumor-associated fibroblast-conditioned medium promotes tumor cell proliferation and angiogenesis. *Genet Mol Res* 12:5863–71.
- [382] Iwano M, Plieth D, Danoff TM, Xue C, Okada H, Neilson EG (2002) Evidence that fibroblasts derive from epithelium during tissue fibrosis. *J Clin Invest* 110:341–50.
- [383] Ostman A, Augsten M (2009) Cancer-associated fibroblasts and tumor growth-bystanders turning into key players. *Curr Opin Genet Dev* 19:67–73.
- [384] Schor SL, Schor AM, Howell A, Crowther D (1987) Hypothesis: persistent expression of fetal phenotypic characteristics by fibroblasts is associated with an increased susceptibility to neoplastic disease. *Exp Cell Biol* 55:11–7.
- [385] Schor SL, Ellis IR, Jones SJ, Baillie R, Seneviratne K, Clausen J, Motegi K, Vojtesek B, Kankova K, Furrer E, Sales MJ, Schor AM, Kay RA (2003) Migration-Stimulating Factor: A Genetically Truncated Onco-Fetal Fibronectin Isoform Expressed by Carcinoma and Tumor-Associated Stromal Cells. *Cancer Res* 63:8827–8836.
- [386] Tlsty TD, Coussens LM (2006) Tumor stroma and regulation of cancer development. *Annu Rev Pathol* 1:119–50.
- [387] Bhowmick NA, Neilson EG, Moses HL (2004) Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression. *Nature* 432:332–337.
- [388] Olumi AF, Grossfeld GD, Hayward SW, Carroll PR, Tlsty TD, Cunha GR (1999) Carcinoma-associated fibroblasts direct tumor progression of initiated human prostatic epithelium. *Cancer Res* 59:5002–11.

- [389] Characteristics M, Dumont N, Liu B, Defilippis RA, Chang H, Rabban JT, Karnezis AN, Tjoe JA, Marx J, Parvin B, Tlsty TD (2013) Breast fibroblasts modulate early dissemination, tumorigenesis, and metastasis through alteration of extracellular matrix characteristics. *Neoplasia* 15:249–62.
- [390] Frassanito M a, Rao L, Moschetta M, Ria R, Di Marzo L, De Luisi A, Racanelli V, Catacchio I, Berardi S, Basile A, Menu E, Ruggieri S, Nico B, et al. (2014) Bone marrow fibroblasts parallel multiple myeloma progression in patients and mice: in vitro and in vivo studies. *Leukemia* 28:904–16.
- [391] De Veirman K, Rao L, De Bruyne E, Menu E, Van Valckenborgh E, Van Riet I, Frassanito MA, Di Marzo L, Vacca A, Vanderkerken K (2014) Cancer associated fibroblasts and tumor growth: Focus on multiple myeloma. *Cancers (Basel)* 6:1363–1381.
- [392] Kumagai MA, Manabe A, Pui CH, Behm FG, Raimondi SC, Hancock ML, Mahmoud H, Crist WM, Campana D (1996) Stroma-supported culture of childhood B-lineage acute lymphoblastic leukemia cells predicts treatment outcome. *J Clin Invest* 97:755–760.
- [393] Iwamoto S, Mihara K, Downing JR, Pui C-H, Campana D (2007) Mesenchymal cells regulate the response of acute lymphoblastic leukemia cells to asparaginase. *J Clin Invest* 117:1049–1057.
- [394] Raffaghello L, Vacca A, Pistoia V, Ribatti D (2015) Cancer associated fibroblasts in hematological malignancies. *Oncotarget* 6:2589–603.
- [395] Micke P, Ostman A (2004) Tumour-stroma interaction: cancer-associated fibroblasts as novel targets in anti-cancer therapy? *Lung Cancer* 45 Suppl 2:S163–75.
- [396] Joyce JA (2005) Therapeutic targeting of the tumor microenvironment. *Cancer Cell* 7:513–20.
- [397] Feig C, Jones JO, Kraman M, Wells RJB, Deonarine A, Chan DS, Connell CM, Roberts EW, Zhao Q, Caballero OL, Teichmann SA, Janowitz T, Jodrell DI, et al. (2013) Targeting CXCL12 from FAP-expressing carcinoma-associated fibroblasts synergizes with anti-PD-L1 immunotherapy in pancreatic cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110:20212–20217.
- [398] Zhou L, Yang K, Andl T, Wickett RR, Zhang Y (2015) Perspective of Targeting Cancer-Associated Fibroblasts in Melanoma. *J Cancer* 6:717–26.
- [399] Nagaraj NS, Datta PK (2010) Targeting the transforming growth factor-beta signaling pathway in human cancer. *Expert Opin Investig Drugs* 19:77–91.
- [400] Connolly EC, Freimuth J, Akhurst RJ (2012) Complexities of TGF-?? targeted cancer therapy. *Int J Biol Sci* 8:964–978.

