

„DNA-Reparatur-assoziierte
genetische und epigenetische Faktoren
für die Zweittumorentstehung
nach Tumoren im Kindes- und Jugendalter“

Dissertation

zur Erlangung des Grades
"Doktor der Naturwissenschaften"

am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität
in Mainz

Eva-Maria Weis

geb. am 23.08.1978

in Kaiserslautern

Mainz, 2011

Dekan: _____

1. Berichterstatter: _____

2. Berichterstatter: _____

Tag der mündlichen Prüfung: _____

Koautorenschaft

Alle in dieser Dissertation beschriebenen Arbeiten wurden vom Autor durchgeführt ausgenommen folgende Analysen, die in Zusammenarbeit mit Koautoren unter Anleitung des Autors angefertigt wurden: SNP-Arrays, FISH und genomische qPCRs (Miriam Grunow), DNA-Methylierungsanalysen (Marco Ludwig, Tamara Hansmann), mRNA-Expressionsanalysen mittels RTq-PCR (Holger Schön), Versuche mit den Zelllinien des Zwillingspaars (Benjamin Irscher).

Teile der vorliegenden Arbeit sind bereits veröffentlicht bzw. sollen in folgenden Publikationen veröffentlicht werden:

Weis E, Schön H, Victor A, Spix C, Ludwig M, Schneider-Rätzke B, Kohlschmidt N, Bartsch O, Gerhold-Ay A, Boehm N, Grus F, Haaf T, Galetzka D. Reduced mRNA and protein expression of the genomic caretaker RAD9A in primary fibroblasts of individuals with childhood and independent second cancer. PLoS ONE 2011; 6(10): e25750. Epub 2011 Okt 3.

Galetzka D, Hansmann T, El Haji N, **Weis E**, Irmischer B, Ludwig M, Schneider-Rätzke B, Kohlschmidt N, Beyer V, Bartsch O, Zechner U, Spix C, Haaf T. Monozygotic twins discordant for constitutive *BRCA1* promoter methylation, childhood cancer and secondary cancer. EPIGENETICS; under revision.

Victor A, **Weis E**, Messow CM, Schneider-Rätzke B, Kohlschmidt N, Marron M, Haaf T, Spix C, Galetzka D. Searching for Gene expression differences in primary fibroblasts between patients with one and two neoplasms in childhood. Pediatric Blood & Cancer; under revision.

Inhaltsverzeichnis	Seite
1. Einleitung	1
1.1. Krebs im Kindesalter	1
1.2. DNA-Schäden	2
1.3. Zellzykluscheckpoints, DNA-Reparatur und Zelltod	3
1.4. Karzinogenese	5
1.5. Krebsgene	6
1.6. Krebs und Epigenetik	7
1.7. Krebstherapie	8
1.8. Zielsetzung der Arbeit	10
2. Material und Methoden	12
2.1. Material	12
2.1.1. Verwendete Geräte	12
2.1.2. Verwendete Chemikalien und Reagenzien	12
2.1.3. Patienten und Probenmaterial	13
2.1.3.1. 2N-Patient mit gesundem monozygoten Zwilling	13
2.2. Methoden	15
2.2.1. Zellkultur der Fibroblasten	15
2.2.1.1. Kultivierung der Fibroblasten	15
2.2.1.2. Auftauen der Fibroblasten	15
2.2.1.3. Subkultivierung/Passagieren	15
2.2.1.4. Kryokonservierung	16
2.2.1.5. Zellzahlbestimmung	16
2.2.1.6. Behandlungsexperimente	17
2.2.1.6.1. Behandlung mit radioaktiver γ -Strahlung (^{137}Cs -Quelle)	17
2.2.1.6.2. Behandlung mit UV-C-Strahlung	17
2.2.1.6.3. Behandlung mit Daunorubicin	18
2.2.1.7. Herstellung von Zellpellets	18
2.2.2. Immunfluoreszenznachweis von DSB mit γH2AX -Antikörpern	19
2.2.3. Genexpressionsanalyse	20
2.2.3.1. Totale RNA-Extraktion	20
2.2.3.2. cDNA-Synthese mit Alexa Fluor®-Direktmarkierung für die cDNA-Microarray-Hybridisierung	21
2.2.3.3. cDNA-Microarray-Herstellung	22
2.2.3.3.1. PCR-Amplifikation der cDNA	22
2.2.3.3.2. Sequenzierung	24
2.2.3.3.3. Ethanol-fällung der PCR-Produkte und Aufbereitung zum Spotten	25
2.2.3.4. cDNA-Microarray-Experiment	25
2.2.3.4.1. Denaturierung und Aktivierung des cDNA-Microarraychips	25
2.2.3.4.2. cDNA-Microarray-Hybridisierung	26
2.2.3.4.3. Fluoreszenzdetektion und Auswertung der Microarray-Daten durch das Institut für Medizinische Biometrie, Epidemiologie und Informatik (IMBEI)	27
2.2.3.5. cDNA-Synthese für die Real-Time-quantitative-PCR (RTq-PCR)	28
2.2.3.6. Real-Time-quantitative-PCR (RTq-PCR)	28
2.2.3.7. Proteinextraktion	30
2.2.3.8. Western Blot	31
2.2.3.9. Antikörper-Microarray-Herstellung	32
2.2.3.10. Protein-Markierung	33
2.2.3.11. Antikörper-Microarray-Experiment	34
2.2.4. DNA-Extraktion	35

2.2.5. Epigenetische Untersuchung der DNA-Methylierung	35
2.2.5.1. Bisulfit-Konversion genomischer DNA	35
2.2.5.2. Pyrosequenzierung	35
2.2.6. Untersuchung von Genkopiezahlvariationen	37
2.2.6.1. SNP-Array-Analysen	37
2.2.6.2. Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung (FISH)	37
2.2.6.3. Genomische RTq-PCR	39
2.2.6.3.1. Genomische RTq-PCR mit SYBR Green I	39
2.2.6.3.2. Genomische RTq-PCR mit UPL-Assays (Roche)	41
3. Ergebnisse	43
3.1. Genexpressionsanalysen	43
3.1.1. cDNA-Microarray-Screening	43
3.1.1.1. Probandengruppenvergleich	43
3.1.1.1.1. mRNA-Expression in den uninduzierten Probandenfibroblasten der 2N-Gruppe im Vergleich zur 1N-Gruppe	43
3.1.1.2. Zwillingsvergleich	48
3.1.1.2.1. mRNA-Expression in den uninduzierten Probandenfibroblasten des 2N-Probanden KKR A24 im Vergleich zu seinem monozygoten gesunden Zwilling KKR D24	48
3.1.2. RTq-PCR	48
3.1.2.1. Auswahl endogener Kontrollgene für die RTq-PCR	48
3.1.2.2. mRNA-Expression der mittels Microarray ausgewählten Gene in den uninduzierten Kontrollfibroblasten	49
3.1.2.3. Probandengruppenvergleich	50
3.1.2.3.1. mRNA-Expression der Microarray-Gene in den uninduzierten Probandenfibroblasten der 2N-Gruppe im Vergleich zur 1N-Gruppe	50
3.1.2.3.2. mRNA-Expression auffälliger Gene in den Probandenfibroblasten der 2N-Gruppe im Vergleich zur 1N-Gruppe nach Induktion durch 1 Gy Bestrahlung	53
3.1.2.4. Zwillingsvergleich	54
3.1.2.4.1. mRNA-Expression der Kandidatengene in den uninduzierten Fibroblasten des 2N-Probanden KKR A24 im Vergleich zu seinem monozygoten gesunden Zwilling KKR D24	54
3.1.2.4.2. mRNA-Expression ausgewählter Gene in den Fibroblasten des 2N-Probanden KKR A24 im Vergleich zu seinem monozygoten gesunden Zwilling KKR D24 nach Induktion durch 1 Gy Bestrahlung	57
3.1.3. Western Blot zur Validierung des RAD9A-Antikörpers	60
3.1.4. Antikörper-Microarrays	62
3.1.4.1. Probandengruppenvergleich	62
3.1.4.1.1. Proteinexpression in den uninduzierten Probandenfibroblasten der 2N-Gruppe im Vergleich zur 1N-Gruppe	62
3.1.4.1.2. Proteinexpression in den Probandenfibroblasten der 2N-Gruppe im Vergleich zur 1N-Gruppe nach Induktion durch 1 Gy Bestrahlung	64
3.1.4.2. Zwillingsvergleich	67
3.1.4.2.1. Proteinexpression in den uninduzierten Fibroblasten des 2N-Probanden KKR A24 im Vergleich zu seinem monozygoten gesunden Zwilling KKR D24	67
3.1.4.2.2. Proteinexpression nach Induktion durch 1 Gy Bestrahlung in den Fibroblasten des 2N-Probanden KKR A24 im Vergleich zu seinem monozygoten gesunden Zwilling KKR D24	68
3.2. Methylierungsanalysen	71
3.2.1. Methylierungsanalysen der uninduzierten Fibroblasten aller 1N- und 2N-Probanden einschließlich des monozygoten Zwillingspaars KKR A24 (2N) und KKR D24 (gesund)	71
3.2.2. <i>BRCA1</i> -Methylierungsanalyse nach Induktion durch 1 Gy Bestrahlung in den Fibroblasten des 2N-Probanden KKR A24 im Vergleich zu seinem monozygoten gesunden Zwilling KKR D24	73
3.3. γ H2AX-DNA-Reparaturdetektion nach Induktion	74

3.3.1. Radioaktive Bestrahlung	75
3.3.1.1. Etablierung und Vorversuche zur halbautomatisierten Auswertung mit der Metafer 4 Software (Metasystems)	75
3.3.1.2. γ H2AX-Foci-Zählung 30 min, 4 h und 24 h nach 1 Gy Bestrahlung in den Fibroblasten von sechs Kontrollen und allen 2N-Probanden	76
3.3.2. Andere Noxen im Pilotexperiment	77
3.3.2.1. γ H2AX-Foci-Zählung 30 min, 4 h, 12 h und 24 h nach UV-C-Bestrahlung (20 J/m^2) in Fibroblasten des 2N-Probanden KKR A24 und seines monozygoten gesunden Zwillings KKR D24	78
3.3.2.2. γ H2AX-Foci-Zählung 1 h, 4 h, 12 h und 24 h nach Daunorubicin-($3 \mu\text{M}$, 2 h)-Behandlung der Fibroblasten des 2N-Probanden KKR A24 und seines monozygoten gesunden Zwillings KKR D24	79
3.4. Genkopienzahlanalysen	80
3.4.1. SNP-Array-Screening der unbehandelten Fibroblasten-DNA aller 1N- und 2N-Probanden einschließlich des monozygoten Zwillingspaars KKR A24 (2N) und KKR D24 (gesund)	80
3.4.2. Pilotexperimente zur Validierung der SNP-Array-Ergebnisse mittels FISH und genomischer quantitativer PCR (mit SYBR Green)	81
3.4.3. Validierung der SNP-Array-Ergebnisse für den 2N-Probanden KKR A24 und seinen monozygoten gesunden Zwillings KKR D24 mittels genomischer qPCR mit UPL-Sonden	85
4. Diskussion	87
4.1. Das Patientenkollektiv und das Kontrollkollektiv	87
4.2. Das Untersuchungsmaterial	88
4.3. Probandengruppenvergleich	89
4.3.1. Basale mRNA-Expression (cDNA-Microarray)	89
4.3.2. mRNA-Expression (RTq-PCR)	90
4.3.2.1. Basale mRNA-Expression	90
4.3.2.2. Induzierte mRNA-Expression	92
4.3.3. Proteinexpression	94
4.3.3.1. Basale Proteinexpression	94
4.3.3.2. Induzierte Proteinexpression	96
4.3.4. DNA-Methylierung	98
4.3.5. DNA-Reparaturkinetik	99
4.3.6. DNA-Kopienzahlvariationen (Copy Number Variations, CNVs)	100
4.3.7. Zusammenfassung des Probandengruppenvergleichs und mögliche Schlussfolgerungen	101
4.3.8. Ausblick Probandengruppenvergleich	103
4.4. Zwillingsvergleich	104
4.4.1. mRNA-Expression (cDNA-Microarray)	104
4.4.2. mRNA-Expression (RTq-PCR)	104
4.4.2.1. Basale mRNA-Expression	104
4.4.2.2. Induzierte mRNA-Expression	106
4.4.3. Proteinexpression	108
4.4.3.1. Basale und induzierte Proteinexpression	108
4.4.4. DNA-Methylierung	110
4.4.5. DNA-Reparaturkinetik	111
4.4.6. DNA-Kopienzahlvariationen	113
4.4.7. Ergebniszusammenfassung des Zwillingsvergleichs und mögliche Schlussfolgerungen	114
4.4.8. Ausblick Zwillingsvergleich	115
5. Zusammenfassung	116
6. Literatur	117
7. Anhang	122

I. Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
%	Prozent
1N	Ersttumorprobanden
2N	Zweitumorprobanden
A	Absorption
Abb.	Abbildung
ALL	Akute lymphatische Leukämie
AML	Akute myeloische Leukämie
AK	Antikörper
BAC	<i>Bacterial Artificial Chromosome</i>
bkg	<i>background</i> ; Hintergrund
bp	Basenpaar
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i> ; Rinderserumalbumin
bzgl.	Bezüglich
bzw.	Beziehungsweise
B-CLL	Chronische lymphatische Leukämie vom B-Zelltyp
ca.	Zirka
cDNA	<i>Complementary DNA</i> ; komplementäre DNA
CGH	<i>Comparative Genomic Hybridisation</i>
CLL	Chronische lymphatische Leukämie
cm	Zentimeter
CpG	Dinukleotid mit der Basenfolge CG in 5'-3'-Orientierung
Cs	Cäsium
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DEPC	Diethylpyrocarbonat
del	Deletion
Δ	Delta
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	2'-Desoxyribonukleosid-5'-triphosphat
DPBS	<i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline</i>
DSB	Doppelstrangbrüche
dsDNA	Doppelsträngige DNA
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EtBr	Etidiumbromid
EtOH	Ethanol
FAM	6-Carboxyfluorescein
FDR	<i>False Discovery Rate</i>
Fib.	Fibroblasten
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
FKS	<i>Fetal Calf Serum</i> ; fetales Kälberserum
g	Erdbeschleunigung (9,81 m/s ²)
g	Gramm
Gy	Gray
γ	Gamma
h	Stunde
HCl	Salzsäure
H2AX	Histon 2AX
H ₂ O bidest.	Bidestilliertes Wasser
ID	Identifikationsnummer
Ig	Immunglobulin

IMBEI	Institut für Medizinische Biometrie, Epidemiologie und Informatik
J	Joule
kb	Kilobasenpaar
kDa	Kilodalton
KKR	Kinderkrebsregister
l	Liter
m	Meter
M	mol/l
Mb	Megabasenpaar
min	Minute
ml	Milliliter
mRNA	<i>Messenger</i> RNA; Boten-RNA
Mut.	Mutation
μ	Mikro
n	Nano
NaOH	Natronlauge
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information, USA</i>
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> ; Phosphat gepufferte Salzlösung
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> ; Polymerasekettenreaktion
POD	Peroxidase
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz (RNA-Silencing)
RNase	Ribonuklease
rpm	<i>Rounds per minute</i> ; Umdrehungen pro Minute
rRNA	Ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
RT	Reverse Transkription
RTq-PCR	Real-Time-quantitative Polymerasekettenreaktion
RZPD	Deutsches Ressourcenzentrum für Genomforschung GmbH
SDS	Natriumdodecylsulfat oder Natriumdodecylsulfat
sec	<i>Second</i> ; Sekunde
Seq	Sequenzierung
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i> ; Einzelbasenaustausch
SSC	Saline-Natrium-Citrat
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBS	<i>Tris Buffered Saline</i> ; Tris gepufferte Salzlösung
Tm	Annealing Temperatur
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
T-CLL	Chronische lymphatische Leukämie vom T-Zelltyp
U	Spannung
u. a.	Unter anderem
UV	Ultraviolette Strahlung
ü. N.	Über Nacht
V	Volt
vs	Versus
VSN	Varianzstabilisierung
wt	Wildtyp
z. B.	Zum Beispiel

1. Einleitung

1.1. Krebs im Kindesalter

Krebs ist nach den Herz-Kreislaufkrankungen die zweithäufigste Todesursache in Europa. Krebs bezeichnet die maligne Entartung von Zellen und wird durch Umweltfaktoren, ungesunde Lebensweise wie Rauchen und genetische Defekte verursacht [1].

Krebs bei Kindern und Jugendlichen macht insgesamt nur ca. 1% aller Krebserkrankungen beim Menschen aus, ist aber dennoch die häufigste tödliche Erkrankung und die zweithäufigste Todesursache bei europäischen Kindern nach dem ersten Lebensjahr. In Europa wird jährlich bei 15.000 Kindern und Jugendlichen eine Krebserkrankung diagnostiziert. Die häufigsten Krebserkrankungen bei Kindern und Jugendlichen sind Leukämien (34%), Tumore des Zentralen Nervensystems (ZNS) (20%) und Lymphome (13%). Leukämien sind bösartige Erkrankungen des Blutbildenden Systems mit Entstehung im Rückenmark. Primäre ZNS-Tumoren sind solide Tumoren, die im Gehirn oder Rückenmark entstehen. Maligne Lymphome sind Krebserkrankungen, die von Zellen des lymphatischen Systems ausgehen und als Hauptmerkmal Schwellungen der Lymphknoten zeigen [2].

Bei Kindern, die an Krebs erkranken, spielen exogene Faktoren wie Umweltbelastungen und ungesunde Lebensweise wahrscheinlich eine geringere Rolle als im Erwachsenenalter, so dass genetische Faktoren hier eine wichtige Ursache sein können. Allerdings sind nur für wenige (<10%) Krebserkrankungen im Kindesalter genetische Risikofaktoren bekannt [3]. Bei Kindern mit einem Zweitumor ist der Anteil der Fälle mit erblichem Faktor höher [4,5].

Zum Beispiel kommen genetische DNA-Reparaturdefekte vor, die häufig mit einer erhöhten Chromosomenbrüchigkeit, einer stärkeren Empfindlichkeit gegenüber DNA-Schädigung und einem erhöhtem Tumorrisiko einhergehen, wie z. B. die Fanconi-Anämie (Mutation in den *FANC*-Genen; AML-Leukämien), die Ataxia teleangiectatica (Mutation im *ATM*-Gen; Leukämien und Hodgkin-Lymphome), Xeroderma pigmentosum (Mutation in den *XP*-Genen u.w.; Hautkrebs) und das Li-Fraumeni-Syndrom (Mutation im *p53*-Tumorsuppressorgen; Leukämien und Hirntumore). Allerdings konnte bei den an einem Zweitumor erkrankten Kindern nur in seltenen

Fällen ein genetisches Syndrom mit DNA-Reparaturdefekt festgestellt werden [6]. Für die meisten Zweittumore, die in keinem Zusammenhang mit der ersten Krebserkrankung stehen, ist die Ätiologie unbekannt. Bei diesen Fällen mit wiederkehrender Tumorentwicklung besteht eine erhöhte Wahrscheinlichkeit für genetische Defekte z. B. in Zellzyklus-, DNA-Reparatur- oder DNA-Reparaturassoziierten Genen. Moderne genetische Untersuchungsmethoden wie z. B. Microarrays bieten hierbei eine gute Möglichkeit, potenzielle Krebsrisikofaktoren für kindliche Krebserkrankungen zu ermitteln [7].

Im Falle einer kindlichen Krebserkrankung kann mit Zustimmung des Betroffenen bzw. der Eltern eine Eintragung in das Deutsche Kinderkrebsregister erfolgen. Das Deutsche Kinderkrebsregister, welches am Mainzer Institut für Medizinische Biometrie, Epidemiologie und Informatik (IMBEI) angesiedelt ist, arbeitet seit 1980 als ein flächendeckendes, bundesweites epidemiologisches Krebsregister. Über 35.000 Erkrankungsfälle bei einer Bevölkerung von 13 Millionen Kindern bilden die Datengrundlage. Ein wichtiges Charakteristikum des Kinderkrebsregisters ist die Möglichkeit, Patienten lange nach ihrer Diagnose bis weit in das Erwachsenenalter hinein zu kontaktieren. Das Kinderkrebsregister hat günstige Rahmenbedingungen durch die gute Mitarbeit der betroffenen Familien und das generelle öffentliche Interesse, das dem Thema Krebs bei Kindern zukommt [8].

Das Deutsche Kinderkrebsregister hat diese Studie zur Untersuchung genetischer Risikofaktoren für Krebs im Kindesalter möglich gemacht, in dem ehemalige Patienten kontaktiert werden konnten und von ihnen biologische Proben für genetische Analysen zur Verfügung gestellt wurden. Die Bestimmung genetischer Risikofaktoren für Krebs ist ein wichtiges Ziel der medizinischen Forschung, da dies die Diagnostik und Therapie von Krebs verbessern könnte.

1.2. DNA-Schäden

Krebs ist eine genetische Erkrankung somatischer Zellen und ist mit DNA-Schäden und fehlerhafter DNA-Reparatur assoziiert. DNA-Schäden können durch endogene und exogene Faktoren verursacht werden. Zu den endogenen Schäden gehören z. B. Fehler während der DNA-Replikation. Außerdem können reaktive Sauerstoffspezies, die als normale Stoffwechselnebenprodukte in der Zelle

entstehen, spontane Mutationen verursachen. Eine endogene DNA-Schädigung kann zur Oxidation, Alkylierung oder Hydrolyse (Desaminierung, Depurinierung, Depyrimidierung) der Basen, Bildung sterisch ungünstiger Addukte, Mismatches während der Replikation und DNA-Brüchen führen [9]. Zu den exogenen Faktoren, die DNA-Schäden bewirken können, gehören z. B. UV-, Röntgen- und γ -Strahlung, thermale Disruption, mutagene Chemikalien (z. B. DNA-interkalierende Agentien) und Viren. UV-B- und UV-C-Strahlung führen über die Bildung von Pyrimidindimeren und Photoaddukten, welche die Replikation stören, zu direkten DNA-Schäden, UV-A-Licht produziert hingegen freie Radikale und schädigt die DNA so indirekt. Ionisierende Strahlung, wie sie z. B. bei radioaktivem Zerfall entsteht oder in kosmischer Strahlung vorkommt, verursacht Einzel- und Doppelstrangbrüche der DNA-Stränge. Hierbei spielen die DNA-Doppelstrangbrüche (DSBs) eine biologisch wichtige Rolle, da unreparierte oder falsch reparierte DSBs zu genomischer Instabilität führen können und potenziell letal für die Zelle sind. Thermale Disruption bei erhöhter Temperatur führt zum Anstieg der Depurinierungsrate und zu Einzelstrangbrüchen der DNA. Chemische Agenzien hingegen können zu einer breiten Diversität an DNA-Addukten und Crosslinks der DNA führen [10,11]. Zum Beispiel das Anthracyclin Daunorubicin, welches als Chemotherapeutikum gegen verschiedene Krebsarten eingesetzt wird, interkaliert zwischen den Nukleinbasen der DNA und blockiert durch Inhibition der Topoisomerase II die Transkription und die Replikation in der Zelle. Diese Wechselwirkungen von Daunorubicin führen zur Ausbildung und Akkumulation von DSBs über den Zellzyklus [12].