- [401] Kowalska E, Narod SA, Huzarski T, Zajaczek S, Huzarska J, Gorski B, Lubinski J (2005) Increased rates of chromosome breakage in BRCA1 carriers are normalized by oral selenium supplementation. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 14:1302–6.
- [402] Kang HJ, Hong Y Bin, Kim HJ, Wang A, Bae I (2012) Bioactive food components prevent carcinogenic stress via Nrf2 activation in BRCA1 deficient breast epithelial cells. *Toxicol Lett* 209:154–60.
- [403] Dziaman T, Huzarski T, Gackowski D, Rozalski R, Siomek A, Szpila A, Guz J, Lubinski J, Wasowicz W, Roszkowski K, Olinski R (2009) Selenium supplementation reduced oxidative DNA damage in adnexectomized BRCA1 mutations carriers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 18:2923–8.
- [404] Oliveros JC (2007) VENNY. An interactive tool for comparing lists with Venn Diagrams.

# Abkürzungsverzeichnis

AD	Autosomal Dominant
°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
18S-rRNA	18S ribosomale Ribonukleinsäure
3'IVT-Arrays	3' „ <i>In vitro</i> transcription“-Arrays
ACTA2	<i>Smooth Muscle α-2-Actin</i>
ADAM12	<i>ADAM Metallopeptidase Domain 12</i>
APE1	Apurin/Apyrimidin-Endonuklease
APS	Ammoniumperoxodisulfat
BASC	<i>BRCA1-Associated Genome Surveillance Complex</i>
BDNF	<i>Brain-derived Neurotrophic Factor</i>
BER	Basenexzisionsreparatur
BLM	<i>Bloom Syndrome, RecQ Helicase-Like</i>
BMPRI1A	<i>Bone Morphogenetic Protein Receptor, Type IA</i>
Bp	Basenpaare
BRCA1	<i>BReast CAncer 1, early-onset</i>
BRCA2	<i>BReast CAncer 2, early-onset</i>
BRCT	BRCA1-C-Terminus
CAF	<i>Cancer-associated fibroblasts</i>
CAV1	Caveolin 1
CCND2	Cyclin D2
CDK1	<i>Cyclin-dependent Kinase 1</i>
CDC25C	<i>Cell Division Cycle 25C</i>
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CHEK2	<i>Checkpoint Kinase 2</i>
Chr.	Chromosom
CIMP	<i>CpG Island Methylator Phenotype</i>
CK14	<i>Cytokeratin 14</i>
CK17	<i>Cytokeratin 17</i>
CK5/6	<i>Cytokeratin 5/6</i>
cm	Zentimeter
CML	Chronisch Myeloische Leukämie
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
COL11A1	<i>Collagen, Type XI, Alpha 1</i>
COL1A1	<i>Collagen, type I, alpha 1</i>
COL4A1	<i>Collagen, Type IV, Alpha 1</i>
COL5A1	<i>Collagen, Type V, Alpha 1</i>
COL8A1	<i>Collagen, Type VIII, Alpha 1</i>
CpG	Cytosin-Phosphat-Guanin (5'-3')