1.3. Zellzykluscheckpoints, DNA-Reparatur und Zelltod

Durch DNA-Schäden werden verschiedene Checkpoints im Zellzyklus aktiviert. An diesen Checkpoints (Abbildung 1) werden Stoffwechselwege in Gang gesetzt, die spezifische DNA-Reparaturmechanismen in den verschiedenen Phasen des Zellzyklus regulieren. Arretierte Zellen setzen nach erfolgter DNA-Reparatur den Zellzyklusverlauf fort, wohingegen Zellen mit irreparablen DNA-Läsionen einen permanenten Zellzyklusarrest oder Apoptose erfahren [13].

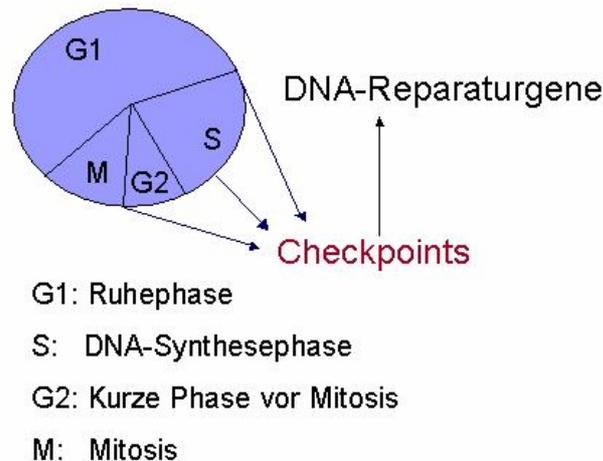


Abbildung 1.: Zellzykluscheckpoints, G1 zu S-Phase (G1/S Checkpoint), DNA-Replikation (Intra-S Checkpoint) oder G2 zu Mitose (G2/M Checkpoint), zur DNA-Reparatur im Zellzyklus.

Die Histonvariante H2AX, ein Mitglied der H2A-Proteinfamilie, ist ein Teil des Nukleosomkomplexes und wichtig für die Erhaltung der genomischen Stabilität der Zelle. Bei Vorliegen von DNA-Doppelstrangbrüchen in der Zelle erfolgte eine unmittelbare Phosphorylierung an Serin 139 des Histons H2AX durch Kinasen. Das phosphorylierte Protein, γ -H2AX, stellt den ersten Schritt der Rekrutierung und Lokalisierung weiterer DNA-Reparaturproteine dar und kann mittels Immunfluoreszenztechnik als diskrete nukleäre Foci an den Stellen der DNA-Doppelstrangbrüche sichtbar gemacht werden [14].

Die verschiedenen DNA-Reparaturmechanismen, wie z.B. Basenexzisionsreparatur (BER), DNA-Mismatch-Reparatur (MMR), Nukleotidexzisionsreparatur (NER), homologe (HR) und nicht-homologe (NHEJ) Rekombinationsreparatur sind zur Aufrechterhaltung der Genomintegrität essentiell und in komplizierten Netzwerken miteinander verflochten. Eine fehlerhafte DNA-Reparatur führt zu DNA-Schäden und nachfolgend entweder zum Zelltod oder zu Mutationen und dadurch möglicherweise zur Krebsentstehung. Derzeit sind etwa 150 menschliche Gene mit gesicherter DNA-Reparaturfunktion bekannt. Mehrere hundert weitere Gene für Zellproliferation, Zellzykluskontrolle und Apoptose sind indirekt mit DNA-Reparaturvorgängen assoziiert [15].

Bei der Basenexzisionsreparatur (BER) wird eine einzelne Base, die durch Alkylierung, Oxidation, Hydrolyse oder Desaminierung geschädigt wurde, entfernt und ersetzt. Die DNA-Mismatch-Reparatur (MMR) korrigiert Fehler der DNA-Replikation und Rekombination, die in der Hauptsache zu A-G- und T-C-

Nukleotidfehlpaarungen führen. Bei der Nukleotidexzisionsreparatur (NER) werden sperrige, Helix-deformierende Läsionen der DNA wie z. B. durch UV-Licht entstandene Pyrimidindimere repariert. Die homologe Rekombination (HR) und die nicht-homologe Rekombinationsreparatur (NHEJ) werden verwendet, um DNA-Doppelstrangbrüche im Genom zu reparieren. Deshalb sind diese Reparaturmechanismen essentiell zur Erhaltung der genomischen Integrität. Die HR-Reparatur behebt Schäden über den Prozess der homologen Rekombination unter Verwendung homologer DNA-Sequenzen als Template. Bei Säugern kommt die nicht-homologe Rekombinationsreparatur (NHEJ) häufiger zum Einsatz. Hierbei werden die DNA-Enden ohne die Verwendung von Sequenzhomologien religiert, was allerdings eine höhere Fehleranfälligkeit zur Folge hat [16].

Eine irreparable DNA-Schädigung kann zum Tod der Zelle führen. Der häufigste Mechanismus des Zelltods ist die Apoptose. Die Apoptose, ein programmierter Zelltod, ist ein aktiver und kontrollierter Prozess, der ohne Auslösung einer Immunreaktion und ohne Schädigung des Nachbargewebes abläuft. Bei der Apoptose schrumpft die Zelle, da sie durch Caspasen, Enzyme mit proteolytischer Aktivität, fragmentiert wird und in apoptotische Körperchen verpackt wird. Die DNA wird dabei durch Endonukleasen zerkleinert; Makrophagen vernichten die Zellreste. Eine andere Form des Zelltods ist die Nekrose, die mit Entzündungsprozessen assoziiert ist und zur Krebsentstehung führen kann. Die Nekrose stellt das Ende einer bioenergetischen Katastrophe aufgrund einer ATP-Unterversorgung in der Zelle dar. Dabei schwillt die Zelle durch Vakuolisierung des Zytoplasmas an, wodurch die Plasmamembran zerstört wird. Als Folge kommt es zu Entzündungen, da Zytoplasma, Zellorganellen und proinflammatorische Moleküle in den extrazellulären Raum freigesetzt werden [17].

1.4. Karzinogenese

Die Karzinogenese beschreibt die Tumorentwicklung ausgehend von einer gesunden, funktionalen Körperzelle in eine maligne Tumorzelle. DNA-Schädigung und dadurch bedingte Mutationen sind Grundvoraussetzung für die Karzinogenese. Tumoren entstehen durch einen komplexen mehrstufigen Prozess und sind meistens klonal, d. h. gehen aus einer Zelle hervor. Es wird angenommen, dass die Zelle in

einem beliebigen Entwicklungsstadium eine Mutation erfährt und dann durch einen erhöhten Wachstumsreiz zur Proliferation angeregt wird. Hierbei kommt es durch die Akkumulation weiterer Mutationen schließlich zur malignen Transformation zur unsterblichen Krebszelle (Bsp. in Abbildung 2: mehrere Mutationen bei der Entstehung des Colon-Karzinoms). Krebszellen zeigen ein unkontrolliertes, ungeordnetes, undifferenziertes Zellwachstum, haben eine hohe Mutationsrate und sind aneuploid. Sie können durch weitere Veränderungen zusätzliche, die Krankheit erschwerende Fähigkeiten erlangen wie z. B. unter Hypoxie zu überleben, eine eigene Blutversorgung (Angiogenese) aufzubauen oder zu metastasieren [18].

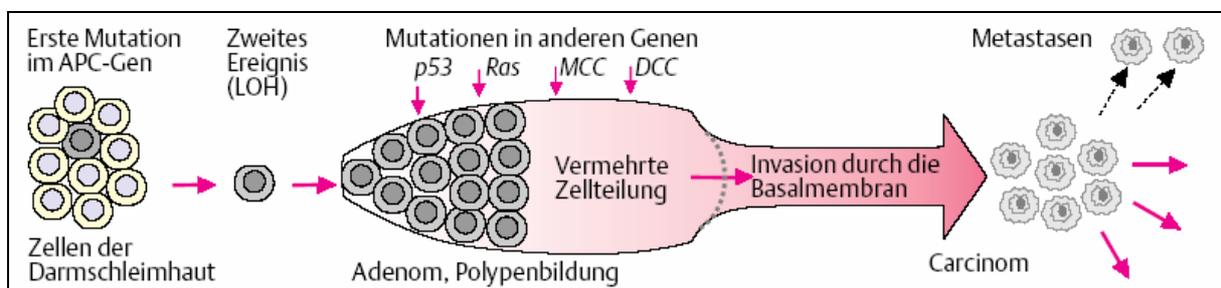


Abbildung 2.: Mehrere Mutationen bei der Entstehung des Colon-Karzinoms (aus Passarge, E.: Taschenatlas der Genetik (ISBN 3-13-759502-9) ©2004 Georg Thieme Verlag, Stuttgart)

1.5. Krebsgene

Genetische Faktoren, wie z. B. Mutationen in Genen, tragen zur Krebsentstehung bei und stellen eine Tumorprädisposition dar. Die Identifizierung konstitutionell mutierter Krebsprädispositionsgene liefert biologisch wichtige, auch für die Klinik relevante Einblicke in die Krebsgenetik. Eine Krebsprädisposition beruht zumeist auf Veränderungen in drei Gruppen von Genen, Onkogenen, Tumorsuppressorgenen und Stabilitätsgenen. Mutationen solcher Krebsgene können in der Keimbahn vorkommen und zu einer erblichen Krebsprädisposition führen. Sporadische Tumore können durch Mutationen in somatischen Zellen entstehen [19].

Onkogene sind auf solche Weise mutiert, dass sie im Vergleich zum Wildtyp-Gen konstitutiv oder unter bestimmten Bedingungen aktiviert vorliegen. Diese Aktivierung kann durch chromosomale Translokationen, Genamplifikationen oder intragenische Mutationen, die das Genprodukt regulieren, hervorgerufen werden. Eine Mutation in einem Onkogen ist vergleichbar mit einem ständig durchgedrückten Gaspedal eines Autos. Bei einem Onkogen reicht zur Initiierung der Karzinogenese schon die Veränderung eines Allels aus [20].

Mutationen in Tumorsuppressorgenen führen dagegen zu einer Reduzierung der Aktivität des Genprodukts gegenüber dem Wildtyp-Gen. Solche Inaktivierungen können durch Missense-Mutationen in für die Aktivität relevanten Bereichen, Protein verkürzende Mutationen, Deletionen, Insertionen oder epigenetisches Stilllegung verursacht werden. Eine Mutation in einem Tumorsuppressorgen ist vergleichbar mit einer nicht funktionierenden Bremse eines Autos; das Auto wird nicht anhalten, auch wenn der Fahrer versucht zu bremsen. Bei Tumorsuppressorgenen bedarf es zur Initiierung der malignen Entartung der Zelle zumeist den Funktionsverlust beider Allele (two-hit Hypothese) [21].

Eine weitere Gruppe der Krebsgene sind die so genannten Stabilitätsgene. Dazu gehören vor allem die DNA-Reparaturgene, die eine wichtige Rolle in der Reparatur spontan entstandener oder induzierter DNA-Schäden spielen. Weitere Stabilitätsgene kontrollieren Prozesse wie z. B. die chromosomale Segregation. Eine wichtige Rolle spielt hierbei unter anderem das Gen *BRCA1*, das mutiert mit Brust- und Eierstockkrebs assoziiert ist. Bei Leukämien liegen häufig chromosomale Translokationen vor, aber es wurden auch Mutationen in den Stabilitätsgenen *ATM* und *BLM* gefunden. Stabilitätsgene sind sehr wichtig, da sie genetische Veränderungen auf einem Minimum halten. Eine Inaktivierung dieser Gene führt zu einer erhöhten Mutationsrate in anderen Genen und fördert so die Tumorgenese. Stabilitätsgene stellen mutiert oder in der Expression verändert einen Krebsprädispositionsfaktor dar [10,19]. Neben genetischen sind aber auch epigenetische Veränderungen bei der Krebsentstehung relevant.

1.6. Krebs und Epigenetik

Epigenetische Modifikationen, wie z. B. die Methylierung der DNA und Histonmodifikationen, sind wichtige molekulare Mechanismen zur Regulation der Genexpression ohne eine direkte Veränderung der DNA-Sequenz selbst. Die DNA-Methylierung ist essentiell für die Entwicklung bei Säugern, entscheidend für die genomische Prägung und spielt eine Rolle bei der Erhaltung der genomischen Stabilität und der Dosiskompensation. Aberrante DNA-Methylierung wurden bei verschiedenen Krankheiten festgestellt. Bei der Entstehung und dem Wachstum von Krebs sind solche epigenetischen Veränderungen neben den genetischen Aberrationen (Mutationen) von besonderer Bedeutung. Aberrante Veränderungen in

Histonmodifikationen und der DNA-Methylierung wie z. B. genomweite Hypomethylierung und genspezifische Hypermethylierung sind bei Krebs charakteristisch. Insbesondere wird eine Hypermethylierung von Tumorsuppressorgenen während der Tumorgenese beobachtet, die in der Promotorregion mit der Abschaltung des Gens assoziiert ist [22]. Der Nachweis tumorspezifischer DNA-Methylierungsmuster könnte eine frühe, präzise Krebsdiagnose erlauben und von therapeutischem Nutzen sein. Im Unterschied zu Veränderungen auf DNA-Ebene sind epigenetische Modifikationen potenziell reversibel, somit besteht die Möglichkeit, Wirkstoffe, die an Enzymen angreifen, welche an der epigenetischen Regulation der Genexpression beteiligt sind, als effektive Instrumente zur Therapie und Prävention von Krebs einzusetzen [23].

1.7. Krebstherapie

So vielfältig wie das Erscheinungsbild und die Biologie der verschiedenen Krebserkrankungen so unterschiedlich sind auch die Therapiemöglichkeiten. Welche Behandlungsstrategie die wirkungsvollste ist, hängt von der jeweiligen Krebsart ab. Es gibt neuere Therapieansätze wie z. B. die Immuntherapie, die Hormontherapie, Hemmung der Angiogenese und die Gentherapie. Die drei klassischen Behandlungsmethoden in der Onkologie sind aber immer noch die chirurgische Entfernung des Tumors, die Radiotherapie und die Chemotherapie. Bei der Radiotherapie wird lokal ionisierende Strahlung auf den Tumor angewendet, was zu Doppelstrangbrüchen der DNA und zur Apoptose der Tumorzellen führen soll. Es werden vorwiegend γ -Strahlung, Röntgenstrahlung und Elektronen verwendet. In der medizinischen Strahlentherapie wird die Strahlung meist mit Hilfe eines linearen Teilchenbeschleunigers erzeugt [24]. Bei der systemisch wirksamen Chemotherapie werden dem Krebspatienten Zytostatika, natürliche oder synthetische Substanzen, die das Zellwachstum beziehungsweise die Zellteilung hemmen, verabreicht. Zytostatika haben grob eingeteilt vier verschiedene Wirkungsmechanismen: DNA-Schädigung, Eingriff in die DNA-Synthese, Schädigung der Mitosespindel und endokrinaktive Substanzen. Da diese Substanzen die Zelle in unterschiedlichen Phasen des Zellzyklus beeinflussen, werden für eine optimale Wirkung häufig mehrere Medikamente kombiniert angewandt [25].

Der Behandlung von Tumoren durch Chemotherapie und Bestrahlung liegen die

gleichen Wirkmechanismen wie bei der Tumorentstehung zu Grunde, jedoch wirken sie dabei vor allem auf proliferierende Zellen und führen so vorwiegend zum Absterben der Tumorzellen. Es ist nachgewiesen, dass Bestrahlung und DNA-schädigende Agenzien, wie sie in der Chemotherapie zum Einsatz kommen, an Tiermodellen und beim Menschen auch Leukämien und andere Krebsarten bedingen können [26,27]. Einerseits lassen sich also Tumorzellen damit zerstören, andererseits führen diese Therapien zu starken zytotoxischen Nebenwirkungen und einer erhöhten Mutationsrate in gesunden Körperzellen, was langfristig zur Bildung eines Sekundärtumors führen kann. Nachweislich stellt die Behandlung einer Ersttumor-erkrankung mit Radio- oder Chemotherapie einen Risikofaktor für eine Zweittumorentwicklung dar [28]. Problematisch ist zudem die Resistenzentwicklung der Tumorzellen, falls Tumorzellen bei einer Therapie nicht effizient abgetötet werden. Tumorzellen können Resistenzen z. B. durch die erhöhte Expression des *MDR1*-Gens (multidrug resistance gene) entwickeln, was zu einer verstärkten Ausschleusung der Chemotherapeutika aus der Zelle führt. Als weiteren Resistenzmechanismus können Tumorzellen die Fähigkeit erlangen, die Apoptose zu umgehen, was eine verminderte Wirkung der eingesetzten DNA-schädigenden Substanzen bedingen kann. Eine Resistenzentwicklung gegenüber den verabreichten Chemotherapeutika, aber auch die Bildung von Metastasen oder das Auftreten von Rezidiven kann eine weitere Behandlung erschweren [25].

Auch wenn in den Industrienationen erfreulicherweise in den letzten 40 Jahren die Überlebensrate bei Krebs im Kindes- und Jugendalter durch Verbesserungen der Therapiemöglichkeiten von 20% auf 70-80% gesteigert werden konnte, ist Krebs immer noch die häufigste tödliche Erkrankung und die zweithäufigste Todesursache bei Kindern nach dem ersten Lebensjahr [2]. Die klassischen Therapiemethoden wie Bestrahlung oder Chemotherapie wurden zwar verbessert, sind aber dennoch gefährlich, da sie unspezifisch zytotoxisch wirken. Die hiermit immer assoziierte mehr oder weniger starke Schädigung von gesunden Zellen führt zu vielen Nebenwirkungen, welche die Lebensqualität der Patienten stark beeinträchtigen und außerdem krebsinduzierend sein können, insbesondere wenn eine genetische Krebsprädisposition vorliegt. Vor allem der Einsatz von Zytostatika in der Krebstherapie stellt eine Gratwanderung zwischen erwünschten und unerwünschten Wirkungen dar. Krebspatienten zeigen häufig pathophysiologische und arzneimittelinduzierte Veränderungen, die sich auf die Pharmakokinetik und damit

auch auf die Pharmakodynamik von Zytostatika auswirken können. Für den Erfolg und die Verträglichkeit einer Chemotherapie ist daher eine Dosisindividualisierung, d.h. die maßgeschneiderte Dosierung der Zytostatika für einen individuellen Patienten von Bedeutung [29].

1.8. Zielsetzung der Arbeit

Da bei Krebserkrankungen im frühen Lebensalter exogene Einflüsse vermutlich einen geringeren Stellenwert als im Erwachsenenalter einnehmen, können genetische und auch epigenetische Prädispositionen eine wichtige Rolle bei der Krebsentstehung spielen. Insbesondere bei Patienten mit einem Zweittumor, der kein Rezidiv der ersten Krebserkrankung darstellt, ist die Ätiologie meist unbekannt. Es besteht eine erhöhte Wahrscheinlichkeit, eine genetische oder auch epigenetische Ursache für die wiederkehrende Tumorentwicklung festzustellen.

Zur Krebsbehandlung werden vor allem Radio- und/oder Chemotherapie angewendet, die als unerwünschte Nebenwirkung die DNA-Schädigung gesunder Körperzellen mit sich bringen. DNA-Reparaturmechanismen sind hierbei von entscheidender Bedeutung, da sie essentiell für die Aufrechterhaltung der genomischen Integrität sind und Defekte in diesen Systemen zur malignen Entartung der Zelle führen können. Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Arbeitshypothese untersucht werden, dass genetische und/oder auch epigenetische Modifikationen gerade in den für Zellzykluskontrolle und DNA-Reparatur verantwortlichen Stoffwechselwegen eine kritische Rolle bei der Zweittumorentstehung spielen. Dazu sollten 20 Kinderkrebspatienten, die einen unabhängigen Zweittumor entwickelten (2N), mit 20 gematchten Patienten ohne Zweittumor (1N) verglichen werden. Dabei war das Ziel, somatische genetische oder epigenetische Veränderungen zu detektieren, die zur wiederholten Erkrankung beitragen. Als somatische Zellen standen primäre Hautfibroblasten der Patienten zur Verfügung. Es war geplant, den konstitutiven Status der Zellen als auch den Status der Zellen nach DNA-Schädigung (z. B. durch ionisierende Strahlung) zu untersuchen. Im Fokus standen dabei vor allem die unterschiedlichen DNA-Reparaturwege. Als erster Schritt war vorgesehen, mit Hilfe eines spezialisierten cDNA-Reparatur-Microarraychips die mRNA-Expression von DNA-Reparaturgenen und DNA-reparaturassoziierten Genen in den unbehandelten Fibroblasten der Probanden zu analysieren. Ausgewählte, in den

Probandengruppen unterschiedlich exprimierte Gene sollten anschließend mittels quantitativer RTq-PCR validiert und deren mRNA-Expression auch nach DNA-Schädigung bestimmt werden. Die Expression der Gene, die auffällige Unterschiede zwischen den Probandengruppen zeigen, sollte im Weiteren auf Proteinebene verifiziert werden. Zur Ermittlung epigenetischer Modifikationen sollte durch Bisulfit-Pyrosequenzierung die DNA-Promotormethylierung einiger ausgewählter, möglicherweise krebsrelevanter Gene bestimmt werden. Außerdem war geplant mittels SNP-Microarrays genomweit nach Kopienzahlvariationen von DNA-Reparatur- und Krebs-assoziierten Genen zu suchen. Dabei detektierte relevante Deletionen/Duplikationen sollten anschließend mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) und/oder quantitativer PCR überprüft werden. Zudem sollte zusätzlich noch die Reparaturkinetik/-kapazität nach Induktion von DNA-Schäden mit Hilfe eines anti- γ H2AX-Immunfluoreszenz-Assays in den primären Fibroblasten der Patienten analysiert werden.