CSRP2	<i>Cysteine and Glycine-rich Protein 2</i>
Ct	Cycle threshold
CtiP	<i>CtBP-interacting Protein</i>
CXCL12	<i>CXC-Motiv-Chemokin 12</i>
CXCL6	<i>CXC-Motiv-Chemokin 6</i>
DAVID	<i>Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery</i>
DDB2	<i>Damage-Specific DNA Binding Protein 2, 48kDa</i>
DEG	Differenziell exprimierte Gene
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNMT3	<i>DNA Methyltransferase 3</i>
DPBS	<i>Dulbecco's phosphate-buffered saline</i>
DTT	Dithreitol
EMT	Epithelial-mesenchymale Transition
ENPP2	<i>Ectonucleotide Pyrophosphatase/Phosphodiesterase 2</i>
EPCAM	<i>Epithelial Cell Adhesion Molecule</i>
ERCC2	<i>Excision Repair Cross-Complementation Group 2</i>
ERCC3	<i>Excision Repair Cross-Complementation Group 3</i>
ERCC4	<i>Excision Repair Cross-Complementation Group 4</i>
ERCC5	<i>Excision Repair Cross-Complementation Group 5</i>
EtBr	Ethidium-Bromid
EZK	Einzelzellklone
EZM	Extrazelluläre Matrix
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorting</i>
FANCD2	<i>Fanconi anemia group D2 protein</i>
FAP	Familiäre adenomatöse Polyposis
FA-S	<i>Fanconi-Anämie Typ S</i>
FBS	Fötales Bovines Serum
FC	Fold change
FGF2	<i>Fibroblast Growth Factor-2</i>
FGF5	<i>Fibroblast Growth Factor-5</i>
FN1	<i>Fibronectin 1</i>
FOXP1	<i>Forkhead Box Protein P1</i>
g	Gramm
GADD45	<i>Growth Arrest And DNA-Damage-Inducible</i>
GAPDH	<i>Glyceraldehyde-3-Phosphate-Dehydrogenase</i>
GO	Genontologie
GTG	<i>G-bands by trypsin using Giemsa</i>
GWAS	Genomweite Assoziationsstudie
H2A	Histon 2 A
HBOC	Hereditäre Form des Brust- und Eierstockkrebs
Her2/neu	<i>Human Epidermal Growth Factor Receptor 2, erb-B2, c-erbB2</i>

---

HMLE	<i>human mammary epithelial cell line</i>
HNPCC	Hereditäres non-polypöses kolorektales Karzinom
HOXC6	<i>Homeobox C6</i>
HOXC8	<i>Homeobox C8</i>
HR	Homologe Rekombination
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
hTERT	<i>human telomerase reverse transcriptase</i>
ID3	<i>Inhibitor Of DNA Binding 3</i>
IDH1/2	<i>Isocitrate Dehydrogenase 1/2</i>
IF	Immunofluoreszenz
IGF2	<i>Insulin-Like Growth Factor 2</i>
IGFBP4	<i>Insulin-Like Growth Factor Binding Protein 4</i>
IL6	<i>Interleukin 6</i>
IL8	<i>Interleukin 8</i>
INHBA	<i>Inhibin, Beta A</i>
IR	Ionisierende Strahlung
J.	Jahre
JPS	Juveniles Polyposis-Syndrom
JUN	<i>Jun Proto-Oncogene</i>
kb	Kilo-Basen
KCL	Kaliumchlorid
kDa	Atomare Masseinheit, kilo-Dalton
KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
KRT10	<i>Keratin 10</i>
KRT19	<i>Keratin 19</i>
KRT34	<i>Keratin 34</i>
KRT7	<i>Keratin 7</i>
LKB1	<i>Liver Kinase B1</i>
lncRNA	<i>long noncoding RNAs</i>
LOH	<i>Loss of heterozygosity</i>
LOI	<i>Loss of imprinting</i>
LOXL2	<i>Lysyl Oxidase-Like 2</i>
MADH4	<i>Mothers Against Decapentaplegic Homolog 4</i>
MBD	Methyl-bindende Proteine
MEN1	<i>Multiple Endocrine Neoplasia I</i>
MGP	<i>Matrix Gla Protein</i>
min	Minute
ml	Mililiter
MLH1	<i>MutL homolog 1</i>
mm	Milimeter
MMP1	<i>Matrix Metallopeptidase 1</i>
MMP14	<i>Matrix Metallopeptidase 14</i>
MMR	Mismatch-Reparatur
mosMe	Mosaic Methylation
MPG	<i>N-Methylpurine-DNA-Glycosylase</i>