In dem Probandenkollektiv befand sich ein Zweittumorproband, der einen gesunden monozygoten Zwilling als zusätzliche Kontrollprobe mit in die Studie einbrachte. Der Vergleich monozygoter Zwillinge hat einen besonderen Stellenwert, da es aufgrund der nahezu hundertprozentigen genetischen Identität leichter ist, tatsächlich krebsrelevante Unterschiede zu detektieren. Für dieses Zwillingsspaar sollten separate Analysen durchgeführt werden.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Verwendete Geräte

- Chemilumineszenzdetektor: Intelligent Dark Box LAS 3000 (Fujifilm)
- Hybridisierstation: Lucidea Slide Pro Hybridizer (Amersham Biosciences)
- Fluoreszenzdetektor: Array Scanner 428TM (Affymetrix)
- Sequenzierer: CEQTM 8000 Genetic Analysis System (Beckman Coulter)
- PCR-Gerät: Mastercycler gradient (Eppendorf)
- qPCR-Gerät: 7500 Fast Real-Time PCR system (Applied Biosystems)
- Photometer: Nanodrop 2000 Spectrophotometer (Peqlab)
BioPhotometer (Eppendorf)
- Sterilbank: HeraSafe HS12 (Baker Heraeus)
- Zellkulturinkubator: CO₂ Brutschrank Serie CB (Binder)
- Mikroskope:
 - Axiovert 25 Mikroskop (Zeiss)
 - Axio Imager Mikroskop (Zeiss) mit Metafer4 Software (Metasystems)
- Bestrahlungsgeräte:
 - ¹³⁷Cs-Strahlenquelle: GammaCell 2000 (Molsgaard Medical Denmark)
 - UV-C Strahlenquelle: Bio-Link BLX-254 (Vilber Lourmat)

2.1.2. Verwendete Chemikalien und Reagenzien

Falls nicht anders angegeben, stammten die sonstigen verwendeten Chemikalien von den Firmen Roth, Sigma, Fluka, Merck, Hedingen, Braun, Riedel-de Haën, Invitrogen und Qiagen. Puffer wie PBS, TAE oder SSC siehe Sambrook et al. (Molecular Cloning). Verwendete Antikörper, Primer, spezielle Lösungen etc. sind bei der jeweiligen Methode aufgeführt.

2.1.3. Patienten und Probenmaterial

Mit Hilfe des Deutschen Kinderkrebsregisters wurden 40 inzwischen volljährige Patienten rekrutiert, die ein- bzw. zweimalig an Krebs im Kindes- oder jungen Erwachsenenalter erkrankten. 20 der Personen (2N) haben eine Krebserkrankung überlebt und später einen Zweittumor entwickelt, bei denen es sich nicht um ein Rezidiv gehandelt hat. Die anderen 20 Personen (1N) sind ausgewählte Kontrollpatienten, die nur einmalig an Krebs erkrankten; aber übereinstimmend mit den Zweittumorprobanden (2N) war die Art des Ersttumors (ICCC-Klassifikation), das Geschlecht und das Alter bei der Erstdiagnose (+/- 1Jahr). Eine Übersicht der Patienten ist in Tabelle 1 dargestellt. Die Ärzte des Instituts für Humangenetik (Universitätsmedizin Mainz) haben die Probanden genetisch beraten und Hautbiopsien durchgeführt. Mit Hilfe dieser Hautproben wurden primäre Fibroblastenzellkulturen der Probanden etabliert.

Weitere Informationen zur Patientenrekrutierung sind in Victor et al. 2011 (under revision) zu entnehmen. Die Studie wurde durch ein Votum der Ethikkommission der Landesärztekammer Rheinland-Pfalz legitimiert (Nr. 837.440.03(4102)). Da kein gematchtes Patientenkollektiv ohne Krebserkrankung zur Verfügung stand, wurden 25 Fibroblastenzellkulturen aus anonymen Hautproben von kosmetischen chirurgischen Eingriffen verwendet.

2.1.3.1. 2N Patient mit gesundem monozygoten Zwilling

Es war möglich, für einen 2N Probanden (KKR A24) einen gesunden monozygoten Zwilling (KKR D24) als zusätzliche Kontrollprobe mit in die Studie einzubringen. Der 2N Zwilling KKR A24 erkrankte im Alter von fünf Jahren an akuter lymphatischer Leukämie (ALL), wurde erfolgreich mit Chemotherapie behandelt, erlitt aber zwei Jahre später einen Rückfall und erhielt daraufhin eine Knochenmarkstransplantation. Im Alter von 25 Jahren erkrankte der 2N Zwilling KKR A24 an einem Schilddrüsenkarzinom, woraufhin die Schilddrüse des Patienten entfernt wurde. Sein monozygoter Zwilling (KKR D24) erkrankte nach unserem heutigen Wissensstand bisher nicht an Krebs.

Tabelle 1: Patientencharakteristik

Personen, die an Krebs im Kindesalter erkrankten und einen Zweittumor hatten (2N). Zusätzlich die dazu passenden Fälle (matched pairs) ohne Zweittumorerkrankung (1N) in Deutschland. Das Geschlecht und die Diagnose sind in absoluten Zahlen dargestellt. Für Alter und Geburtsjahr ist der Mittelwert und die Verteilung angegeben.

	Zweittumor- gruppe (2N)	Eintumorgruppe (1N)	Unterschied der matched pairs
N	20	20	
Männlich	11	11	
Weiblich	9	9	
Alter bei Ersttumordiagnose	6 (6.75) 0-14	6 (6.85) 0-14	-1 - +1
Geburtsjahr	1969-1984	1965-1985	
Jahr der Ersttumordiagnose	1980-1997	1980-1998	-7 - +3
Alter bei Diagnose des Zweittumors	16 (16.65) 9-30		
Jahr der Zweittumordiagnose	1986-2003		
Ersttumor			
Lymphoide oder myeloische Leukämie	11	11	
Hodgkin- oder Burkitt-Lymphom	5	5	
sonstige solide Tumoren	4	4	
Zweittumor			
Systemische Tumoren	7		
Schilddrüsenkarzinom	6		
sonstige solide Tumoren	7		

2.2. Methoden

2.2.1. Zellkultur der Fibroblasten

2.2.1.1. Kultivierung der Fibroblasten

Aus den Hautbiopsien wurden primäre individuelle Fibroblastenzelllinien etabliert, die in flüssigem Stickstoff kryokonserviert wurden. Wachstum und Vermehrung der Fibroblasten erfolgte bei 37 °C und 5% CO₂ liegend in Zellkulturflaschen. Die Zellen wurden mit adaptiertem Dulbecco's modified eagle medium (aDMEM) kultiviert. Das Kulturmedium der Zellen wurde alle 2-3 Tage ausgetauscht.

adaptiertes DMEM: 500 ml DMEM „Low Glucose“ (PAA)
 + 60 ml FKS Fetales Kälberserum (10%)
 + 5 ml L-Glutamin 200 mM (Gibco)
 + 5 ml Penicillin/Streptomycin (Gibco)
 + 0,5 ml Gentamicin (Gibco)

2.2.1.2. Auftauen der Fibroblasten

Das Auftauen und die Verwendung der Zellkulturen erfolgten nach abgeschlossener Sammlung aller Proben. Die Zellkulturexperimente wurden alle im gleichen Kultivierungsstadium durchgeführt.

Die kryokonservierten Zellen wurden aus dem flüssigen Stickstoff entnommen und bei 37°C aufgetaut. Die Zellsuspension wurde in ein Falcontube (15 ml) mit 8 ml aDMEM überführt und 5 min mit 1000 rpm bei Raumtemperatur (RT) abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Das Zellpellet wurde in 3,5 ml frischem aDMEM resuspendiert und in einer Zellkulturflasche (25 cm²) ausgesät.

2.2.1.3. Subkultivierung/Passagieren

Die Subkultivierung der konfluenten Zellen erfolgte nach folgendem Verfahren: Das Kulturmedium wurde abgesaugt, die Zellen mit Dulbecco's phosphate buffered saline (DPBS) (Gibco) kurz gespült und mit Trypsin-Ethylendiamintetraessigsäure (Trypsin-EDTA) 0,05% (Gibco) versetzt. Nach einer Inkubation von ca. 5 min bei 37 °C und

5% CO₂ lösten sich die Zellen vom Boden ab. Dieser Vorgang wurde mikroskopisch kontrolliert. Die so entstandene Zellsuspension wurde dann mit einer entsprechenden Menge frischem aDMEM versetzt, gut gemischt und je nach erforderlicher Dichte in neue weitere Kulturgefäße verteilt. Für den Immunfluoreszenznachweis wurden die Zellen auf sterilen, vorbehandelten Deckgläschen (20x20 mm) ausgesät. Die Deckgläschen wurden zur Vorbereitung für mindestens 10 min in Diethylether eingetaucht, anschließend in 100%-igem und 70%-igem Ethanol und H₂O bidest. gewaschen, dann für mindestens 20 min in 1 M HCl inkubiert und schließlich bis zum Gebrauch in 70%-igen Ethanol gegeben. Die so vorbereiteten Deckgläschen wurden dann in Zellkulturschalen (Ø 60 mm) ausgelegt und nach Abdampfen des Ethanols mit Zellsuspension überschichtet.

2.2.1.4. Kryokonservierung

Bei Subkultivierungen wurde stets ein Teil der Zellen wieder in flüssigem Stickstoff eingefroren. Hierzu wurde das Medium vollständig aus der bewachsenen Zellkulturflasche (25 cm²) entfernt. Die Zellen wurden mit 4 ml DPBS (Gibco) gespült und mit 1 ml Trypsin-EDTA 0,05% (Gibco) versetzt. Nach einer Inkubation von ca. 5 min bei 37 °C / 5% CO₂ lösten sich die Zellen vom Boden ab. Die Zellsuspension wurde in 4 ml aDMEM aufgenommen und in einem Falcontube (15 ml) 5 min mit 1000 rpm bei RT abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Das Zellpellet wurde in 1 ml Recovery cell culture freezing medium (Gibco) resuspendiert und in ein Kryoröhrchen gefüllt. Die Kryokonservierung fand in einem Behälter mit Isopropanol für 1-2 Tage bei -80 °C statt. Dann wurden die Kryoröhrchen wieder in flüssigen Stickstoff überführt.

2.2.1.5. Zellzahlbestimmung

Die Zellzahlbestimmung wurde mit Trypanblau und der Neubauer-Zählkammer (Hämocytometer) durchgeführt. Der Raum zwischen der plangeschliffenen Glaskammer und dem Deckglas hat ein genau definiertes Volumen, über das sich die Zellzahl pro ml bestimmen lässt:

$$\text{Zellzahl/ml} = \text{Mittelwert der Zellen aus 4 Großquadraten} \cdot 10^4 \cdot V$$

V = Verdünnungsfaktor, z. Bsp. bei 1:2 ist V = 2

Zur Zellzahlbestimmung wurde durch Trypsinbeigabe eine Zellsuspension der Fibroblasten hergestellt. Die Zellsuspension wurde dann mit Trypanblaulösung (0,4% in PBS) verdünnt, in die Zählkammer gegeben und sofort unter dem Mikroskop ausgezählt. Die Inkubation der Zellen in der Trypanblauverdünnung sollte nicht länger als 5 min dauern, da Trypanblau zytotoxisch wirkt. Die Verdünnung in der Trypanblaulösung erlaubt die Unterscheidung zwischen lebenden (Trypanblau negativ = klare Zellen) und toten Zellen (Trypanblau positiv = blaue Zellen).

2.2.1.6. Behandlungsexperimente

Die Behandlung der Zellen durch Bestrahlung oder Chemotherapeutika wurde bei subkonfluenter Zelldichte durchgeführt. 24 h zuvor wurde das Kulturmedium ausgetauscht. Für die anschließende Probennahme in Form von Zellpellets erfolgte die Behandlung der Zellen in den Zellkulturflaschen. Für den Immunfluoreszenznachweis wurden je 200.000 Zellen in Zellkulturschalen (\varnothing 60 mm) mit zwei vorbereiteten Deckgläschen (20 x 20 mm) ausgesät (siehe 2.2.1.3.) und für 24 h bei 37 °C / 5% CO₂ inkubiert. Die Zellen wurden nach der Behandlung bis zur Probennahme oder den Immunfluoreszenznachweis bei 37 °C / 5% CO₂ weiter inkubiert. Die Probennahmen erfolgten 0-24 h nach den Behandlungen.

2.2.1.6.1. Behandlung mit radioaktiver γ -Strahlung (¹³⁷Cs-Quelle)

Die Behandlung mit radioaktiver γ -Strahlung (¹³⁷Cs-Quelle) wurde mit Kulturmedium auf den Zellen durchgeführt. Es kamen bei den Vorversuchen Strahlendosen von 1-6 Gy zum Einsatz. In der Hauptversuchsreihe wurde eine Bestrahlung von 1 Gy angewendet. Die meisten Probanden dieser Studie wurden in ihrer Krebstherapie einer solchen Strahlungsart und einer ähnlichen Dosis pro Tag (1-2 Gray) ausgesetzt.

2.2.1.6.2. Behandlung mit UV-C-Strahlung

Für die Behandlung mit UV-C-Strahlung (254 nm) wurde das Kulturmedium von den Zellen entfernt und anschließend wieder zurücktransferiert. Die Strahlendosis betrug 20 J/m². Diese Behandlung wurde nicht für die Untersuchung aller

Probandenzelllinien verwendet, sondern nur in exemplarischen Versuchen mit den Zelllinien des monozygoten Zwillingspaares ausgewertet, da der Mensch UV-Strahlung in dieser Dosis auf der Erde eigentlich nicht ausgesetzt ist.

2.2.1.6.3. Behandlung mit Daunorubicin

Eine Behandlung mit Daunorubicin wurde durchgeführt, da Daunorubicin ein Chemotherapeutikum ist, welches einige der Probanden im Zuge ihrer Krebstherapie verabreicht bekamen. Verwendet wurde eine nicht letale Konzentration von 3 μM im Kulturmedium mit einer Inkubationszeit von 2 h. Danach wurde das Medium mit Daunorubicin entfernt und durch frisches Kulturmedium ersetzt. Die Behandlung wurde nicht für die Untersuchung aller Probandenzelllinien verwendet, sondern nur in exemplarischen Versuchen mit den Zelllinien des monozygoten Zwillingspaares ausgewertet. Die Wechselwirkungen von Daunorubicin in Zellen zeigten sich in den Vorversuchen als sehr komplex und schwierig zu beurteilen.

2.2.1.7. Herstellung von Zellpellets

Für die Gewinnung von Zellpellets wurde das Kulturmedium der behandelten und unbehandelten Zellkulturflaschen abgesaugt, die Zellen mit DPBS (Gibco) kurz gespült und mit Trypsin-EDTA 0,05% (Gibco) versetzt. Nach einer Inkubation von ca. 5 min bei 37 °C / 5% CO₂ lösten sich die Zellen vom Boden ab und wurden in Kulturmedium aufgenommen. Die Zellsuspension wurde danach in Falcontubes überführt und für 5 min mit 1000 rpm bei RT abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Das Zellpellet wurde in DPBS (Gibco) gewaschen und für 5 min mit 1000 rpm bei RT zentrifugiert. Für das zweite Waschen wurde das Pellet in neuem DPBS (Gibco) resuspendiert, die Suspension in drei Eppendorfgefäße (2 ml) überführt und für weitere 5 min mit 2000 rpm bei RT zentrifugiert. Die Überstände wurden verworfen. Bis zur weiteren Verarbeitung (DNA, RNA oder Protein-Präparaten) wurden die Zellpellets bei -80 °C gelagert.

2.2.2. Immunfluoreszenznachweis von DSB mit γ H2AX-Antikörpern

Für den Immunfluoreszenznachweis von DSB (DNA-Doppelstrangbrüchen) mit anti- γ H2AX-Antikörpern wurden Fibroblasten auf Deckgläschen in Zellkulturschalen (siehe 2.2.1.3.) kultiviert. Das Medium wurde entfernt und die behandelten/unbehandelten Zellen wurden durch Zugabe von 3 ml 2% Formaldehyd in PBS, pH 7.4 für 15 min bei RT fixiert. Dann wurden die Zellen 3 x 10 min mit 4 ml PBS, pH 7.4 bei RT gewaschen (auf Schüttler) und mindestens für 20 min in eiskaltem (-20 °C) Methanol inkubiert. Anschließend wurden die Deckgläschen aus dem Methanol geholt und einzeln in je 1 ml 0,3% Triton X-100, 5% BSA in PBS für 1 h bei RT geblockt. Danach wurden je 50 μ l des primären Antikörpers (*human anti-mouse*) Anti-phospho-Histone H2AX (Ser139), clone JBW301 (#05-636, Upstate Biotechnology), verdünnt 1:1000 in PBS mit 0,3% Triton X-100, bei 4 °C über Nacht auf den Deckgläschen inkubiert. Alle folgenden Schritte erfolgten nun bei RT. Danach wurden die Zellen 2 x 5 min mit 1 ml PBS, pH 7.4 unter Schütteln gewaschen, gefolgt von einem Waschschrift für maximal 3 min mit 1 ml 0,4 M NaCl in PBS und einem weiteren Waschschrift von 5 min mit 1 ml PBS, pH 7.4. Nach einem kurzen Spülen mit 0,3% Triton X-100 in PBS, pH 7.4 wurde der zweite Antikörper (Alexa Fluor 488-conjugated *goat anti-mouse* IgG) Alexa Fluor 488 F(ab')₂ fragment of *goat anti-mouse* IgG(H+L)* (#A11017, Invitrogen, Molecular Probes), verdünnt 1:500 in PBS mit 0,3% Triton X-100, für 2 h im Dunkeln auf den Deckgläschen inkubiert. Danach wurden die Zellen wieder 2 x 5 min mit 1 ml PBS, pH 7.4 gewaschen, gefolgt von einem Waschschrift für maximal 3 min mit 1 ml 0,4 M NaCl in PBS und einem weiteren Waschschrift von 5 min mit 1 ml PBS, pH 7.4. Die Deckgläschen wurden abschließend mit je 15 μ l 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) (100 ng/ml, Sigma) im Mountingmedium Vectashield antifade solution (Vector Labs) auf den Objektträger gelegt, mit Nagellack versiegelt und bei 4 °C im Dunkeln gelagert. Die Antikörperfluoreszenzsignale der Zellkerne wurden mit einem Axio Imager Mikroskop (Zeiss) aufgenommen und die γ H2AX-Foci mit Hilfe der Metafer4 Software (Metasystems) halbautomatisch in mindestens 200 Zellkernen pro Probe ausgezählt.

2.2.3. Genexpressionsanalyse

2.2.3.1. Totale RNA-Extraktion

Für die Extraktion der totalen RNA aus den Fibroblasten wurde die TRIzol® Methode (Invitrogen) angewendet. Das Zellpellet wurde in einem 2 ml Eppendorfgefäß mit 1 ml TRIzol® Reagenz (Invitrogen) versetzt. Durch Pipettieren und Vortexen und 5 min Inkubationszeit bei RT wurden die Zellen aufgeschlossen. Nach Zugabe von 200 µl Chloroform und kräftigem Schütteln erhielt man ein Zweiphasengemisch, welches man 2 min bei RT inkubierte. Zur Phasentrennung wurde 15 min mit 12000 g bei 4 °C zentrifugiert. Da sich die RNA in der oberen wässrigen Phase anreichert, wurde diese Phase (ca. 500 µl) abgenommen und mit 500 µl Isopropanol gemischt. Zur Fällung der RNA folgten eine Inkubationszeit von 10 min bei RT und eine anschließende Zentrifugation mit 12000 g von 15 min bei 4 °C. Der Überstand wurde vorsichtig dekantiert und das erhaltene RNA-Pellet wurde zweimal mit je 1 ml 70%-igem Ethanol gewaschen und für je weitere 5 min mit 12000 g bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde wieder vorsichtig dekantiert. Danach wurde das RNA-Pellet bei RT kurz getrocknet und anschließend in H₂O-DEPC (30-50 µl) resuspendiert. Die RNA wurde bei -80 °C gelagert.

Die RNA-Konzentration wurde im Nanodrop 2000 Spectrophotometer Photometer bestimmt ($A_{260/280}$ -Faktor = 40). Die Qualität der RNA wurde durch Auftrennung auf einem 1%-igen Agarosegel mit EtBr in 1 x TAE-Puffer (40 mM Tris, 1 mM EDTA, 1% Eisessig) kontrolliert. Hierzu wurde 1 µl RNA mit 2 µl H₂O-DEPC und 3 µl FDE Loading Dye (Fermentas) gemischt, 5 min bei 95 °C denaturiert, auf Eis gestellt und auf das Gel geladen. Die elektrophoretische Trennung erfolgte bei U = 80 V.

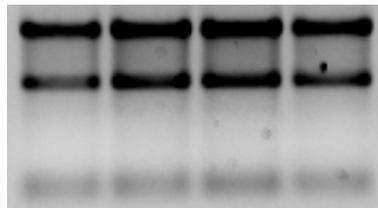


Abbildung 3: Humane totale RNA auf 1%-igem Agarosegel mit EtBr in 1x TAE-Puffer

Bei humaner totaler RNA sollte auf dem Gel (Abbildung 3) die 28S- und 18S-rRNA als Banden bei etwa 4,5 kb bzw. 1,9 kb erscheinen. Die 28S-Bande sollte etwa

doppelt so intensiv wie die 18S-Bande sein, andernfalls liegt ein Hinweis auf degradierte RNA vor. Die mRNA sollte als heller Schmier zwischen 0,5 und 9 kb zu sehen sein.

2.2.3.2. cDNA-Synthese mit Alexa Fluor®-Direktmarkierung für die cDNA-Microarray-Hybridisierung

Für die cDNA-Microarray-Hybridisierung wurden 10 µg totale RNA jedes Probanden (1N, 2N) und 10 µg gepoolte totale RNA von Kontrollfibroblasten oder einer Kontrollprobe mit Alexa Fluor®555- bzw. Alexa Fluor®647-aha-dUTP (Dye swap) über reverse Transkription differentiell fluoreszenzmarkiert. Verwendet wurde hierzu das SuperScript™ Plus Direct cDNA Labeling System with Alexa Fluor® aha-dUTPs (Invitrogen). Für diese cDNA-Synthese wurden in einem 1,5 ml Eppendorfgefäß 10 µg totale RNA und 3 µl Random Hexamere mit DEPC-H₂O auf 15 µl aufgefüllt, für 10 min bei 70 °C denaturiert und mindestens für 1 min auf Eis abgekühlt. Danach wurden 6 µl 5 x Einzelstrangpuffer, 3 µl 0,1 M DTT, 3 µl 10 x Nukleotide Mix mit Alexa Fluor®555-aha-dUTP bzw. Alexa Fluor®647-aha-dUTP, 1 µl RNase Out™ (40 U/µl) und 2 µl SuperScript™ III RT (400 U/µl) dazugegeben, vorsichtig gemischt und der Ansatz für 3 h im Dunkeln bei 46 °C inkubiert. Die Ursprungs-RNA wurde durch Zugabe von 15 µl 0,1 M NaOH und 30 min Inkubation bei 70 °C hydrolysiert. Der pH-Wert wurde anschließend mit 15 µl 0,1 M HCl neutralisiert. Zum Schluss wurde die markierte cDNA über Filtersäulchen aufgereinigt. Dazu wurde die cDNA mit 700 µl Bindungspuffer vermischt, auf Filtersäulen geladen und für 1 min mit 3300 g bei RT zentrifugiert. Das Eluat wurde verworfen. Die nun auf den Filtersäulen gebundene cDNA wurde mit 600 µl Waschpuffer gewaschen und mit max. Geschwindigkeit für 30 sec bei RT zentrifugiert. Das Eluat wurde wieder verworfen. Durch eine erneute Zentrifugation für 30 sec mit max. Geschwindigkeit bei RT wurde der restliche Waschpuffer entfernt. Dann erfolgte die Elution der markierten cDNA von der Filtersäule in dunkle Eppendorfgefäße, indem man 20 µl DEPC-H₂O auf die Säulen gab, 1 min bei RT inkubierte und für 1 min mit max. Geschwindigkeit bei RT zentrifugierte. Die markierte, aufgereinigte cDNA wurde bei -20 °C bis zur Hybridisierung gelagert.

2.2.3.3. cDNA-Microarray-Herstellung

Der von uns generierte cDNA-Microarraychip umfasste 1344 Sequenzen, wobei jede sechsmal auf dem Chip aufgebracht war. Er deckte insgesamt ca. 800 verschiedene Gene ab. Davon waren etwa 200 Gene DNA-Reparaturgene, reparaturassoziierte Gene oder Zellzyklusgene. Etwa 100 Kontrollgene und eine große Anzahl an Genen, von denen man keine Regulation erwartete, dienten zur Qualitätskontrolle und ermöglichten die Normalisierung der Hybridisierungsdaten.

Für die Herstellung des cDNA-Microarraychips wurden über das RZPD (Deutsches Ressourcenzentrum für Genomforschung GmbH, Homepage: <http://www.rzpd.de/>) cDNA-Klone (Image Klone) der gewünschten Gene bestellt. Die cDNA-Kloninserts wurden mittels PCR unter Standardbedingungen amplifiziert. Menge und Größe der PCR-Produkte wurden auf Agarosegelen kontrolliert und die Richtigkeit der Sequenz wurde durch die Sequenzierung der PCR-Produkte bestätigt. Die PCR-Produkte wurden über eine Ethanol-fällung aufgereinigt und jeweils in 10 µl 3x SSC mit 1,5 M Betain (Fluka) resuspendiert. Die so aufbereiteten cDNAs wurden bei Genterprise (Mainz) durch den Spotting Roboter Omnigridd™ (GeneMachines) auf Glasobjektträger (GAPS II slides, Corning) aufgebracht.

2.2.3.3.1. PCR-Amplifikation der cDNA

Mittels PCR konnte eine Amplifikation der cDNA-Kloninserts vorgenommen werden, die für die Sequenzierung und die Microarray-Herstellung notwendig war. Von den bestellten cDNA-Plasmid-Klonen (RZPD) wurden 1:50 Verdünnungen hergestellt, wovon jeweils 3 µl in die PCR-Reaktion eingesetzt wurden. Die PCR-Reaktion erfolgte in 100 µl Volumen mit PCR-Reagenzien von QIAGEN und Standardprimern (MWG).

Verwendete Vektoren:

- pCMV-SPORT6, pBluescriptR, pBluescript SK, pDNR-LIB, pOTB7, Lafmid BA, pT7T3D-Pacl, pAMP1, pAMP10

Für die jeweiligen Vektoren verwendete Primer:

- pBluescriptR, pBluescript SK, Lafmid BA, pAMP1, pAMP10, pT7T3D-Pacl
RZPD M13 forward 5' – GCT ATT ACG CCA GCT GGC GAA AGG GGG ATG TG - 3'
RZPD M13 reverse 5' – CCC CAG GCT TTA CAC TTT ATG CTT CCG GCT CG - 3'
- pCMV-SPORT6, pBluescriptR, pBluescript SK, pDNR-LIB, pOTB7, Lafmid BA, pT7T3D-Pacl, pAMP1, pAMP10
M13 uni (-21) 5' – TGT AAA ACG ACG GCC AGT - 3'
M13 rev (-29) 5' – CAG GAA ACA GCT ATG ACC - 3'
- pCMV-SPORT6, pAMP1, pAMP10, pOTB7
Sp 6 5' – CA TTT AGG TGA CAC TAT AG - 3'
T7 5' – TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG - 3'
- pBluescriptR, pBluescript SK, pT7T3D-Pacl
T3 5' – AAT TAA CCC TCA CTA AAG GG - 3'
T7 5' – TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG - 3'

PCR-Ansatz (100 µl):

Zusatz / Reagenzien (QIAGEN)	Volumen [µl]	Endkonzentration
10x Puffer (+ 15mM MgCl ₂)	10	1x
25 mM MgCl ₂	3	Gesamt = 2,25 mM
10 mM dNTPs	2	0,2 mM
5x Q-Solution	20	1x
10 µM Oligo_1	2,5	0,25 µM
10 µM Oligo_2	2,5	0,25 µM
Template DNA	3	
Taq-Polymerase	1,5	
H ₂ O steril	55,5	

<u>PCR-Programm:</u>	1. 95 °C	8 min	DNA-Denaturierung
	2. 94 °C	30 sec	Denaturierung der dsDNA
	3. 45-68 °C	30 sec	Primeranlagerung
	4. 72 °C	30 sec	Elongation
	5. go to 2. (34x)		35 Zyklen
	6. 72 °C	1 min 30 sec	verlängerter Elongationsschritt
	7. 4 °C	∞	

Zur Ergebniskontrolle der PCR wurden 5 µl des Ansatzes mit 1 µl 6x Loading Dye (Fermentas) gemischt und auf einem 1%-igen Agarosegel mit EtBr in 1 x TAE-Puffer

elektrophoretisch aufgetrennt. Als Ergebnis sollte eine einzelne konzentrierte Bande auf dem Gel zu sehen sein.

2.2.3.3.2. Sequenzierung

Die Sequenzierung wurde mit dem Sequenzierer CEQ™ 8000 Genetic Analysis System (Beckman Coulter) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

Zu sequenzierende PCR-Produkte mussten vor der Sequenzreaktion einem Clean-up-Verdau unterzogen werden. Dazu wurden 25 µl PCR-Produkt in ein PCR-Gefäß überführt und mit 0,225 µl ExoI Enzym, 0,9 µl SAP Enzym und 4,875 µl sterilem H₂O versetzt. Der Clean-up-Verdau wurde in der PCR-Maschine durchgeführt und enthielt eine 25 min Inkubation bei 37 °C, gefolgt von einer 15 min Inkubation bei 72 °C.

Für die Sequenzierung von Plasmiden musste vor der Sequenzreaktion ein Denaturierungsschritt von 2 min bei 96°C erfolgen. In die Sequenzreaktion wurden 0,5 µg (0,3-1 µg) Plasmid-DNA eingesetzt. Die PCR-Produkte mussten vor der Sequenzreaktion nicht denaturiert werden. Die Sequenzreaktion wurde in 20 µl Gesamtvolumen durchgeführt.

Sequenzreaktion Ansatz (20 µl):

- x µl (3 µl PCR-Produkt, mind. 0,3 µg Plasmid-DNA)
- + (15,5-x) µl H₂O-steril
- + 0,5 µl Primer (10 µM)
- + 4 µl CEQ-DTCS-Quickstart-Mix (Beckman Coulter)

Sequenzreaktion Programm:

1. 96 °C 20 sec
2. 50 °C 20 sec
3. 60 °C 4 min
4. go to 1. (34x)
5. 4 °C ∞

Nach der Sequenzreaktion folgte zur Aufreinigung eine Ethanol-fällung in 1,5 ml Eppendorf Tubes. Der 20 µl Sequenzreaktionsansatz wurde mit 5 µl Fällungslösung (2 µl 3 M NaAcetat, pH 5,2 + 2 µl 100 mM EDTA, pH 8 + 1 µl Glykogen) und 60 µl 100% Ethanol (-20 °C) versetzt und durch Vortexen gründlich gemischt. Nach einer

Zentrifugation von 15 min mit 14000 rpm bei 4 °C erhielt man ein Pellet. Der Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde zweimal mit 100 µl kaltem 70% Ethanol gewaschen und für 5 min mit 14000 rpm bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde in der Speedvac getrocknet und anschließend in 30 µl SLS-Puffer (CEQ- Kit) resuspendiert. Für die Sequenzierung wurden die Proben in eine 96 Well Platte (Beckman Coulter) überführt und mit einem Tropfen Mineralöl (CEQ-Kit) als Verdunstungsschutz überschichtet. Eine zweite 96 Well Platte wurde mit CEQ Separation Buffer gefüllt. Beide Platten wurden in den Sequenzierer gestellt. Die CEQ-Sequenzierung wurde mit der Software des CEQ™ 8000 Genetic Analysis Systems nach Anleitung des Herstellers durchgeführt.

2.2.3.3.3. Ethanolfällung der PCR-Produkte und Aufbereitung zum Spotten

Zur Aufreinigung der PCR-Produkte wurde eine Ethanolfällung in 96 Well Platten durchgeführt. 50 µl des PCR-Ansatzes wurden 125 µl 100% Ethanol und 5 µl NaAcetat pH 5,5 zugesetzt. Zur Fällung wurde mind. 30 min bei –80 °C inkubiert. Nach 60 min Zentrifugation mit 3000 rpm bei 4 °C erhielt man ein DNA-Pellet. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen. Das Pellet wurde mit 50 µl 70% Ethanol unter Schütteln 15 min bei RT gewaschen. Danach wurden die Platten mit 3000 rpm für 30 min bei 4°C zentrifugiert und anschließend wurde das Ethanol in der Speedvac eingedampft. Das getrocknete Pellet wurde in 11 µl Spotting-Puffer (3x SSC mit 1,5 M Betain) durch sorgfältiges Mischen resuspendiert.

Zur Kontrolle wurde 1 µl auf eine 1%-igen Agarosegelplatte mit EtBr aufgetropft. Die Probe wurde mindestens 30 min im Gel gefärbt und sollte einen deutlichen Spot zeigen. Die so aufbereiteten cDNAs wurden bei Genterprise (Mainz) durch den Spotting Roboter Omnigridd™ (GeneMachines) auf Glasobjektträger (GAPS II slides, Corning) aufgebracht.

2.2.3.4. cDNA-Microarray-Experiment

2.2.3.4.1. Denaturierung und Aktivierung des cDNA-Microarraychips

Vor der Hybridisierung wurde eine Denaturierung und Aktivierung des cDNA-Microarraychips durchgeführt. Dazu wurde der Objektträger mit der gespotteten Seite

(Kopfseite) 5 sec über heißen H₂O-bidest. Wasserdampf gehalten und dann mit der Kopfseite nach oben für 1 min auf eine 80 °C heiße Heizplatte gelegt. Der Objektträger mit der gespotteten, nun denaturierten DNA wurde anschließend einem UV-Crosslinking unterzogen (2x 0,120 J/cm²) und für 15 min unter Schütteln (100 Mot/min) in einer frisch angesetzten Succinicanhydrid/NaBorat-Lösung (1,25 g Succinicanhydrid, 78 ml Methylpyrrolidon, 8,75 ml 0,2 M NaBorat-Lsg pH 8) inkubiert. Abschließend wurde der Objektträger 5x mit H₂O-bidest. gewaschen, mit gefilterter Druckluft getrocknet und bis zur Hybridisierung trocken gelagert.

2.2.3.4.2. cDNA-Microarray-Hybridisierung

Die Chip-Hybridisierung wurde mit Austausch der Farbstoffe als Dye swap-Experiment durchgeführt. Es wurden je 8 µl (4 µg RNA) markierte (Alexa Fluor®555, Alexa Fluor®647) cDNA-Probe eines Probanden (1N, 2N) mit je 8 µl (4 µg RNA) differentiell markierter (Alexa Fluor®647, Alexa Fluor®555) cDNA des Kontrollpools oder einer Kontrollprobe gemischt. Um unspezifische Bindungen abzublocken, wurden zu dem 2x 8 µl cDNA-Probengemisch, 5 µl tRNA und 5 µl Human COT-DNA (Invitrogen) gegeben. Der Ansatz wurde anschließend mit 180 µl warmem Hybridisierungspuffer UltraHyb (#AM8670, Ambion) versetzt, gründlich gemischt, für 5 min bei 95 °C denaturiert, nochmals gut gemischt und abzentrifugiert. Die denaturierten, aktivierten cDNA-Microarraychips wurden in die Hybridisierungsmaschine Lucidea Slide Pro Hybridizer (Amersham Biosciences) eingelegt und mit 0,1x SSC Puffer bei 42 °C vorbehandelt. Die vorbereiteten Hybridisierungsproben wurden dann möglichst luftblasenfrei mit einer Injektionsspritze auf die Objektträger im Gerät aufgebracht und für 16 h bei 42 °C in Bewegung hybridisiert. Nach der Hybridisierung wurden die Objektträger im Gerät unter verschiedenen Bedingungen gewaschen. Dazu wurde einmal mit Waschpuffer 1 (1x SSC Puffer, 0,2% SDS), zweimal mit Waschpuffer 2 (0,1x SSC, 0,2% SDS) und einmal mit Waschpuffer 3 (0,1x SSC) gespült. Danach wurden die Objektträger aus der Hybridisierungsmaschine genommen, kurz in 0,1x SSC gewaschen, mit Druckluft getrocknet und bis zum Einscannen trocken und dunkel aufbewahrt.

2.2.3.4.3. Fluoreszenzdetektion und Auswertung der Microarray-Daten durch das Institut für Medizinische Biometrie, Epidemiologie und Informatik (IMBEI)

Nach der Hybridisierung wurde im Affymetrix Array Scanner 428TM die Fluoreszenz von Alexa Fluor®555 (Emission bei 565 nm) und Alexa Fluor®647 (Emission bei 665 nm) auf den Objektträgern gemessen. Für jeden Kanal wurde ein TIF-Bild gespeichert. Mit Hilfe der Imagene[®] Software (Biodiscovery) wurden die zwei zusammengehörenden TIF-Bilder der verschiedenen Kanäle übereinander gelegt und die Fluoreszenz-intensitäten ausgelesen. Die weitere Prozessierung der Daten wurde am IMBEI durchgeführt. Hier wurden die cDNA-Microarrays zuerst einer Qualitätskontrolle auf Spot-, Sonden- und Objektträgererebene unterzogen. Spots, welche die Qualitätskriterien nicht erfüllen konnten, wurden aus der Analyse ausgeschlossen. Wenn mehr als 50% der Spots eines Arrays die Qualitätskriterien nicht erfüllten, wurde der Array verworfen und die Hybridisierung musste wiederholt werden. Nur Spots mit einer Signalintensität größer als der Hintergrund und mit einer Hintergrundintensität < 2000 wurden verwendet. Außerdem durfte der absolute Variationskoeffizient aller Spots eines Arrays (nach Hintergrundkorrektur) 0,25 nicht überschreiten. Um dieses Kriterium zu erreichen, durften Ausreißerwerte gelöscht werden, aber es mussten mindestens 4 Werte pro Sonde/Sequenz übrig bleiben, ansonsten wurde die Sonde aus der Analyse genommen. Objektträger, die in der Verteilung der log-ratios der Intensitäten zu viele Ausreißer zeigten [95. Perzentil der Hintergrund log-ratios $< Q3$ (Hintergrund log-ratios) + Interquartilsabstand (Hintergrund log-ratios), analog 5. Perzentil], und Objektträger, die eine schiefe oder multimodale Verteilung der Hintergrund log-ratios zeigten, wurden verworfen. Wenn ein Objektträger die Qualitätskriterien nicht erfüllte, wurde die Probe auf einem neuen Array hybridisiert. Insgesamt mussten 20 Objektträger einmal wiederholt werden und 4 zweimal. Die Normalisierung der Daten erfolgte pro Objektträger und wurde unter Einsatz des R package Arraymagic [30] durchgeführt. Dabei wurden zwei Methoden angewendet, Print-tip Loess mit Varianzstabilisierung (VSN) und Quantilsnormalisierung. Für jede Sonde eines Arrays wurde zur weiteren statistischen Analyse der getrimmte Mittelwert der log-ratios kalkuliert. Zum Vergleich der Genexpression der gematchten 2N und 1N Probanden wurden gepaarte t-Tests errechnet. Zur Korrektur für multiples Testen wurde als Fehlerkontrollkriterium die False Discovery Rate (FDR) gewählt und die Simes-Methode [31] verwendet.

Zusätzlich wurden hierarchische Clusteranalysen (Complete-Linkage) durchgeführt, um zu untersuchen, ob die Probanden für die 40 Gene mit den kleinsten p-Werten in die 1N und 2N Gruppe clustern. Bei der statistischen Analyse wurden zusätzlich zwei homogenere Subgruppen der Probanden, Patienten mit lymphoider Leukämie als Ersttumor (n=10) und Patienten mit Schilddrüsenkarzinom als Zweitumor (n=6), untersucht. Diese Analyse wurde nicht für multiples Testen korrigiert und ist nur explorativ.

2.2.3.5. cDNA-Synthese für die Real-Time-quantitative-PCR (RTq-PCR)

Die cDNA-Synthese wurde mit dem SuperScript III First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen) durchgeführt. In die Synthesereaktion wurden 1 µg totale RNA eingesetzt. Hierzu wurde die RNA mit 1 µl 50 µM Oligo(dT)₂₀-Primern, 1 µl 50 ng/µl Random Hexameren und 1 µl 10 mM dNTPs versetzt und mit H₂O-DEPC auf ein 10 µl Volumen aufgefüllt. Der Ansatz wurde 5 min bei 65 °C inkubiert und dann mindestens 1 min auf Eis gestellt. Danach wurden für die Synthese 2 µl 10x RT-Puffer, 4 µl 25 mM MgCl₂, 2 µl 0,1 M DTT, 1 µl RNaseOUT (40 U/µl) und 1 µl SuperScript III RT (200 U/µl) zugegeben und für 10 min bei 25 °C und anschließend für 50 min bei 50 °C inkubiert. Die Synthesereaktion wurde durch eine 5 min Inkubation bei 85 °C beendet. Der Ansatz wurde auf Eis abgekühlt. Man gab anschließend 1 µl RNase H zu und inkubierte 20 min bei 37 °C, wodurch die Ursprungs-RNA entfernt wurde. Die generierte cDNA wurde bei -20 °C gelagert.

2.2.3.6. Real-Time-quantitative-PCR (RTq-PCR)

Für die RTq-PCR wurde die cDNA entsprechend verdünnt und pro Reaktion 25 ng cDNA eingesetzt. Verwendet wurden als Primer fast ausschließlich QuantiTect® Primer Assays (Qiagen) und zur Detektion der QuantiTect SYBR® Green PCR Master Mix (Qiagen). Die PCR-Reaktion wurde mit dem ABI 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) durchgeführt. In den unbehandelten Zellen der Probanden wurde die Expression von 20 ausgewählten Genen untersucht (Tabelle 2). In den 1 Gy bestrahlten Zellen wurde die Expression von fünf Kandidatengenen gemessen: *CDKN1A* (Qiagen, #QT00062090), *KRT17* (#QT00001680), *RFC2* (#QT00023905), *VIM* (#QT00095795) und *RAD9A*. Da für *RAD9A* keine exon-

spannenden Primer von Qiagen zur Verfügung standen, wurden Primer mit Hilfe von Primer3 (v. 0.4.0) Software (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>) entworfen (for 5'-GAGAAGACGGTGGAAAAATG-3', rev 5'-GGAAGGACAGGTTGTGAGTC-3', exon-3/4-spannend). Mittels Standardkurve wurde die Linearität der Amplifikation gezeigt. Die Sequenzanalyse lieferte die Bestätigung des korrekten Genorts (*RAD9A*). Gleichzeitig konnte eine genomische DNA-Kontamination ausgeschlossen werden. Als endogene Kontrollen wurden die Expressionen von RRN18S (#QT00199367) und TBP (#QT00000721) gemessen. Jede Probe wurde als Triplikat analysiert. Jeder 25 µl Reaktionsansatz enthielt 25 ng cDNA-Template in 10 µl RNase-free PCR graded water, 2,5 µl 10x QuantiTect® Primer Assay und 12,5 µl 2x QuantiTect SYBR® Green PCR Master Mix (Qiagen). Die RTq-PCR wurde in zwei Stufen durchgeführt (1x: 95 °C für 15 min; 40x: 94 °C für 15 sec, 55 °C für 30 sec, 72 °C für 40 sec). Die Fluoreszenzmessung der SYBR Green Interkalation im PCR-Produkt fand während des Elongationsschritts (72 °C für 40 sec) statt. Zur Auswertung wurde die relative Quantifizierung unter Einsatz der Ct- Mittelwerte und der $\Delta\Delta$ -CT-Methode angewandt. Zuerst wurde gegen die beiden endogenen Kontrollen normalisiert. Für die unbehandelten Proben wurden die 2N-Patienten mit den 1N-Patienten verglichen und die induzierten Zellen wurden gegen die zugehörigen unbehandelten Zellen verrechnet. Für den Vergleich der 2N- und 1N-Probandengruppe wurde der Vorzeichentest und Boxplots zur graphischen Darstellung verwendet. Bei diesen Tests wurde keine Korrektur für multiple Testung durchgeführt. Verwendet wurde die PASW Statistics 18.0 Software (IBM).