mRNA	<i>Messenger Ribonukleinsäure</i>
MSH2	<i>MutS homolog 2</i>
MSH6	<i>MutS homolog 6</i>
MSI	Mikrosatelliteninstabilität
NAC	N-Acetyl-Cystein
NaCl	Natriumchlorid
NBR2	<i>Next to BRCA1 Gene 2</i>
NBS1	<i>Nibrin</i>
NER	Nukleotidexzisionsreparatur
NF1	<i>Neurofibromatose Typ 1</i>
NHEJ	Nicht-homologes End-Joining
nm	Nanometer
NREP	<i>Neuronal Regeneration Related Protein</i>
Nrf2	<i>Nuclear Factor 2</i>
OXPHOS	Oxidative Phosphorylierung
PAK	Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe
PBST	Phosphate Buffered Saline Tween® 20
PCR	Polymerase chain reaction
PDPN	<i>Podoplanin</i>
Pi3K	<i>Phosphoinositid-3-Kinase</i>
PLOD2	<i>Procollagen-Lysine, 2-Oxoglutarate 5-Dioxygenase 2</i>
PMS1	<i>Postmeiotic Segregation Increased 1</i>
PMS2	<i>PMS1 homolog 2</i>
POSTN	<i>Periostin</i>
PRS	Polygenic risk score
PTCH1	<i>Patched 1</i>
PTEN	<i>Phosphatase and Tensin Homolog</i>
PVDF	Polyvinylidenfluorid
PXDN	<i>Peroxidasine</i>
qPCR	Quantitative Polymerase-Kettenreaktion
RAD50	<i>RAD50 Homolog</i>
RAD51AP1	<i>RAD51 Associated Protein 1</i>
RB1	<i>Retinoblastoma 1</i>
RET	<i>Ret proto-oncogene</i>
RFC	<i>Replication factor C</i>
RFC3	<i>Replication factor C 3</i>
RING	<i>Really Interesting New Gene</i>
RLU	<i>Relative light units</i>
RMA	<i>Robust multi-array average</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RQ	Relative Expression
RSPO3	<i>R-Spondin 3</i>
RT	Raumtemperatur



---

RTq-PCR	<i>Reverse transcription quantitative PCR</i>
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SEM	Standardfehler des Mittelwerts
SFRP1	<i>Secreted Frizzled-related Protein 1</i>
shRNA	<i>Small hairpin</i> Ribonukleinsäure
SINE	<i>Short interspersed nucleotide elements</i>
SMAD4	<i>SMAD Family Member 4</i>
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
SOCS3	<i>Suppressor Of Cytokine Signaling 3</i>
STK11	<i>Serine/Threonine Kinase 11</i>
TBP	<i>TATA Box Binding Protein</i>
TBX1	<i>T-box Protein 1</i>
TET2	<i>Tet Methylcytosine Dioxygenase 2</i>
TGFB	<i>Transforming Growth Factor beta</i>
TNC	<i>Tenascin C</i>
TP	Totalprotein
TP53	<i>Tumor protein p53</i>
TSG	Tumorsuppressorgen
TWIST1	<i>Twist Family BHLH Transcription Factor 1</i>
UC	Colitis ulcerosa
UDG	<i>Uracil-DNA Glycosylase 1</i>
UICM	Union Internationale Contre le Cancer
UV	Ultraviolett
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
VHL	<i>Von Hippel-Lindau Tumor Suppressor</i>
VTM	<i>Varigated translocation mosaicism</i>
WB	Western Blot
WIF1	<i>WNT Inhibitory Factor 1</i>
WISP1	<i>WNT1 Inducible Signaling Pathway Protein 1</i>
wt	<i>wildtype</i>
WT	Whole-Transcript-Gene-Array
XPA	<i>Xeroderma pigmentosum, complementation group A</i>
XPC	<i>Xeroderma pigmentosum, complementation group C</i>
XPE	<i>Xeroderma pigmentosum, complementation group E</i>



# Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 Mechanismen biallelischer Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen nach Knudsons „2-Hit-Hypothese“ .....	4
Abb. 2 Divergente Pathomechanismen der Entstehung von kolorektalen Karzinomen unter Beteiligung verschiedener TSG-Typen.....	6
Abb. 3 Schematische Struktur der Proteine BRCA1 (a) und BRCA2 (b).....	13
Abb. 4 Das BRCA1-Netzwerk.....	14
Abb. 5 Drei Typen epigenetischer Information.....	21
Abb. 6 Vererbungsmodi konstitutiver MLH1-Epimutationen in Familien mit Lynch-Syndrom.	24
Abb. 7 Erster Schritt der entwickelten Einzelzellklonierungsprozedur für primäre Hautfibroblasten.....	36
Abb. 8 Entfernen von überzähligen Zellen von den Deckgläschen zur Steigerung der Klonierungseffizienz .....	37
Abb. 9 Bisulfit-Konvertierung von nicht-methylierten Cytosinen zu Uracil.....	45
Abb. 10 Methylierungsmuster des BRCA1-Promoters in genomischer DNA aus A24-Fibroblasten (links) und D24-Fibroblasten (rechts).....	56
Abb. 11 Relative BRCA1-mRNA-Expression BRCA1 <sup>mosMe</sup> vs. BRCA1 <sup>wt</sup> Fibroblasten analysiert mittels RTq-PCR.....	57
Abb. 12 Basale BRCA1-Proteinexpression in totalen Proteinextrakten (TP) von BRCA1 <sup>mosMe</sup> vs. BRCA1 <sup>wt</sup> Fibroblasten analysiert mittels Western-Blot.....	58
Abb. 13 Dendrogramm der „complete linkage“ Cluster Analyse mit differenziell exprimierten Genen der je 4 Replikate der BRCA1 <sup>wt</sup> und BRCA1 <sup>mosMe</sup> Fibroblasten .....	62
Abb. 14 Vergleich der mRNA-Expressionslevel 10 ausgewählter Gene analysiert mittels Expressionsarray und RT-qPCR.....	63
Abb. 15 Heatmap der mRNA-Genexpressionswerte ausgewählter Gene in BRCA1 <sup>mosMe</sup> Fibroblasten vs. BRCA1 <sup>wt</sup> Fibroblasten.....	70
Abb. 16 Vergleich der mRNA-Expressionslevel ausgewählter CAF-Schlüsselgene in BRCA1 <sup>mosMe</sup> Fibroblasten vs. BRCA1 <sup>wt</sup> Fibroblasten mittels RT-qPCR. ....	71
Abb. 17 Molekulares Netzwerk um den „upstream regulator“ TGFB1, identifiziert mittels Ingenuity.....	74
Abb. 18 Molekulares Netzwerk um den „upstream regulator“ FGF2, identifiziert mittels Ingenuity.....	75
Abb. 19 Molekulares Netzwerk um den „upstream regulator“ TWIST1, identifiziert mittels Ingenuity.....	76
Abb. 20 10-tägige Wachstumskurven der BRCA1 <sup>mosMe</sup> und BRCA1 <sup>wt</sup> Fibroblasten der Zellkulturpassagen 6 und 11. ....	77