Tabelle 2: Liste der mittels RTq-PCR untersuchten Gene in den unbehandelten Zellen

Gene	Hersteller, Nr.	Funktion
<i>ATM</i>	#QT01671992 (QIAGEN)	Zellzyklus-Checkpoints, DNA-Reparatur
<i>CDKN1A</i>	#QT00062090 (QIAGEN)	Zellzyklus-Checkpoints, DNA-Reparatur
<i>LIG4</i>	#QT01003744 (QIAGEN)	Zellzyklus-Checkpoints, DNA-Reparatur
<i>PAK2</i>	#QT00093695 (QIAGEN)	Tumorstadium
<i>UBE2V1</i>	#QT00068075 (QIAGEN)	Zellzyklus-Checkpoints, DNA-Reparatur
<i>DNMT3A</i>	#QT00090832 (QIAGEN)	<i>De novo</i> DNA-Methylierung
<i>EEF1G</i>	#QT01669017 (QIAGEN)	Tumorstadium
<i>OSGEP</i>	#QT00092911 (QIAGEN)	DNA-Reparatur
<i>POLK</i>	#QT00023737 (QIAGEN)	DNA-Reparatur
<i>RAD9A</i>	Primer hergestellt für diese Studie	Zellzyklus-Checkpoints, DNA-Reparatur
<i>RAD9B</i>	#QT00016471 (QIAGEN)	Zellzyklus-Checkpoints, DNA-Reparatur
<i>RFC2</i>	#QT00023905 (QIAGEN)	Zellzyklus und Proliferation
<i>RFC5</i>	#QT00071288 (QIAGEN)	Zellzyklus und Proliferation
<i>SH3KBP1</i>	#QT00068551 (QIAGEN)	Tumorstadium
<i>VIM</i>	#QT00095795 (QIAGEN)	Zytoskelett, Apoptose
<i>TNKS2</i>	#QT00042623 (QIAGEN)	Telomerprozesse
<i>FBN1</i>	#QT00024507 (QIAGEN)	Extrazelluläre Matrix
<i>FTH1</i>	#QT00072681 (QIAGEN)	Eisenbindung und -aufnahme, Zellproliferation
<i>ERCC2</i>	#QT00086758 (QIAGEN)	DNA-Reparatur, Zellzyklus-Checkpoint
<i>KRT17</i>	#QT00001680 (QIAGEN)	Zytoskelett

2.2.3.7. Proteinextraktion

Für die Expressionanalyse auf Proteinebene wurde die nukleäre Proteinfraction aus den Fibroblasten der Probanden isoliert. Hierzu wurde das Zellpellet zweimal in 500 µl Puffer A (10 mM HEPES, 1,5 mM MgCl₂, 10 mM KCl, pH 7.9) 10 min auf Eis inkubiert und dann 10 sec mit maximaler Geschwindigkeit bei RT zentrifugiert. Der Überstand wurde jeweils verworfen. Anschließend wurde das Pellet in 100 µl Puffer C (20mM HEPES, 0,42 M NaCl, 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM EDTA, 25% Glycerol, pH 7.9) resuspendiert und homogenisiert, indem die Suspension mittels Spritze (0,5 ml) ca. 20 x durch eine Kanüle gepresst wurde. Danach erfolgte eine Inkubation auf Eis für 30 min und ein Zentrifugationsschritt mit max. Geschwindigkeit bei 4°C für 30 min. Der Überstand enthielt nun die nukleäre Proteinfraction und wurde separiert. Das Pellet, welches die zytoplasmatische Proteinfraction beinhaltete, wurde in 100 µl Puffer C resuspendiert. Die Proteinextrakte wurden bei -80 °C gelagert. Die

Proteinkonzentration wurde mit Roti® Quant (Roth) Reagenz, einen Proteinquantifizierungsassay nach Bradford, im BioPhotometer (Eppendorf) gemessen.

Da das Hauptinteresse in dieser Studie DNA-Reparaturinteraktionen waren und das im Vordergrund zu untersuchende Protein RAD9A im Zellkern lokalisiert ist, wurde in den weiteren Versuchen nur die nukleäre Proteinfraction analysiert. Die gemessenen Proteinkonzentrationen waren bei den meisten Proben sehr gering, sodass nur exemplarische Western Blots angefertigt wurden. Die Hauptanalyse wurde mittels Antikörper-Microarrays durchgeführt, bei denen schon 2 µg Protein ausreicht.

2.2.3.8. Western Blot

Zur Validierung des verwendeten RAD9A-Antikörpers [93A535] (#ab13600, abcam) [32,33] wurden exemplarische Western Blots durchgeführt. Bei diesem Proteinnachweisverfahren werden die Proteine erst elektrophoretisch aufgetrennt, dann auf eine Nitrozellulosemembran übertragen und anschließend mit Antikörpern detektiert. Für die SDS-PAGE (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese) wurde ein 8% Polyacrylamid-Trenngel (siehe Tabelle 3) gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Nach der Polymerisation wurde das Isopropanol abgekippt und das Sammelgel (Tabelle 3) darüber gegossen.

Tabelle 3:

Reagenzien für SDS-PAGE Gel	Trenngel 8%	Sammelgel
H ₂ O bidest.	7,00 ml	4,20 ml
1M Tris/HCl pH 8,8 + 0,6% SDS	2,10 ml	1,00 ml
30% Acrylamidlg. mit 0,8% Bisacrylamid (37,5:1)	3,35 ml	0,80 ml
10% APS (Ammoniumpersulfat)	70 µl	70 µl
TEMED	20 µl	7 µl

Je 20 µg der nukleären Proteinfraction wurden mit 6 µl 4x Roti® Load1 (Roth) Ladepuffer versetzt, auf 24 µl mit Puffer C aufgefüllt, für 3 min bei 95 °C denaturiert, kurz auf Eis gestellt und auf das Gel geladen. Die SDS-PAGE wurde in SDS-Laufpuffer (25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1% SDS) mit dem Mini Protean® 3 Cell Elektrophorese System (Bio Rad) durchgeführt. Nach der Probeneinlaufphase bei 50 Volt erfolgte die Auftrennung der Proteine bei 120 Volt bis zum Gelende. Es wurde immer eine doppelte SDS-PAGE gefahren, wovon ein Gel mit Coomassie Brillant Blau zur Gesamtprotein-Quantifizierung gefärbt wurde. Dazu wurde das Gel 1 h in

Coomassie-Färbelsg. (1,2 g Coomassie Blau, 300 ml Methanol, 60 ml Eisessig, 240 ml H₂O bidest.) und dann 1 h in Entfärbelsg. (50 ml Methanol, 50 ml Eisessig, 400 ml H₂O bidest.) bei RT geschwenkt und anschließend mit viel H₂O-bidest. ausgespült. Die Proteine des anderen Gels wurden aufgetrennt und mittels Blotting auf eine PVDF-Membran Hybond™-P (Amersham) transferiert. Dazu wurde das Gel und die Methanol-aktivierte Membran zwischen mehrere mit Transferpuffer (25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1% SDS, 20% Methanol) getränkte Filterpapiere (3MM, Whatman) gelegt und zwischen zwei Flächenelektroden eingespannt. Der Transfer wurde mit der Western Blot Kammer Mini Trans-Blot® Cell (Bio Rad) in Transferpuffer bei 50 Volt und bei 4°C über Nacht durchgeführt. Anschließend wurde die Membran mit 5% fettfreiem Trockenmilchpulver in TBST- Puffer (50 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7,5 + 0.1% Tween20) 1 h schwenkend bei RT inkubiert, um die unspezifischen Bindungsstellen zu blockieren. Es folgte die Inkubation mit dem monoklonalen, murinen anti-RAD9A-Antikörper [93A535] (#ab13600, abcam), 1:250 (2 µg/ml) verdünnt in TBS-Puffer (50 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7,5) mit 5% fettfreiem Trockenmilchpulver bei 4 °C über Nacht. Danach wurde die Membran dreimal für 5 min mit TBST-Puffer bei RT gewaschen. Für die Reaktion mit einem sekundären Peroxidase-markierten Antikörper und die Chemilumineszenzdetektion wurde der BM Chemiluminescence Western Blotting Kit –mouse/rabbit- (Roche) verwendet. Der Anti-Maus IgG POD Antikörper wurde 1:12500 verdünnt in 5% fettfreiem Trockenmilchpulver in TBST-Puffer für 1 h bei RT schwenkend auf der Membran inkubiert. Dann wurde die Membran viermal für 15 min mit TBST-Puffer bei RT gewaschen. Die Detektionsreaktion wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt und die Chemilumineszenzsignale wurden in der Intelligent Dark Box LAS 3000 (Fujifilm) quantifiziert.

2.2.3.9. Antikörper-Microarray-Herstellung

Um die Proteinexpression von RAD9A in der nukleären Proteinfraction aller Probanden zu bestimmen, wurden Antikörper-Microarrays mit Antikörpern gegen DNA-Reparaturgene hergestellt. Dazu wurden Antikörperlösungen in Triplikaten auf Nitrozellulose beschichtete Objektträger (Oncyte, nitrocellulose 16 multi-pad slides, Grace Bio-Labs, Bend, OR, USA) mit Hilfe eines Non-Contact Array Spotters (sciFLEXARRAYER 3, Scienion, Berlin, Germany) aufgebracht. Für unsere Analysen

wurden Antikörper gegen verschiedene DNA-Reparaturproteine wie z. B. RAD9A verwendet (Tabelle 4). β ACTB-Antikörper dienten als Positiv-Kontrolle und Spotting-Puffer (DPBS, Gibco) als Negativ-Kontrolle. Die gespotteten Objektträger wurden bis zur Hybridisierung bei 4 °C trocken gelagert.

Tabelle 4: Liste der verwendeten Antikörper für die Antikörper-Microarrays

Proteine	AK- Bestellnummer	Hersteller	Literatur
RAD9A	#ab13600	Abcam	<i>Komatsu et al. 2000, De Haro et al. 2010</i>
γ H2AX	#05-636	Upstate	
APEX1	#NB100–116	Novus Biologicals	<i>May et al. 2009</i>
ERCC1	#sc-71072	Santa Cruz	
BRCA1	#sc-1553	Santa Cruz	
BRCA2	#sc-1817	Santa Cruz	
P53	#sc-100	Santa Cruz	
PMS1	#sc-615	Santa Cruz	
PMS2	#sc-617	Santa Cruz	
MLH1	#sc-582	Santa Cruz	
GTBP/MSH6	#sc-1242	Santa Cruz	
XPA	#sc-853	Santa Cruz	
PCNA	#sc-56	Santa Cruz	
ATM	#sc-7230	Santa Cruz	
RAD51	#sc-7410	Santa Cruz	<i>Haaf et al. 1995</i>
GADD45/DDIT3	#sc-793	Santa Cruz	<i>Smith et al. 1994, Haaf et al. 1999</i>
GADD153	#sc-793	Santa Cruz	
RCC1	#sc-1162	Santa Cruz	
Ku-86	#sc-5280	Santa Cruz	
β ACTB	#A5441	Sigma	

2.2.3.10. Protein-Markierung

Zur Visualisierung der Proteine auf den Antikörper-Microarrays wurden die nukleären Proteinfractionen aller Probanden mit einem Amin-reaktiven Fluoreszenzfarbstoff markiert, welcher eine kovalente Amidbindung mit den primären Aminen der Proteine einging. 2 μ g der nukleären Proteinfraction wurden dazu mit 0,12 μ l Fluoreszenzfarbstoff (Dylight 649 NHS Ester, Pierce, Rockford, USA) gemischt und für 1 h im Dunkeln bei RT inkubiert. Um überschüssigen Fluoreszenzfarbstoff zu inaktivieren, wurden 100 μ l 100 mM Glycinlösung (5 mg/ml in HPLC-H₂O) zugegeben und nochmals für 1 h im Dunkeln bei RT inkubiert.

2.2.3.11. Antikörper-Microarray-Experiment

Für die Hybridisierung der fluoreszenzmarkierten Proteine mit den Antikörper-Microarrays wurden die gespotteten Objektträger mit 16-pad FAST frame Hybridisierungskammern (Whatman, Maidstone, UK) bedeckt und fixiert. Alle folgenden Inkubations- und Waschschrte wurden schüttelnd und bei 4 °C durchgeführt. Zuerst wurde zum Blockieren von unspezifischen Bindungen jeder Subarray (16 pro Array) mit 120 µl 4% fettfreiem Trockenmilchpulver in PBS-Puffer (Gibco) für 1 h inkubiert. Jeder Subarray wurde anschließend dreimal mit je 120 µl PBS-Puffer (Gibco) für 10 min gewaschen. Der Puffer wurde vollständig abgesaugt und die fluoreszenzmarkierten Proteinproben wurden über Nacht im Dunkeln inkubiert. Danach wurden die Subarrays der Objektträger zweimal mit 120 µl PBS-T (PBS + 5% Tween20) und zweimal mit 120 µl HPLC-H₂O für je 15 min gewaschen. Zum Schluss wurden die Objektträger in der SpeedVac getrocknet und die Fluoreszenzsignale wurden mit einem hochauflösenden, konfokalen Array Scanner 428TM (Affymetrix, High Wycombe, UK) gemessen. Die generierten Microarray-Bilder wurden mit der Spotfinder 3.2.1 Software (TM4, Dana-Faber Cancer Institute, Boston, USA) gelesen. Eine Hintergrundkorrektur der Spotintensität wurde im Programm mit einem top bkg cutoff von 25% nach folgender Formel durchgeführt:

$$\text{Spotintensität} = \text{Spotintensität}_{\text{Mittelwert}} - ((\sum \text{Bkg} - \sum \text{Top25Bkg}) / (\text{Pixel No. Spot} - \text{Pixel No. Top25Bkg}))$$

Bkg= Hintergrund, \sum = Summe, Top25Bkg = 25% der höchsten Hintergrundwerte

Zur Normalisierung der Microarray-Daten wurde eine Log₁₀-Transformation der Mittelwert durchgeführt und Z Scores und Z Ratios berechnet [34].

Die statistische Analyse wurde mittels PASW statistics 18.0 Software (IBM) durchgeführt. Zum gepaarten Vergleich der 2N- und 1N-Patienten wurde der Vorzeichentest, und wenn möglich der Wilcoxon-Test (Schiefe [-1,+1]), herangezogen. Zur graphischen Darstellung wurden Boxplots gewählt. Bei diesen Analysen wurde keine Korrektur für multiple Testung durchgeführt.

2.2.4. DNA-Extraktion

Zur Extraktion der genomischen DNA aus den Fibroblasten-Zellpellets wurde der QIAamp[®] DNA Mini Kit (QIAGEN) für max. 5×10^6 Zellen nach Angaben des Herstellers verwendet. Die Konzentration der DNA wurde mittels UV-Absorptionsmessung bei 260 nm im Nanodrop 2000 Spectrophotometer bestimmt ($A_{260/280}$ -Faktor = 50).

2.2.5. Epigenetische Untersuchung der DNA-Methylierung

Die Analyse der DNA-Methylierung in den unbehandelten Fibroblasten aller 1N- und 2N-Probanden der Studie und des außenstehenden Kontrollkollektivs für die sieben ausgewählten Gene (*FBN1*, *BRCA1*, *P53*, *P16*, *APC*, *RAD9*, *EFNA5*) wurde in Zusammenarbeit mit dem Medizindoktoranden Marco Ludwig durchgeführt.

2.2.5.1. Bisulfit-Konversion genomischer DNA

Die Bisulfit-Konversion der DNA ist eine Methode zur Bestimmung der DNA-Methylierungsmuster. Hierbei werden die nicht methylierten Cytosine in Uracil umgewandelt, wohingegen methylierte Cytosine nicht beeinflusst werden. Mit Hilfe des EpiTect[®] Bisulphite Kit (Qiagen, Hilden, Germany) wurde je 1 µg genomische DNA aus den unbehandelten Fibroblastenzellen nach Anleitung des Herstellers mit Bisulfit konvertiert.

2.2.5.2. Pyrosequenzierung

Mittels Pyrosequenzierung, einer Real-Time-Sequenziermethode, wurde nach Bisulfit-Behandlung der CpG-Methylierungsgrad eines gewünschten DNA-Abschnitts bestimmt. Hierzu wurde die Bisulfit-DNA mit genspezifischen Primerpaaren (Tabelle 5), die mit Hilfe der Assay Design Software (Biotage, Uppsala, Schweden) entworfen wurden, PCR-amplifiziert.

Tabelle 5: Primer für die genspezifische PCR (forward, reverse) und die Sequenzier-Primer (sequencing) für die Bisulfit-Pyrosequenzierung der sieben untersuchten Gene

Primer	Sequenz
<i>FBN1 forward</i>	5`-GTAGTAGGGTAGAAATTTATAGTTAGGTTT-3`
<i>FBN1 reverse</i>	5`- Bio CCACTTTTATCCACCTATTTTCTAAT- 3`
<i>FBN1 sequencing</i>	5`- ATTATAGTGTTTTTTAAGAG-3`
<i>BRCA1 forward</i>	5`- TAGGGGGTAGATTGGGTGGTTA-3`
<i>BRCA1 reverse</i>	5`- Bio CCCCTCCAAAAATCTCA-3
<i>BRCA1 sequencing</i>	5`- TGGGTGGTTAATTTAGAGT-3`
<i>P16 forward</i>	5`- GGTTGTTTTYGGTTGGTGTTTT-3`
<i>P16 reverse</i>	5`- Bio ACCCTATCCCTCAAATCCTCTAAAA-3
<i>P16 sequencing</i>	5`- TTTTGTGGAAAGAT-3`
<i>P53 forward</i>	5`- Bio TTTTGTAGGTTGGTTTTGATTGTA-`3
<i>P53 reverse</i>	5`- AAAACACAACAACCAATATACA-`3
<i>P53 sequencing</i>	5`- TAATAATAAAAATAAACCTC-`3
<i>APC forward</i>	5`- Bio GGTTAGGGTTAGGTAGGTTGT-`3
<i>APC reverse</i>	5`-ACTACACCACTACAACCACATATC-`3
<i>APC sequencing</i>	5`-CCACACCCAACCAA-`3
<i>RAD9 forward</i>	5`-GGTTTTTATGGGGAAAGGAGG-`3
<i>RAD9 reverse</i>	5`- Bio CCACAAACCAACCCTCTAAC-`3
<i>RAD9 sequencing</i>	5`-TTTTATGGGGAAAGGA-`3
<i>EFNA5 forward</i>	5`-GAGGGTTTAGGAGGAAAAAGGAATTAT-`3
<i>EFNA5 reverse</i>	5`- Bio CCCCCAAACACAACCTTAAC-`3
<i>EFNA5 sequencing</i>	5`-AATTATAAGATGGAGAGAAG-`3

Der forward oder der reverse Primer war am 5'-Ende biotinyliert, um Template-Einzelstränge mittels Streptavidin-Sepharose-Beads zu isolieren. Das generierte PCR-Produkt wurde durch Gelelektrophorese kontrolliert. Für die Pyrosequenzierung folgten dann die Aufarbeitung mittels Steptavidin-Sepharose-Beads an der Vacuum Prep Workstation (Biotage) und anschließend das Annealing des Sequenzier-Primers (Tabelle 5). Die so vorbereiteten Proben wurden dann im Pyrosequenzierer PSQ96MA System (Biotage) mit dem PyroGold SQA Reagent Kit (Qiagen) prozessiert. Die Datenanalyse erfolgte mit der Pyro Q-CpG Software (Biotage). Die statistische Analyse der Methylierungswerte wurde mittels PASW statistics 18.0 Software (IBM) durchgeführt. Zum gepaarten Vergleich der 2N- und 1N-Patienten wurde der Vorzeichentest herangezogen. Zur graphischen Darstellung wurden

Boxplots gewählt. Bei diesen Analysen wurde keine Korrektur für multiple Testung durchgeführt.

2.2.6. Untersuchung von Genkopienzahlvariationen

2.2.6.1. SNP-Array-Analysen

Die SNP-Array-Analysen der DNA der 1N- und 2N-Probanden dieser Studie erfolgten in Zusammenarbeit mit Dr. Tanja Zeller aus der II. Med. Klinik, Universitätsmedizin Mainz.

Dazu wurde mittels SNP (Single Nucleotide Polymorphism) -Microarrays (Auflösung 100 kb) genomweit nach zytogenetisch kryptischen Deletionen und Duplikationen in DNA-Reparatur- und krebsassoziierten Genen gesucht. Um solche Genkopienzahlvariationen nachzuweisen, wurden jeweils 500 ng genomische DNA aus den unbehandelten Fibroblasten der Probanden nach Angaben des Herstellers mit dem GeneChip Genome Wide SNP Sty Assay Kit 5.0/6.0 (Affymetrix) markiert und auf dem GeneChip Genome Wide Human SNP Array 6.0 (Affymetrix) hybridisiert. Die Datenanalyse erfolgte mit der Genotyping Console 4.0 (Affymetrix) und der Chromosome Analysis Suite 1.0.1 (Affymetrix) Software.

2.2.6.2. Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung (FISH)

Die Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung basiert auf der Basenpaarung von fluoreszenzmarkierten DNA-Sonden mit ihren komplementären DNA-Zielsequenzen in den Metaphasechromosomen (oder Interphasezellen). Die Methode wurde zur Validierung der in den SNP-Microarrays detektierten, größeren Deletionen/ Duplikationen angewendet. Die Durchführung der Experimente erfolgte in Zusammenarbeit mit Miriam Grunow im Rahmen ihrer Bachelorarbeit (Details siehe Bachelorarbeit Miriam Grunow). Als DNA-Sonden wurden BAC-Klone verwendet (Tabelle 6), welche durch *E. coli* Kultivierung amplifiziert wurden. Die DNA wurde mittels DNA-Isolation from BAC & PAC Clones–Verfahren [35] isoliert.

Tabelle 6: Name, Lokalisation, Größe und Antibiotikumresistenz der für die FISH verwendeten BACs

KKR - Patient	A6	A10	A24 und D24
BAC	RP11-139D07	RP11-327M19	RP1-312L17
Antibiotikum	Chloramphenicol	Chloramphenicol	Kanamycin
Lokalisation BAC (grün)	16p13.11	2p11.1/11.2 bzw. Zentromer	6q22.33
Lokalisation Kontrolle (rot)	16q terminal	2q terminal	6q terminal
Bereich [bp] auf dem Chromosom von	15.539.243	95.480.048	127.345.289
Bereich [bp] auf dem Chromosom bis	15.703.118	95.652.499	127.453.396
Größe [bp]	163.875	172.451	108.107

Je 500 ng der isolierten DNA wurden durch Nick-Translation mit den Fluoreszenzfarbstoffen Tetramethyl-rhodamine-5-dUTP (Roche) oder Fluorescein-12-dUTP (Roche) direkt markiert. Die markierte DNA-Sonde wurde zusammen mit humaner COT DNA (Roche) und Heringsperma-DNA (Sigma) in einer Ethanolpräzipitation gefällt und in Hybmix 30 (2x SSC, 30% Dextransulfat, 50% Formamid) resuspendiert. Von den Lymphozytenkulturen (aus Blut) der Probanden wurden gealterte Metaphasenpräparate hergestellt, welche vor der Hybridisierung für 5 min bei RT in 2 x SSC-Lösung gestellt und anschließend jeweils 1 min in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70%, 85%, 100% EtOH) dehydriert wurden. Dann wurden 10 µl Sonden-DNA auf das trockene Metaphasenpräparate gegeben, für 5 min bei 80 °C denaturiert und schließlich für 7 h bei 37 °C hybridisiert. Danach wurden die Präparate gewaschen und zur Gegenfärbung des Zellkerns mit DAPI (100 ng/ml, Sigma) in Mountingmedium Vectashield antifade solution (Vector Labs) eingedeckt. Die Signaldetektion erfolgte mittels Fluoreszenzmikroskop (Leica CTR MIC), ausgestattet mit geeigneten Filtern (Vysis) und der Software Leica CW4000 (Leica Microsystems).