Abb. 21 Repräsentative Aufnahme einer indirekten Immunfluoreszenzfärbung des Kernantigens Ki-67 (rot) an BRCA1 <sup>mosMe</sup> vs. BRCA1 <sup>wt</sup> Fibroblasten.	78
Abb. 22 Statistische Auswertung der Ki-67-Immunfluoreszenzfärbung an BRCA1 <sup>mosMe</sup> vs. BRCA1 <sup>wt</sup> Fibroblasten.	79
Abb. 23 Zellzyklusanalyse der BRCA1 <sup>mosMe</sup> vs. BRCA1 <sup>wt</sup> Fibroblasten mittels FACS nach Propidiumiodid-Färbung.	80
Abb. 24 Repräsentatives Ergebnis für IBIDI-Migrationsassays der BRCA1 <sup>mosMe</sup> vs. BRCA1 <sup>wt</sup> Fibroblasten.	81
Abb. 25 Statistische Auswertung des IBIDI-Migrationsassay der BRCA1 <sup>mosMe</sup> vs. BRCA1 <sup>wt</sup> Fibroblasten.	82
Abb. 26 Repräsentative Aufnahme einer Phalloidin-färbung von F-Aktin (grün) und indirekten Immunfluoreszenzfärbung von Paxillin (rot) an BRCA1 <sup>mosMe</sup> vs. BRCA1 <sup>wt</sup> Fibroblasten.	83
Abb. 27 Repräsentative Aufnahme einer indirekten Immunfluoreszenzfärbung von Typ I Kollagen (rot) an BRCA1 <sup>mosMe</sup> vs. BRCA1 <sup>wt</sup> Fibroblasten.	84
Abb. 28 Ketonkörper-Konzentration in Zellkulturüberständen von BRCA1 <sup>mosMe</sup> und BRCA1 <sup>wt</sup> Fibroblasten gemessen mittels kolorimetrischem $\beta$ -Hydroxybutyrat-Assay.	85
Abb. 29 Exemplarische Aufnahme einer G-Bandenfärbung von Metaphase-Chromosomen von BRCA1 <sup>mosMe</sup> Fibroblasten.	87
Karyotyp: 46,XX,add(3)(p),der(4),der(9),der(11),add(12)(p). Die roten Kästen markieren chromosomale Rearrangements.	87
Abb. 30 Proliferationsassay der Zelllinien HMLE und A549 unter Kultivierung in Fibroblasten-konditioniertem Medium von BRCA1 <sup>wt</sup> und BRCA1 <sup>mosMe</sup> .	88
Abb. 31 Methylierungsanalyse des BRCA1-Promoters in BRCA1 <sup>mosMe</sup> , BRCA1 <sup>wt</sup> Fibroblasten und den aus BRCA1 <sup>mosMe</sup> gewonnenen Einzelzellklonen.	91
Abb. 32 Überblick über die zellulären Veränderungen, die mit der Aktivierung von Fibroblasten einhergehen.	98
Abb. 33 Metabolische Veränderungen, die mit der Aktivierung von Fibroblasten assoziiert sind.	104
Abb. 34 RSPO3-Genkopienanzahl in BRCA1 <sup>wt</sup> und BRCA1 <sup>mosMe</sup> Fibroblasten sowie in aus BRCA1 <sup>mosMe</sup> generierten Einzelzellklonen gemessen mittels genomischer SYBR-Green qPCR.	114
Abb. 35 NREP-Genkopienanzahl in BRCA1 <sup>wt</sup> und BRCA1 <sup>mosMe</sup> Fibroblasten sowie in aus BRCA1 <sup>mosMe</sup> generierten Einzelzellklonen gemessen mittels genomischer SYBR-Green qPCR.	114
Abb. 36 Komparative Venn-Analyse der differenziell exprimierten Gene zwischen BRCA1 <sup>wt</sup> vs. BRCA1 <sup>mosMe</sup> Fibroblasten und RSPO3/NREP <sup>+/+</sup> vs. RSPO3/NREP <sup>+/+</sup> Einzelzellklonen-Fibroblasten.	118

# Curriculum Vitae



# Wissenschaftliche Beiträge