2.2.6.3. Genomische RTq-PCR

2.2.6.3.1. Genomische RTq-PCR mit SYBR Green I

Zur Validierung der in den SNP-Microarrays detektierten Deletionen und Duplikationen wurde die genomische RTq-PCR mit SYBR Green-Detektion (siehe 2.2.3.6. RTq-PCR) angewendet. Diese Analysen wurden auch in Zusammenarbeit mit Miriam Grunow durchgeführt (Details siehe Bachelorarbeit Miriam Grunow). Die PCR-Reaktion wurde mit dem ABI 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) durchgeführt. Mit Hilfe der Primerdesign-Software Allele ID 7.0 wurden zur Untersuchung der ausgewählten Genbereiche Primer (Tabelle 7) entworfen. Als Kontrollen wurde die Kopienzahl des Gens *RFC3* und des Gens *HEM3* gemessen. Jede Probe wurde als Triplikat analysiert. Jeder 25 µl Reaktionsansatz enthielt 200 ng genomische DNA (aus Fibroblasten) der Probanden in PCR graded water, 1 µl 10 µM Primer Mix (For+Rev), 1 µl 10x BSA und 12,5 µl 2x QuantiTect SYBR® Green PCR Master Mix (Qiagen). Die qPCR wurde in zwei Stufen durchgeführt (1x: 95 °C für 20 min; 35x: 95 °C für 30 sec, 57 °C für 30 sec, 72 °C für 60 sec). Die Fluoreszenzmessung der SYBR Green-Interkalation im PCR-Produkt fand beim Elongationsschritt (72 °C für 60 sec) statt. Es wurden Standardkurven bestimmt und Schmelzkurvenanalysen durchgeführt. Zur Auswertung wurden die Software 7500 Fast System SDS v.2.0.5 (Applied Biosystems) und die Software qBasePlus verwendet.

Tabelle 7: Mit der Primerdesign-Software Allele ID 7.0 entworfene Primerpaare für die genomische RTq-PCR der zu untersuchenden Genbereiche und der Kontrollgene (Test-Primer) *RFC3* und *HEM3*

Design-Primer für KKR A6			
		<i>Name</i>	<i>Sequenz</i>
<i>Primerpaar 1</i>	forward Primer	KIAA0430 ex8se	ACCAGCAAATAAGGATGGCAAGAG
	reverse Primer	KIAA0430 ex8as	CAGCCTGTGATACTCAGCACTTC
Design-Primer für KKR A7			
		<i>Name</i>	<i>Sequenz</i>
<i>Primerpaar 1</i>	forward Primer	17_B12_for	GAGGTGGAGGTATGATGGCTTTTC
	reverse Primer	17_B12_rev	CAGATTGAAGACAAGTCCGAGAGG
Design-Primer für KKR A10			
		<i>Name</i>	<i>Sequenz</i>
<i>Primerpaar 1</i>	forward Primer	M19_for	GTCTTCATAAAGCCGCAGTAG
	reverse Primer	M19_rev	AAACACAGCACCCACGAG
Design-Primer für KKR A12			
		<i>Name</i>	<i>Sequenz</i>
<i>Primerpaar 1</i>	forward Primer	578_Ex6d_for	GTCACTCCAATGTCTTCCTCCTG
	reverse Primer	578_Ex6d_rev	GCCTGCCAACATGATGAAACC
<i>Primerpaar 2</i>	forward Primer	P19_for	TTCCACCATTGTGATTTATTTCTG
	reverse Primer	P19_rev	GGGATTATCATTAGTTCTTGTAGC
Design-Primer für KKR A16			
		<i>Name</i>	<i>Sequenz</i>
<i>Primerpaar 1</i>	forward Primer	38_G13_for	TCCACTGCCAAATGCTCTCAC
	reverse Primer	38_G13_rev	GACACCAAATCTGCTGACACTTAG
Design-Primer für KKR A24 und D24			
		<i>Name</i>	<i>Sequenz</i>
<i>Primerpaar 1</i>	forward Primer	L17_sense	CCAACTCCCTCTTCCCAGATCAAG
	reverse Primer	L17_anti-sense	GTTGCTGTTCCACGCTCCCTGAG
<i>Primerpaar 2</i>	forward Primer	RSPO3_a_for	AGCGTCTGTACCATCTCTG
	reverse Primer	RSPO3_a_rev	GAAGCCATCACAATCCAACC
<i>Primerpaar 3</i>	forward Primer	RSPO3_b_for	AAGGAGACCTCTGTTTGTTG
	reverse Primer	RSPO3_b_rev	GCGAAGGAGCAAGAGCATC
<i>Primerpaar 4</i>	forward Primer	RSPO3_i_for	ACTGGGGAAAGTCCATGTAAAAG
	reverse Primer	RSPO3_i_rev	CTGCGGTTATTGGGATTTGGC
<i>Primerpaar 5</i>	forward Primer	L17_e_for	CATCACTCCAACATCTAGTCCTTC
	reverse Primer	L17_e_rev	TCTGCCAGGTTGCTGCTAC
Kontroll-Primer			
		<i>Name</i>	<i>Sequenz</i>
<i>Test-Primerpaar 1</i>	forward Primer	RFC3_for	AGCATTGTCTTAGTCTGGAAC
	reverse Primer	RFC3_rev	GGGTGAGAGCAAGGGAAC
<i>Test-Primerpaar 2</i>	forward Primer	HEM3_for	TGCACGGCAGCTTAACGAT
	reverse Primer	HEM3_rev	AGGCAAGGCAGTCATCAAGG

2.2.6.3.2. Genomische RTq-PCR mit UPL-Assays (Roche)

Die Detektion der genomische RTq-PCR wurde im Lauf der Studie von SYBR Green I auf die Universal ProbeLibrary (UPL)-Assays (Roche Applied Science) umgestellt, da sich diese Technik bei uns im Labor als sehr genau und hocheffizient erwiesen hat. Die Universal ProbeLibrary (UPL)-Assays basieren auf kurzen Hydrolysesonden, die am 5'-Ende mit Fluorescein (FAM) markiert sind und am 3'-Ende einen Quencher-Dye tragen. Die UPL-Sonden werden bei der Amplifikation mit genspezifischen Primern in die PCR-Produkte integriert.

Diese Technik wurde zur weiteren Überprüfung der im SNP-Microarray gefundenen Deletionen bzw. Duplikationen des 2N-Probanden A24 im Vergleich mit seinem monozygoten gesunden Zwilling D24 eingesetzt.

Die PCR-Reaktion wurde mit dem ABI 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) durchgeführt. Mit Hilfe der Online-Primerdesignsoftware UPL-Assay Design Center (Roche Applied Science) wurden zur Untersuchung der ausgewählten Genbereiche Primer entworfen. Tabelle 8 enthält die verwendeten Primerpaare und die dazu passenden Sonden. Jede Probe wurde als Triplikat analysiert. Jeder 20 µl Reaktionsansatz enthielt 50 ng genomische DNA (aus Fibroblasten) der Probanden in PCR graded water, 1 µl 10 µM Primer Mix (For+Rev), 0,5 µl 10 µM UPL-Sonde und 10 µl 2x TaqMan® Fast Universal PCR Master Mix (ABI). Die qPCR wurde in zwei Stufen durchgeführt (1x: 95 °C für 10 min; 45x: 95 °C für 30 sec, 60 °C für 60 sec). Die FAM-Fluoreszenzmessung fand beim kombinierten Annealing- und Elongationsschritt (60 °C für 60 sec) statt. Zur Auswertung wurde die Software 7500 Fast System SDS v.2.0.5 (Applied Biosystems) und die $\Delta\Delta$ -CT Methode verwendet. Normalisiert wurde gegen das Kontrollgen *RFC3* und gegen mehrere Kontrollproben.

Tabelle 8: genomische RTq-PCR Primer und UPL-Sonden für die zu untersuchenden Gene des 2N-Probanden A24 im Vergleich mit seinem monozygoten gesunden Zwilling D24

Gen	Primer	seq 5'-3'	UPL- Sonde
<i>RPN2</i>	RPN2_for	tctagacattgtccgactccat	#72
	RPN2_rev	tctggctcggcaacaaac	
<i>RSPO3</i>	RSPO3_for	cctcctcctcccctatgtg	#23
	RSPO3_rev	gcaggagacgctccagt	
<i>CCND3</i>	CCND3_for	acccatgacgagtggactg	#7
	CCND3_rev	cacctaccaagcctacctg	
<i>C5orf13</i>	C5orf13_for	acacaaccgggtccactct	#24
	C5orf13_rev	gactctcagcctctgcaagaa	
<i>UBE2Q2P2</i>	UBE2Q2P2_for	tgagatgaaagaagagcctattagt	#88
	UBE2Q2P2_rev	ttgcccaatttcttttcag	
<i>KRAS</i>	KRAS_for	tcttgagagggcattgcttc	#47
	KRAS_rev	gaaaccaaaagccaaaagcag	
	Kontrollgen		
<i>RFC3</i>	RFC3_for	agtaggtgcttggcggttc	#32
	RFC3_rev	agtgtaactgacctacatctcaatg	

3. Ergebnisse

3.1. Genexpressionsanalysen

3.1.1. cDNA-Microarray-Screening

3.1.1.1. Probandengruppenvergleich

3.1.1.1.1. mRNA-Expression in den uninduzierten Probandenfibroblasten der 2N-Gruppe im Vergleich zur 1N-Gruppe

Zu Beginn der Studie wurde eine massiv parallele Expressionsanalyse von DNA-Reparaturgenen mittels cDNA-Microarrays durchgeführt, auf denen cDNAs von ca. 200 DNA-Reparatur-assoziierten oder Zellzyklus-Genen gespottet waren. In diesem Screening wurde die mRNA-Expression in unbehandelten Fibroblasten von 2N-Probanden und gematchten 1N-Probanden verglichen. Die Daten wurden am IMBEI mit verschiedenen Normalisierungsverfahren (siehe Material und Methoden 2.2.3.4.3.) ausgewertet. Nach Korrektur für multiples Testen mit einer False Discovery Rate (FDR) von 5% konnte für kein Gen ein signifikanter p-Wert detektiert werden, somit konnte zwischen der 2N-Gruppe und der 1N-Gruppe kein signifikanter Unterschied in der Expression der untersuchten Gene auf dem Chip festgestellt werden. Ohne Korrektur für multiples Testen konnten allerdings Gene mit kleinen p-Werten im gepaarten t-Test für den Gruppenvergleich detektiert werden. In Tabelle 9 sind die 40 Gene (Top 40) mit den kleinsten p-Werten aus den beiden angewendeten Normalisierungsverfahren aufgelistet. In den Top 40 kamen in die DNA-Reparatur involvierte Gene nicht häufiger vor als auf dem gesamten Array.

Aus diesen 40 Genen mit den kleinsten p-Werten des Vergleichs 2N vs 1N wurden später einige in die weitere Untersuchung der mRNA-Expression mittels RTq-PCR eingeschlossen. Für die Gene *RFC2* (Rang 2 bzw. 4), *ERCC2* (Rang 4 bzw. 8+5), *FTH1* (Rang 7 bzw. 1), *CDKN1A* (Rang 10 bzw. 9) und *KRT17* (Rang 24 bzw. 29) wurde die mRNA-Expression durch RTq-PCR-Analysen in unbehandeltem Fibroblasten der 2N- und 1N-Probanden validiert.

Tabelle 9: Liste der Top 40-Gene aus dem cDNA-Mikroarray-Screening geordnet nach den kleinsten p-Werten des Vergleichs 2N vs 1N; mittels RTq-PCR weiter untersuchte Gene sind fettgedruckt.

Normalisierung	Print-tip Lowess mit VSN			Quantilnormalisierung			
	Ranking	Gen	p-Wert	2N/1N Ratio	Gen	p-Wert	2N/1N Ratio
	1	<i>FTH1</i>	0,00060	1,09	<i>RWDD1</i>	0,00091	0,92
	2	<i>PTK2B</i>	0,00069	0,95	<i>RFC2</i>	0,00217	1,08
	3	<i>RWDD1</i>	0,00200	0,92	<i>CAPNS1</i>	0,00403	1,05
	4	<i>RFC2</i>	0,00330	1,07	<i>ERCC2 (1)</i>	0,00433	0,94
	5	<i>ERCC2 (2)</i>	0,00595	1,17	<i>PTPRN</i>	0,00486	1,10
	6	<i>PVALB</i>	0,00783	0,88	<i>PTK2B</i>	0,00517	0,96
	7	<i>PTPRN</i>	0,00826	1,09	<i>FTH1</i>	0,00869	1,08
	8	<i>CAPNS1</i>	0,00968	1,06	<i>ERCC2 (2)</i>	0,00901	1,16
	9	<i>CDKN1A</i>	0,01185	0,91	<i>TRF4</i>	0,00917	1,10
	10	<i>TRF4</i>	0,01395	1,10	<i>CDKN1A</i>	0,01036	0,91
	11	<i>PRKCB1</i>	0,01467	0,92	<i>PRKCB1</i>	0,01212	0,93
	12	<i>EFNB3</i>	0,01763	1,07	<i>IDUA</i>	0,01455	1,07
	13	<i>PRSS2</i>	0,01932	1,08	<i>TERT</i>	0,01473	0,90
	14	<i>NTH1</i>	0,02207	0,90	<i>VIP</i>	0,01494	1,08
	15	<i>CCNH</i>	0,02429	0,82	<i>PVALB</i>	0,01557	0,89
	16	<i>VIP</i>	0,02687	1,08	<i>ERCC5</i>	0,01888	0,90
	17	<i>LHX6</i>	0,02701	0,85	<i>ENC1</i>	0,01907	1,07
	18	<i>GSS</i>	0,02707	1,04	<i>c-jun</i>	0,01974	0,96
	19	<i>ALOX5</i>	0,02710	0,86	<i>EFNB3</i>	0,01978	1,07
	20	<i>RAB18</i>	0,02741	0,95	<i>PRSS2</i>	0,01991	1,08
	21	<i>RPS9</i>	0,02824	1,07	<i>POLH</i>	0,02327	1,05
	22	<i>CALB1</i>	0,02921	1,07	<i>GSS</i>	0,02543	1,04
	23	<i>PSIP2</i>	0,02960	0,90	<i>EIF2B2</i>	0,02554	0,95
	24	<i>P160</i>	0,03007	0,90	<i>KRT17</i>	0,03119	1,09
	25	<i>TAC1</i>	0,03076	1,08	<i>CDC25B</i>	0,03462	1,12
	26	<i>POM121</i>	0,03537	1,15	<i>LHX6</i>	0,03507	0,87
	27	<i>ERCC5</i>	0,03738	0,90	<i>SLC6A1</i>	0,03922	1,07
	28	<i>RHCE</i>	0,04012	1,06	<i>SIRT1</i>	0,03960	1,09
	29	<i>KRT17</i>	0,04355	1,08	<i>TAC1</i>	0,04176	1,06
	30	<i>SLC6A1</i>	0,04471	1,07	<i>MRE11A</i>	0,04266	1,05
	31	<i>EEF1</i>	0,04563	1,12	<i>NTH1</i>	0,04285	0,93
	32	<i>PMP22</i>	0,04669	1,06	<i>EEF1</i>	0,04286	1,13
	33	<i>CREBL1</i>	0,04720	0,95	<i>SLC6A8</i>	0,04300	0,96
	34	<i>UBEN2</i>	0,04918	1,07	<i>PEPD</i>	0,04594	1,04
	35	<i>CDC25B</i>	0,04967	1,10	<i>RPA2</i>	0,04674	0,96
	36	<i>GALT</i>	0,05025	0,89	<i>ATM</i>	0,04744	0,95
	37	<i>EIF4A2</i>	0,05041	0,94	<i>RHCE</i>	0,04764	1,07
	38	<i>CTSL</i>	0,05184	1,15	<i>RAB18</i>	0,04818	0,96
	39	<i>MRE11A</i>	0,05191	1,06	<i>CTSL</i>	0,04824	1,15
	40	<i>TERT</i>	0,05328	0,90	<i>PMP22</i>	0,04837	1,06

Die zusätzlichen hierarchischen Clusteranalysen (Complete-Linkage) der Top 40 Gene führten nicht zu einer klaren Eingruppierung der Probanden in die 2N- bzw. 1N-Gruppe (Abbildung 4). Es konnten 10 der 20 1N-Probanden richtig zur 1N-Gruppe (50%) klassifiziert werden und 18 der 20 2N-Probanden wurden korrekt in die 2N-Gruppe (90%) geclustert. Dieses Ergebnis bedeutet, dass eine hohe Sensitivität, 2N-Probanden richtig zu klassifizieren, vorliegt, aber nur eine geringe Spezifität der Gruppeneinteilung vorhanden ist. Im Weiteren konnte keine Clusterung von DNA-Reparaturgenen im Vergleich zu anderen Genen festgestellt werden (Heatmap nicht dargestellt).

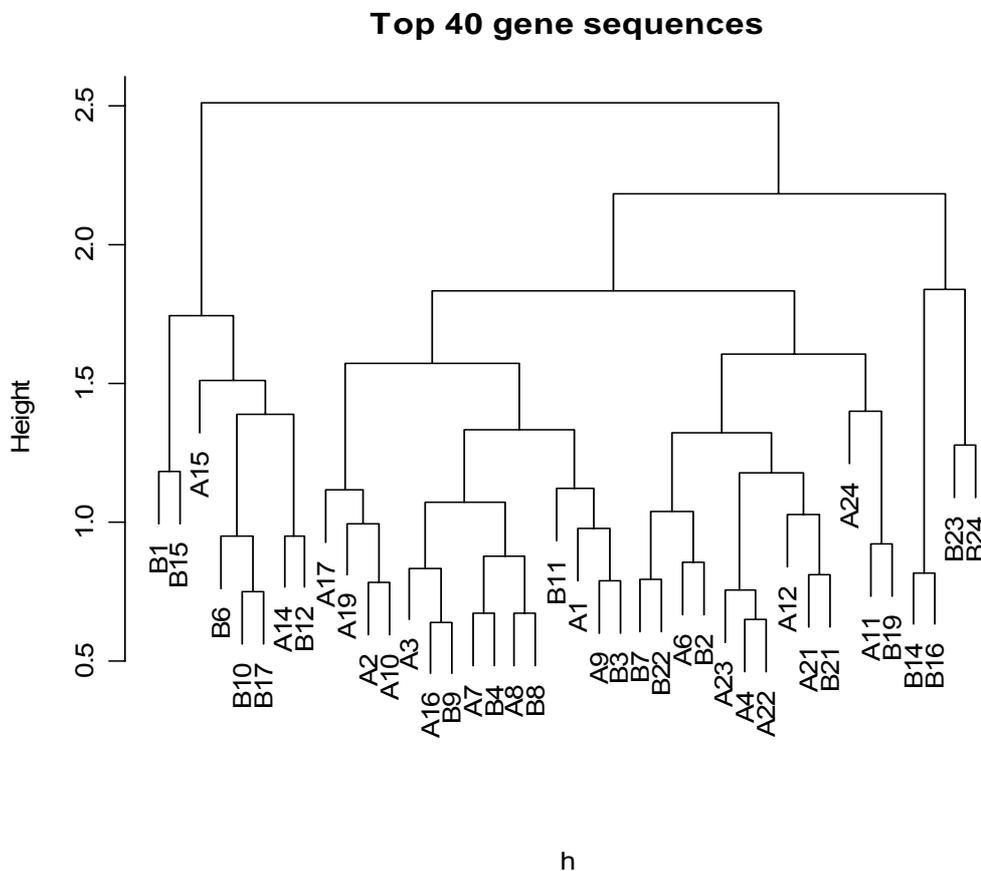


Abbildung 4: Hierarchische Clusteranalysen (Complete-Linkage) der Top 40 in den 1N (B) und 2N (A) Patienten. Die Nummern bezeichnen die gematchten Paare (z.B. A1/B1).

Da die Tumorerkrankungen innerhalb unseres Kollektivs sehr heterogen waren, wurden mit den cDNA-Microarray-Daten Subgruppenanalysen durchgeführt, mit dem Ziel, in homogeneren Gruppen auffälligere Expressionsunterschiede zu finden. Zwei im Kollektiv vorkommende, größere Subgruppen konnten hierzu definiert werden: 10 Probandenpaare mit lymphoide Leukämie als Erstdiagnose und 6 Probandenpaare mit Schilddrüsenkarzinom als Zweittumor. Die Top 20- bzw. Top 12-Liste der Gene mit den kleinsten p-Werten in diesen Subgruppen sind in Tabelle 10 und 11 dargestellt. 2 Gene aus den Top 40-Genen der Hauptanalyse konnten in den Top-Genen der Subgruppenanalyse wieder gefunden werden: *FTH1* zeigt einen kleinen p-Wert in beiden Subgruppen, *CDKN1A* nur bei lymphoide Leukämie als Erstdiagnose.

Tabelle 10: Liste der Top 20-Gene geordnet nach den kleinsten p-Werten des Vergleichs 2N vs 1N für die Subgruppe aus 10 Probanden mit Erstdiagnose lymphoide Leukämie; mittels RTq-PCR weiter untersuchte Gene aus TOP 40-Liste sind fettgedruckt.

Print-tip Lowess mit VSN			Quantilnormalisierung		
Gen	p-Wert	2N/1N Ratio	Gen	p-Wert	2N/1N Ratio
CDKN1A	0,00217	0,89108	CDKN1A	0,00210	0,88576
FTH1	0,00460	1,09715	<i>CDK7</i>	0,00490	1,09892
<i>PTPRD</i>	0,00663	1,10093	<i>FOS</i>	0,00575	0,91454
<i>ABCB8</i>	0,00767	0,94568	<i>CLCN4</i>	0,00578	1,08023
<i>CLCN4</i>	0,00869	1,06982	<i>FLNA</i>	0,00606	1,07188
<i>FLNA</i>	0,01037	1,07855	<i>PAK3</i>	0,00994	1,05289
<i>C8orf2</i>	0,01446	1,04777	<i>PTPRD</i>	0,01252	1,11566
<i>PTPRT</i>	0,01633	0,93689	<i>ABCB8</i>	0,01375	0,95936
<i>PAK3</i>	0,02669	1,03587	<i>ARRB2</i>	0,01460	1,07057
<i>P160</i>	0,02816	0,88312	<i>RFC5</i>	0,01471	0,92312
<i>PACE4</i>	0,02868	0,85789	FTH1	0,01805	1,10257
<i>CDC25B</i>	0,02906	1,16208	<i>PTPRT</i>	0,01933	0,95003
<i>EEF1</i>	0,03324	1,14787	<i>SIRT2</i>	0,02165	0,89904
<i>TUBB</i>	0,03375	1,16565	<i>CDC25B</i>	0,02272	1,18924
<i>CHEK2</i>	0,03653	0,94372	<i>GUSB</i>	0,02359	0,95089
<i>SIRT2</i>	0,03696	0,87144	<i>IDUA</i>	0,02377	1,09356
<i>HEXB</i>	0,04110	1,10564	<i>DBT</i>	0,02493	0,96558
<i>OPTN</i>	0,04328	0,90740	<i>POLK</i>	0,02826	0,93923
<i>IDUA</i>	0,04340	1,09419	<i>HEXB</i>	0,02878	1,10668
<i>TM4SF2</i>	0,04721	0,87098	<i>CREBBP</i>	0,02932	0,95257

Tabelle 11: Liste der Top 12 Gene geordnet nach den kleinsten p-Werten des Vergleichs 2N vs 1N für die Subgruppe aus sechs Probanden mit Schilddrüsenkarzinom als Zweitumor; mittels RTq-PCR weiter untersuchte Gene aus TOP 40-Liste sind fettgedruckt.

Print-tip Lowess mit VSN			Quantilnormalisierung		
Gen	p-Wert	2N/1N Ratio	Gen	p-Wert	2N/1N Ratio
<i>LTBP4</i>	0,00109	1,07007	<i>EIF4B</i>	0,00110	1,06489
<i>FTH1</i>	0,00197	1,14006	<i>FLJ10579</i>	0,00220	1,07721
<i>MAPK13</i>	0,00934	0,90567	<i>TINF2</i>	0,00429	1,06043
<i>ED1</i>	0,01044	1,13683	<i>SERPINE2</i>	0,00463	1,09372
<i>SERPINE2</i>	0,02094	1,10996	<i>MRPL40</i>	0,00716	0,93526
<i>TINF2</i>	0,02506	1,06232	<i>RIBIN</i>	0,01283	0,93249
<i>FLJ10579</i>	0,04078	1,08557	<i>FTH1</i>	0,01817	1,12339
<i>PTPRA</i>	0,04599	1,06925	<i>HTR2A</i>	0,02085	1,05766
<i>RPS9</i>	0,05223	1,08294	<i>GTF2H1</i>	0,03499	0,94516
<i>ABCB8</i>	0,06227	0,95192	<i>FMR1</i>	0,03733	0,95104
<i>POU2F1</i>	0,06300	0,91294	<i>CAPNS1</i>	0,03771	1,06319
<i>EIF4B</i>	0,06393	1,07829	<i>RWDD1</i>	0,04434	0,91553

Zusammenfassend zeigte die Datenauswertung nach dem kleinsten p-Wert nur Gene mit einem kleinen Unterschied im Expressionsverhältnis 2N/1N von 0,85-1,17 Ratio Mittelwert.

Die cDNA-Microarray-Daten wurden anschließend zusätzlich nach dem Kriterium, dass das Expressionsverhältnis größer als 1,2 bzw. kleiner als 0,8 sein muss, für jeden Probanden separat ausgewertet. Hierbei wurden die Gene berücksichtigt, die bei mindestens zwei Probanden stärkere Regulation zeigten. Folgende Gene wurden so ermittelt:

- *CDKN1A*, *RFC2*, *ERCC2*, *FTH1* und *KRT17*, Selektion aus der Datenauswertung nach kleinem p-Werten
- *ATM*, *LIG4*, *PAK2*, *UBE2V1*, *DNMT3A*, *EEF1G*, *OSGEP*, *POLK*, *RAD9A*, *RAD9B*, *RFC5*, *SH3KBP1*, *VIM*, *TNKS2* und *FBN1*, die bei mindestens zwei Probanden stärker reguliert mit einer Ratio >1,2 bzw. <0,8 vorkamen.

Diese 20 Gene wurden in weiteren Analysen mittels RTq-PCR validiert.

3.1.1.2. Zwillingsvergleich

3.1.1.2.1. mRNA-Expression in den uninduzierten Probandenfibroblasten des 2N-Probanden KKR A24 im Vergleich zu seinem monozygoten gesunden Zwilling KKR D24

Für den separaten Vergleich des 2N-Probanden (A24) mit seinem monozygoten gesunden Zwilling (D24) wurden gesonderte cDNA-Microarray-Experimente durchgeführt. Hierbei wurden nicht induzierte Fibroblastenproben von A24 und D24 in direkten Vergleich auf dem Chip hybridisiert. Für Gene, die in beiden Normalisierungsverfahren auffällig differentiell reguliert waren, wurden gemittelte Expressionsverhältnisse für A24/D24 berechnet. Die neun am stärksten regulierten Gene sind in Tabelle 12 mit A24/D24 Ratio-Mittelwerten dargestellt und wurden in weiteren separaten RTq-PCR-Analysen für das monozygote Zwillingsspaar verifiziert. Die Microarray-Auswertung für das Zwillingsspaar war rein deskriptiv, da bei nur zwei Proben ein statistischer Vergleich nicht möglich war.

Tabelle 12: Liste der im cDNA-Microarray am stärksten differentiell regulierten Gene (9) in den nicht induzierten Probandenfibroblasten des 2N-Probanden KKR A24 im Vergleich zu seinem monozygoten gesunden Zwilling KKR D24

Zusammenfassung aus beiden Normalisierungen	
Gen	A24/D24 Ratio Mittelwert
<i>ATN1</i>	1,42
<i>ATRX</i>	1,38
<i>DGKZ</i>	0,72
<i>ELK1</i>	1,30
<i>ERCC5</i>	1,31
<i>KRT17</i>	0,73
<i>MAPK1</i>	1,33
<i>PMS2L2</i>	0,72
<i>SIRT2</i>	1,35

3.1.2. RTq-PCR

3.1.2.1. Auswahl endogener Kontrollgene für die RTq-PCR

Für eine bestmögliche Normalisierung der RTq-PCR-Daten ist es wichtig, möglichst konstant exprimierte, nicht regulierte Referenzgene mit zu analysieren. Um gute endogene Kontrollgene auszuwählen, wurde hierzu die mRNA-Expression verschiede-

ner Referenzgene in 25 humanen Kontrollfibroblastenzelllinien untersucht. Hierbei handelte es sich um die folgenden zwölf in der Literatur häufig verwendeten Referenzgene:

- *GAPDH, TUBB, PPIA, ACTB, YWHAZ, RRN18S, B2M, UBC, TBP, RPLP0, GUSB, HPRT1*

Für die erhaltenen Ct-Werte wurde die Standardabweichung berechnet und mit Hilfe der geNorm Software ein internes Kontrollgen-Stabilitätsmaß M bestimmt, welches kleiner als 1,5 sein sollte. Die drei Gene mit der kleinsten Standardabweichung der Ct-Werte innerhalb der 25 Zelllinien waren *TBP* (0,210), *UBC* (0,236) und *RRN18S* (0,263).

In der geNorm-Analyse erfüllten alle Gene das Kriterium $M < 1,5$ Range (0,575-0,338), wobei *TBP* (0,338), *YWHAZ* (0,373) und *PPIA* (0,374) die kleinsten M-Werte zeigten. Da *TBP* das am stabilsten exprimierte endogene Kontrollgen in den untersuchten Fibroblasten war, wurde es als Hauptreferenzgen in den RTq-PCR-Analysen verwendet. Das Gen *TBP* kodiert das TATA box binding protein, welches ein wichtiger Faktor der Initiation und Kontrolle der Transkription ist.

In späteren Analysen wurde *RRN18S* als zweites endogenes Kontrollgen mit analysiert. *RRN18S* misst die 18S ribosomale RNA-Expression und wurde ausgesucht, um eine Normalisierung auf den Gesamtexpressionsstatus der Zellen zu erzielen. *RRN18S* war kein Top Gen in der geNorm-Analyse, zeigte aber eine sehr geringe Standardabweichung.

3.1.2.2. mRNA-Expression der mittels Microarray ausgewählten Gene in den uninduzierten Kontrollfibroblasten

Die mRNA-Expression der mittels cDNA-Microarray-Screening ausgewählten Gene wurde zunächst in den 25 unabhängigen, unbehandelten Kontrollfibroblastenzelllinien untersucht. Das Ziel dabei war, die Variabilität der Genexpression in Fibroblasten beurteilen zu können und möglicherweise hochvariable Gene von der Analyse des eigentlichen 1N- und 2N-Probandenkollektiv ausschließen zu können. Da dieses Kontrollkollektiv nicht gematcht und sehr heterogen war und im Altersdurchschnitt weit über dem des 1N- und 2N-Probandenkollektivs lag, wurde es nur zu der Etablierung der RTq-PCR-Analysen und nicht für Genexpressionsvergleiche mit den 1N- und 2N-Probandengruppen herangezogen. Exemplarisch ist in Abbildung 5 die

die mittels RTq-PCR gemessene mRNA-Expression von 17 Genen aus dem cDNA-Microarray-Screening in den 25 Kontrollfibroblasten gezeigt. Um ein relatives Expressionsverhältnis darzustellen, wurde gegen *TBP* normalisiert und gegen eine Kontrollprobe *ctrl1* verrechnet. Alle Gene zeigen innerhalb der Kontrollproben eine gewisse Variabilität der Expression im Bereich von etwa 0,5-2,0, nur das Gen *TIE* wurde aufgrund sehr großer Schwankungen in der Expression von den weiteren Analysen ausgeschlossen.

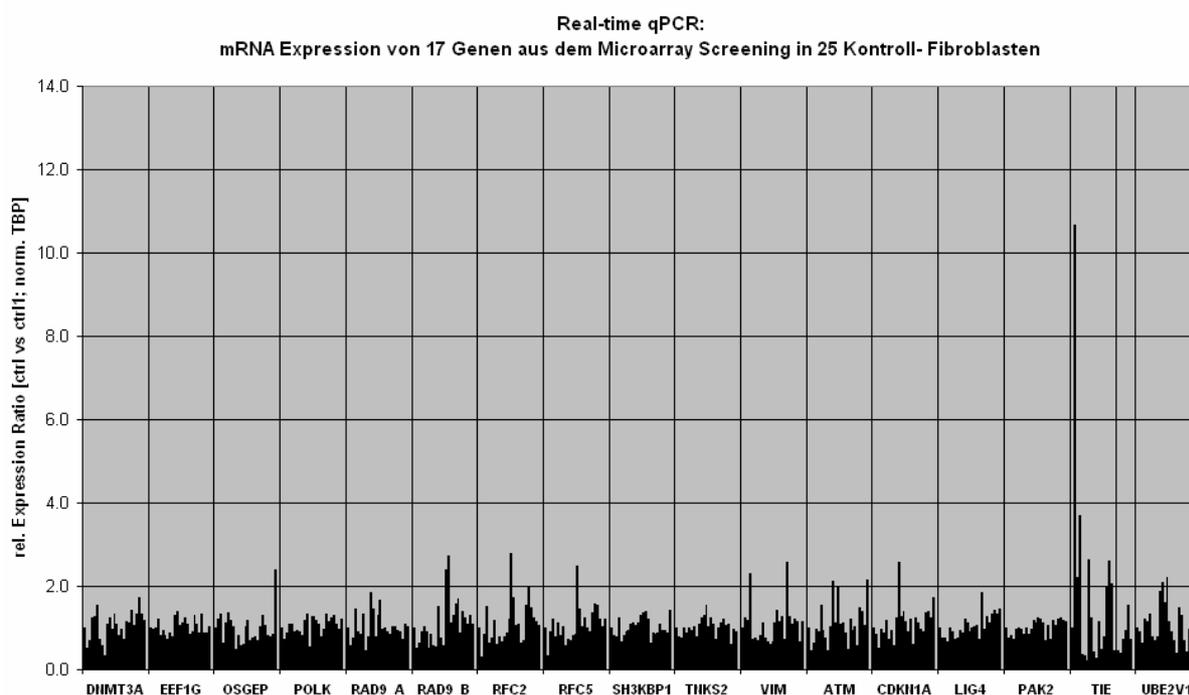


Abbildung 5: mRNA-Expression von 17 Genen aus dem cDNA-Microarray-Screening in 25 uninduzierten Kontrollfibroblastenzelllinien gemessen mittels RTq-PCR, normalisiert gegen *TBP* und gegen eine Kontrollprobe *ctrl1*.

3.1.2.3. Probandengruppenvergleich

3.1.2.3.1. mRNA-Expression der Microarray-Gene in den uninduzierten Probandenfibroblasten der 2N-Gruppe im Vergleich zur 1N-Gruppe

Mittels RTq-PCR wurde nun in den nicht induzierten Fibroblasten der 2N- und der 1N-Probanden die mRNA-Expression von folgenden 17 Kandidatengenen untersucht:

- *ATM*, *CDKN1A*, *LIG4*, *PAK2*, *UBE2V1*, *DNMT3A*, *EEF1G*, *OSGEP*, *POLK*, *RAD9A*, *RAD9B*, *RFC2*, *RFC5*, *SH3KBP1*, *VIM*, *TNKS2*, *FBN1*

Die RTq-PCR-Ergebnisse wurden gegen das Referenzgen *TBP* normalisiert und die Expressionsverhältnisse des Vergleichs 2N- zu 1N-Gruppe wurden als Boxplots (Abbildung 6) dargestellt. Eine erste statistische Auswertung mit Hilfe der REST® Software ergab, dass drei Gene, *RAD9A* (+1,3x; $p < 0,001$), *RFC2* (+1,27x; $p = 0,003$) und *VIM* (+1,37x; $p < 0,001$), eine deutlich erhöhte Expression in der 2N-Probandengruppe verglichen mit der 1N-Probandengruppe zeigten. Diese Gene wurden in weiteren Analysen genauer untersucht. Das Ergebnis für *RAD9A* musste verworfen werden, da die kommerziell erworbenen Primer von QIAGEN, wie sich herausstellte, nicht exonspannend waren und so eine Kontamination der Proben mit genomischer DNA nicht ausgeschlossen werden konnte.

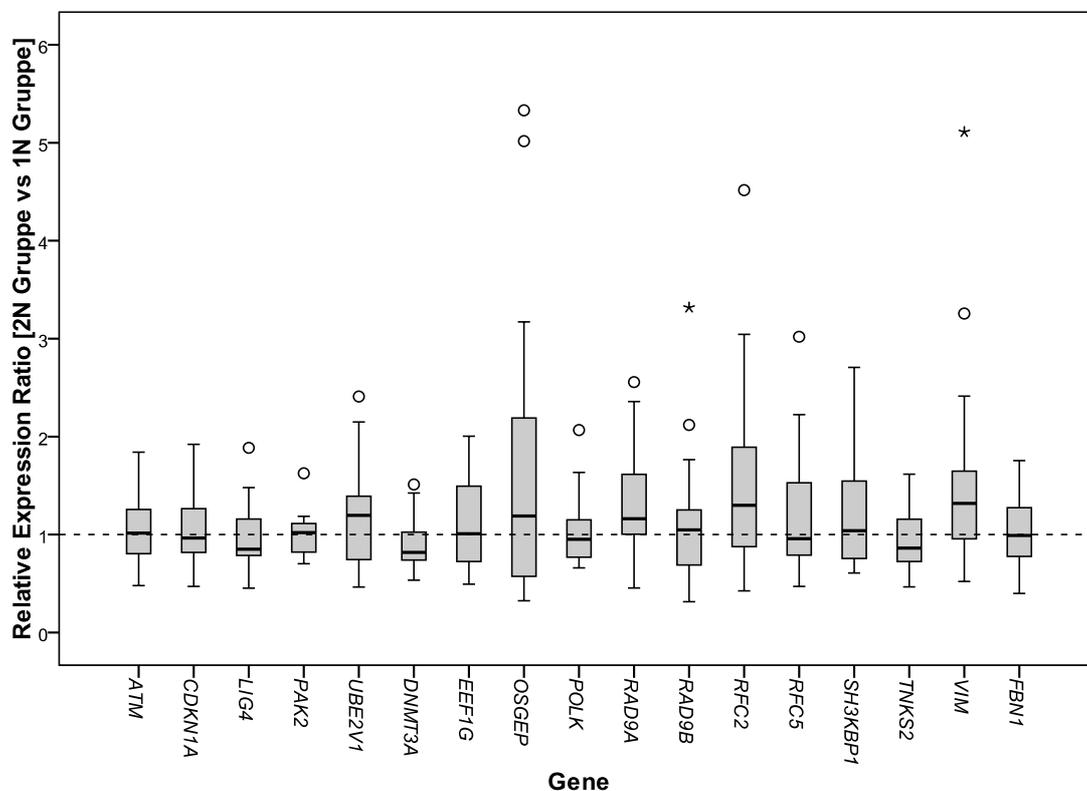


Abbildung 6: mRNA-Expression der Microarray-Gene in den uninduzierten Probandenfibroblasten der 2N-Gruppe vs 1N-Gruppe; gemessen mittels RTq-PCR, normalisiert gegen *TBP*; Die Expressionsratios 2N/1N sind als Boxplots dargestellt; Ausreißer sind mit ° und extreme Ausreißer mit * markiert. In einer Präanalyse zeigten drei Gene, *RAD9A* (1,3x; $p < 0,001$), *RFC2* (1,27x; $p = 0,003$) und *VIM* (1,37x; $p < 0,001$), eine deutlich erhöhte Expression beim Vergleich der 2N- mit der 1N-Probandengruppe.

In den folgenden Analysen wurde die Expression von *RAD9A* mit neu entworfenen, (Primer3 Software: <http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>), verifizierten (Sequenzanalyse, qPCR Standardkurve) exonspannenden Primern detektiert.

Zur weiteren Validierung der konstitutiven Expressionsunterschiede zwischen der Probandengruppe 2N und 1N wurden die drei Gene, *RAD9A*, *RFC2* und *VIM*, sowie

noch vier weitere Kandidatengene, *CDKN1A*, *KRT17*, *ERCC2* und *FTH1*, mittels RTq-PCR analysiert. Normalisiert wurde für die Feinanalyse mit zwei endogenen Kontrollgenen, *TBP* und *RRN18S*. Die Ergebnisse des Expressionsvergleichs 2N- zu 1N-Gruppe sind für die sieben Gene in Abbildung 7 als Boxplots dargestellt. Die statistische Auswertung (gepaarter Vorzeichentest) ergab, dass sich die drei Gene *RAD9A*, *CDKN1A* und *FTH1* konstitutiv differentiell exprimiert in den Probandengruppen darstellten. Im Vergleich der 2N- zur 1N-Probandengruppe zeigten die Gene *CDKN1A* (+1,25x; p=0,003) und *FTH1* (+1,64x; p=0,041) eine erhöhte mRNA-Expression und *RAD9A* (-2,40x; p=0,004) eine deutlich niedrigere mRNA-Expression.

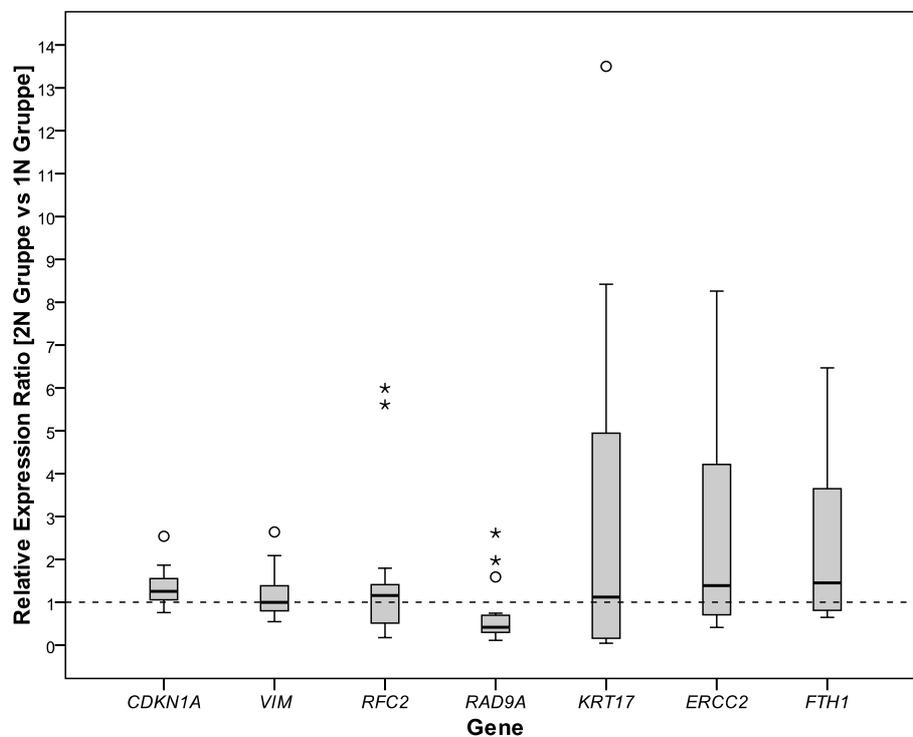


Abbildung 7: mRNA-Expression auffälliger und zusätzlicher Gene in den uninduzierten Probandenfibroblasten der 2N-Gruppe vs 1N-Gruppe; gemessen mittels RTq-PCR, normalisiert gegen *TBP* und *RRN18S*; Die Expressionsratios 2N/1N sind als Boxplots dargestellt; Ausreißer sind mit ° und extreme Ausreißer mit * markiert. Im Vergleich der 2N- zur 1N-Gruppe zeigten die Gene, *CDKN1A* (+1,25x; p=0,003) und *FTH1* (+1,64x; p=0,041), eine erhöhte mRNA-Expression und *RAD9A* (-2,40x; p=0,004) eine deutlich niedrigere mRNA-Expression.

Für das in der ersten Analyse (Abb. 6) unauffällige *CDKN1A*-Gen konnte durch die optimierte Auswertung doch ein Unterschied nachgewiesen werden. Die zuvor detektierten Expressionsunterschiede für *RFC2* und *VIM* konnten nicht bestätigt werden. Die Gene *KRT17*, *ERCC2* und *FTH1* zeigten eine deutlich höhere Variabilität der Expression innerhalb der untersuchten Proben (Boxplots, Abbildung 7). *FTH1* wurde

aufgrund dieser erhöhten Variabilität der Expression, seiner multiplen Pseudogene und etlicher alternativer Transkriptsplicevarianten trotz detektiertem Expressionsunterschied in den Probandengruppen nicht in die folgenden Analysen eingeschlossen. Die auffälligsten Ergebnisse dieses Vergleichs der basalen Expression der 2N-Probanden mit den 1N-Probanden waren die erhöhte Expression von *CDKN1A* und die stark reduzierte Expression von *RAD9A*.

In den nachfolgenden Analysen wurde die mRNA-Expression dieser und weiterer Gene nach Induktion durch 1 Gy Bestrahlung der Zellen für die zwei Probandengruppen untersucht.

3.1.2.3.2. mRNA-Expression auffälliger Gene in den Probandenfibroblasten der 2N-Gruppe im Vergleich zur 1N-Gruppe nach Induktion durch 1 Gy Bestrahlung

Für eine kleinere Auswahl an Genen wurde die mRNA-Expression nach 1 Gy radioaktiver Bestrahlung in beiden Probandengruppen bestimmt. Hierzu wurde die Expression der Gene *CDKN1A*, *RAD9A*, *RFC2*, *KRT17* und *VIM* in den Zellen der 2N- und 1N-Probanden 1 h, 4 h und 24 h nach 1 Gy Induktion mittels RTq-PCR detektiert. Normalisiert wurde wieder gegen die zwei endogenen Kontrollgene *TBP* und *RRN18S*. Zur Auswertung wurden anschließend die Werte der behandelten Proben mit denen der unbehandelten Proben verrechnet. So wurde die relative Expressionsänderung nach Bestrahlung ermittelt. Der statistische Vergleich (gepaarter Vorzeichen-test) der Probandengruppen 2N und 1N ergab, dass sie sich nur in der mRNA-Expression des Genes *RAD9A* differentiell unterschieden. Das Reparaturindikatorgen *CDKN1A* [36] zeigte keinen Unterschied zwischen den Gruppen, aber bei beiden Gruppen die erwartete erhöhte mRNA-Expression (ca. +2x nach 4 h) nach der Bestrahlung. Für das Gen *RFC2* konnte 24 h nach Bestrahlung für beide Gruppen eine reduzierte mRNA-Expression (ca. -2x) gemessen werden. Für die Gene *VIM* und *KRT17* wurde keine Expressionsänderung nach Induktion detektiert.

Die *RAD9A* Expressionsänderung nach 1 Gy Induktion ist für die jeweilige Probandengruppe 2N und 1N in Abbildung 8 in Form von Boxplots dargestellt. Die 2N-Gruppe zeigte hierbei eine deutlich verminderte *RAD9A* mRNA-Expression 1 h (-1,17x; p=0,041) und 4 h (-1,10x; p=0,041) nach der Bestrahlung.

Die Expression der anderen Gene ist nicht dargestellt.

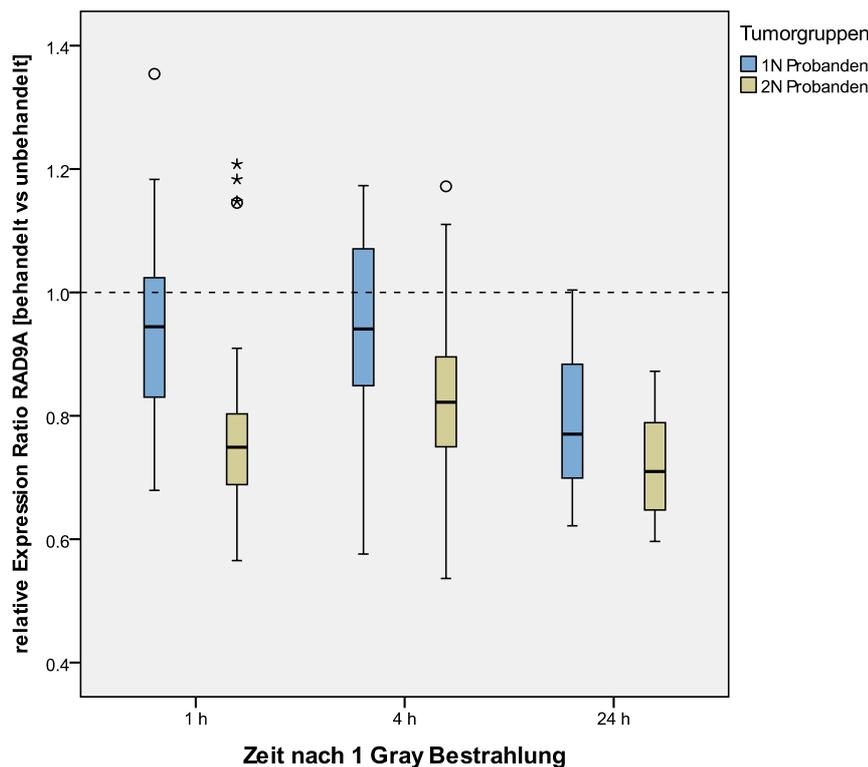


Abbildung 8: Relative Expressionsänderung des Gens *RAD9A* 1 h, 4 h, 24 h nach Induktion durch 1 Gy Bestrahlung im Vergleich zur konstitutiven Expression für die 1N- und 2N-Gruppe, gemessen mittels RTq-PCR, normalisiert gegen *TBP* und *RRN18S*; Die Expressionsratios behandelt/unbehandelt der jeweiligen Gruppe sind als Boxplots dargestellt; Ausreißer sind mit ° und extreme Außereißer mit * markiert. Es liegt ein deutlicher Unterschied ($p < 0,05$) bei den Zeiten 1 h (-1,17x; $p = 0,041$) und 4 h (-1,10x; $p = 0,041$) nach Induktion zwischen den Gruppen vor.

3.1.2.4. Zwillingsvergleich

3.1.2.4.1. mRNA-Expression der Kandidatengene in den uninduzierten Fibroblasten des 2N-Probanden KKR A24 im Vergleich zu seinem monozygoten gesunden Zwilling KKR D24

In einer separaten Analyse wurde mittels RTq-PCR in den Fibroblasten des 2N-Probanden (KKR A24) und seines monozygoten gesunden Zwillings (KKR D24) die konstitutive mRNA-Expression von folgenden zehn Kandidatengenen des Microarray-Screenings untersucht:

- *AKR1A1*, *ATN1*, *ATRX*, *DGKZ*, *ELK1*, *ERCC5*, *KRT17*, *MAPK1*, *PMS2L2*, *SIRT2*

Die RTq-PCR-Ergebnisse wurden mittels des Referenzgens *TBP* normalisiert. Die Expressionsverhältnisse wurden für den Vergleich KKR A24 gegen KKR D24 mit Hilfe der REST® Software berechnet und sind in Abbildung 9 dargestellt. Alle Aus-

wertungen für das Zwillingsspaar waren rein deskriptiv, da bei nur zwei Proben ein statistischer Vergleich nicht möglich war. Die Gene *AKR1A1*, *ATN1*, *MAPK1* und *SIRT2* zeigten eine erhöhte mRNA-Expression und das Gen *KRT17* eine verminderte Expression bei dem 2N-Zwilling im Vergleich zum gesunden Zwilling.

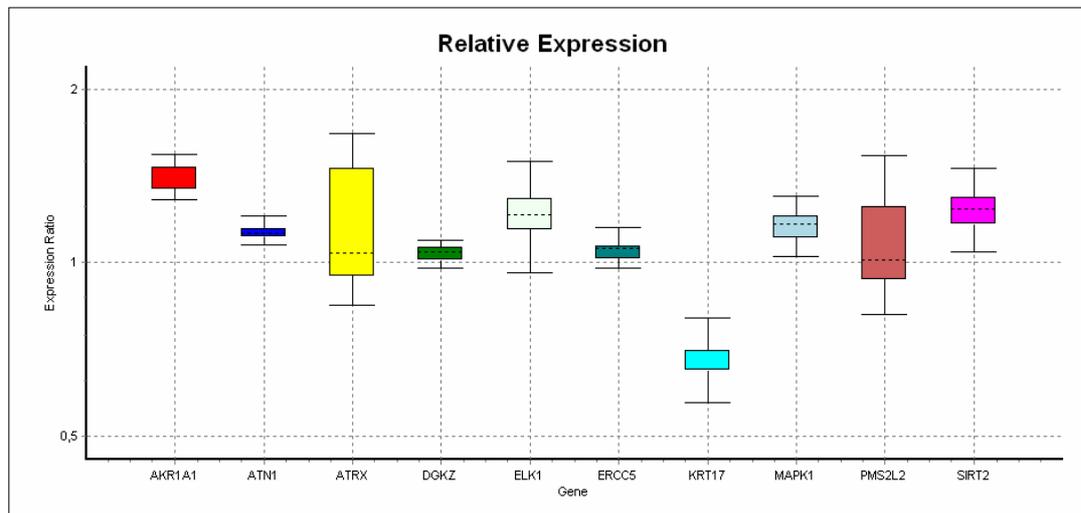


Abbildung 9: mRNA-Expression der Microarray-Gene in den uninduzierten Fibroblasten des 2N-Probanden (KKR A24) vs seinen monozygoten gesunden Zwilling (KKR D24); gemessen mittels RTq-PCR normalisiert gegen *TBP*; Die Expressionsratios KKR A24 (2N)/KKR D24 (gesund) sind als Box-plots dargestellt. Die Gene *AKR1A1*, *ATN1*, *MAPK1* und *SIRT2* zeigten eine erhöhte mRNA-Expression und das Gen *KRT17* eine verminderte Expression bei dem 2N-Zwilling im Vergleich zum gesunden Zwilling.

Vier dieser auch hier auffälligen Gene bestätigten die im Microarray detektierte Regulation, nur das Gen *AKR1A1* zeigte in der RTq-PCR eine Regulation in die andere Richtung (siehe Tabelle 12). Da die RTq-PCR die genauere Meßmethode darstellt, wurde das Gen *AKR1A1* als hochreguliert betrachtet. Diese und zusätzliche Gene wurden in weiteren Analysen genauer untersucht.

Tabelle 12: cDNA-Microarray vs qPCR-Expressionratios KKR A24 (2N)/KKR D24 (gesund) der auffälligen Gene in der RTq-PCR-Analyse. Nur das Gen *AKR1A1* zeigte in der RTq-PCR die Regulation in die andere Richtung.

Gene	Ratio KKR A24 (2N) /KKR D24 (gesund)	
	cDNA-Microarray	RTq-PCR
<i>AKR1A1</i>	0.77	1.39
<i>ATN1</i>	1.42	1.13
<i>KRT17</i>	0.73	0.67
<i>MAPK1</i>	1.33	1.16
<i>SIRT2</i>	1.35	1.24

In einer weiteren Feinanalyse der mRNA-Expressionsunterschiede zwischen den Zwillingen wurde die Gene *AKR1A1*, *ATN1*, *MAPK1*, *SIRT2* und *KRT17* eingeschlos-

sen und zusätzlich noch die Gene *RSPO3*, *BRCA1* und *CDKN1A* mituntersucht. Das Gen *RSPO3* wurde eingeschlossen, da in der genomischen SNP-Array-Analyse eine mögliche Deletion beim 2N-Zwilling angezeigt wurde. In der epigenetischen Analyse hatte sich ein 10% erhöhter Methylierungsgrad für *BRCA1* beim 2N Zwilling dargestellt, weshalb die *BRCA1* mRNA-Expression für die Zwillinge untersucht wurde. Die mRNA-Expression des Gens *CDKN1A* wurde als Indikator für die Induktionsexperimente mitgemessen, da nach DNA-Schädigung eine Hochregulation von *CDKN1A* zu erwarten ist [36]. Normalisiert wurde für die Feinanalyse mit zwei endogenen Kontrollgenen, *TBP* und *RRN18S*. Die Ergebnisse des Expressionsvergleichs 2N-Zwilling (KKR A24) gegen gesunden Zwilling (KKR D24) sind für die acht Gene in Abbildung 10 dargestellt. Die Gene *KRT17* (-5,55x) und *RSPO3* (-2,79x) waren in den Fibroblasten des 2N-Zwilling im Vergleich zum gesunden Zwilling stark vermindert und *SIRT2* (+1,61x) deutlich erhöht exprimiert. Die Gene *MAPK1* (+1,27x) und *BRCA1* (+1,18x) zeigten dagegen nur eine leicht erhöhte mRNA-Expression im 2N-Zwilling. Die leichte Hochregulation von *ATN1* aus den vorhergehenden Analysen konnte hier nicht mehr detektiert werden. Die Gene *ATN1* und *AKR1A1* wurden genauso wie *CDKN1A* aufgrund der Messungenauigkeit als unreguliert gewertet.

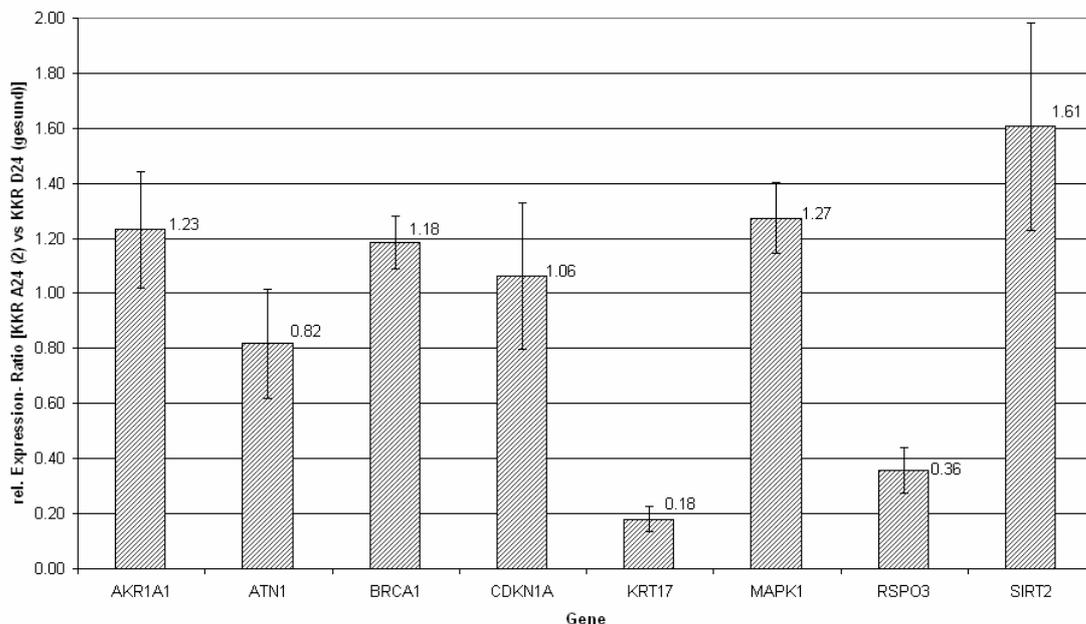


Abbildung 10: mRNA-Expression auffälliger und zusätzlicher Gene in den uninduzierten Fibroblasten des 2N-Probanden (KKR A24) vs seinen monozygoten gesunden Zwilling (KKR D24); gemessen mittels RTq-PCR, normalisiert gegen *TBP* und *RRN18S*; Die Expressionsratios KKR A24 (2N)/KKR D24 (gesund) sind im Balkendiagramm mit Standardabweichung dargestellt. Die Gene *KRT17*, *RSPO3* und *SIRT2* zeigten die stärksten Expressionsunterschiede.

In dieser Feinanalyse konnten die Expressionstendenzen der ersten RTq-PCR-Validierung für die Gene *AKR1A1*, *MAPK1*, *KRT17* und *SIRT2* bestätigt werden. Die größten Unterschiede zwischen 2N-Zwilling und gesundem Zwilling wurden in der mRNA-Expression der Gene *KRT17*, *RSPO3* und *SIRT2* gefunden.

3.1.2.4.2. mRNA-Expression ausgewählter Gene in den Fibroblasten des 2N-Probanden KKR A24 im Vergleich zu seinem monozygoten gesunden Zwilling KKR D24 nach Induktion durch 1 Gy Bestrahlung

Für die ausgewählten Gene, *AKR1A1*, *ATN1*, *MAPK1*, *SIRT2*, *KRT17*, *RSPO3*, *BRCA1* und *CDKN1A*, wurde die mRNA-Expression nach 1 Gy radioaktiver Bestrahlung in den Fibroblasten des 2N-Probanden und seines monozygoten gesunden Zwilling bestimmt. Hierzu wurde die Expression 1 h, 4 h, 12 h und 24 h nach 1 Gy Induktion mittels RTq-PCR detektiert. Normalisiert wurde wieder gegen die zwei endogenen Kontrollgene, *TBP* und *RRN18S*. Zur Auswertung wurden anschließend die Werte der behandelten Proben mit denen der unbehandelten Proben verrechnet und so die relative Expressionsänderung nach Bestrahlung ermittelt. In die Auswertung flossen die Daten aus zwei Versuchen ein. Die Gene *ATN1*, *BRCA1*, *KRT17* und *SIRT2* zeigten nach der Induktion Unterschiede für das Zwillingpaar. Die Expressionsverläufe dieser Gene sind in Abbildung 11-14 als Balkendiagramm mit Standardabweichungen dargestellt. Das Reparaturindikatorgen *CDKN1A* zeigte keinen Unterschied zwischen den Zwillingen, aber bei beiden die erwartete erhöhte Expression nach der Bestrahlung (Graphik nicht dargestellt). Für die Gene *AKR1A1*, *MAPK1* und *RSPO3* wurden nach der 1 Gy Bestrahlung keine auffälligen Expressionsunterschiede zwischen den Zwillingen festgestellt (Graphiken nicht dargestellt). Das Gen *AKR1A1* zeigte 24 h nach Bestrahlung aber eine erhöhte mRNA-Expression (ca. 2,5x) für beide Zwillinge. Auch für das Gen *RSPO3* konnte 24 h nach Bestrahlung eine erhöhte mRNA-Expression, allerdings mit einer hohen Messungenauigkeit behaftet, festgestellt werden. Für das Gen *MAPK1* wurde keine Expressionsänderung nach Induktion detektiert.

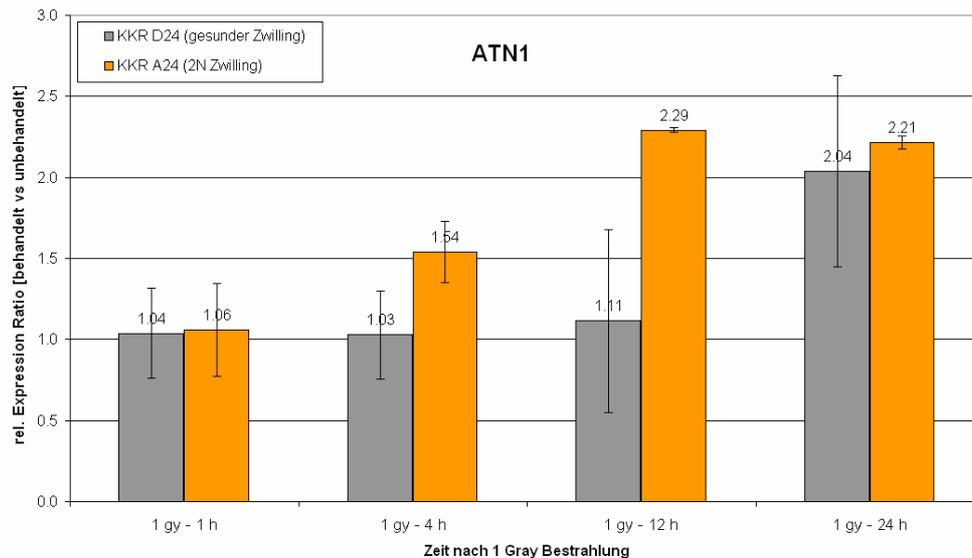


Abbildung 11: Relative Expressionsänderung des Gens *ATN1* 1 h, 4 h, 12 h und 24 h nach Induktion durch 1 Gy Bestrahlung im Vergleich zur konstitutiven Expression für den 2N-Probanden (KKR A24) und seinen monozygoten gesunden Zwilling (KKR D24); gemessen mittels RTq-PCR, normalisiert gegen *TBP* und *RRN18S*; Die Expressionsratios behandelt/unbehandelt der jeweiligen Probe sind als Balkendiagramm mit Standardabweichung (2 Versuche) dargestellt.

Für das Gen *ATN1* (Abbildung 11) konnte im Zeitverlauf nach der 1 Gy Bestrahlung eine Hochregulation der mRNA-Expression detektiert werden, wobei der 2N-Zwilling hier schon nach 12 h eine etwa doppelt so hohe Expression im Vergleich zum gesunden Zwilling zeigte. Nach 24 h wurde dann auch beim gesunden Zwilling ein etwa zweifach erhöhtes *ATN1*-Expressionsniveau gemessen.

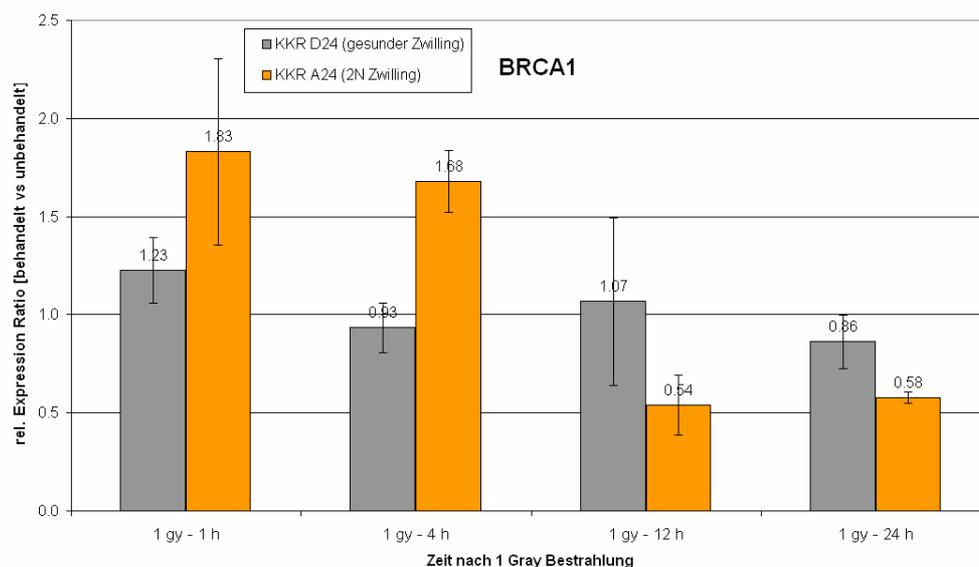


Abbildung 12: Relative Expressionsänderung des Gens *BRCA1* 1 h, 4 h, 12 h und 24 h nach Induktion durch 1 Gy Bestrahlung im Vergleich zur konstitutiven Expression für den 2N-Probanden (KKR A24) und seinen monozygoten gesunden Zwilling (KKR D24); gemessen mittels RTq-PCR, normalisiert gegen *TBP* und *RRN18S*; Die Expressionsratios behandelt/unbehandelt der jeweiligen Probe sind als Balkendiagramm mit Standardabweichung (2 Versuche) dargestellt.

Bei *BRCA1* (Abbildung 12) konnten im Zeitverlauf nach der 1 Gy Bestrahlung Schwankungen in der mRNA-Expression (1,8x-0,5x) für den 2N-Zwilling detektiert werden, wohingegen der gesunde Zwilling eine stabile, unveränderte Expression nach der Induktion aufwies. Nach 1 h und 4 h zeigten die Zellen des 2N-Zwillings ein erhöhtes *BRCA1*-Expressionsniveau und nach 12 h und 24 h konnte eine verminderte Expression detektiert werden.

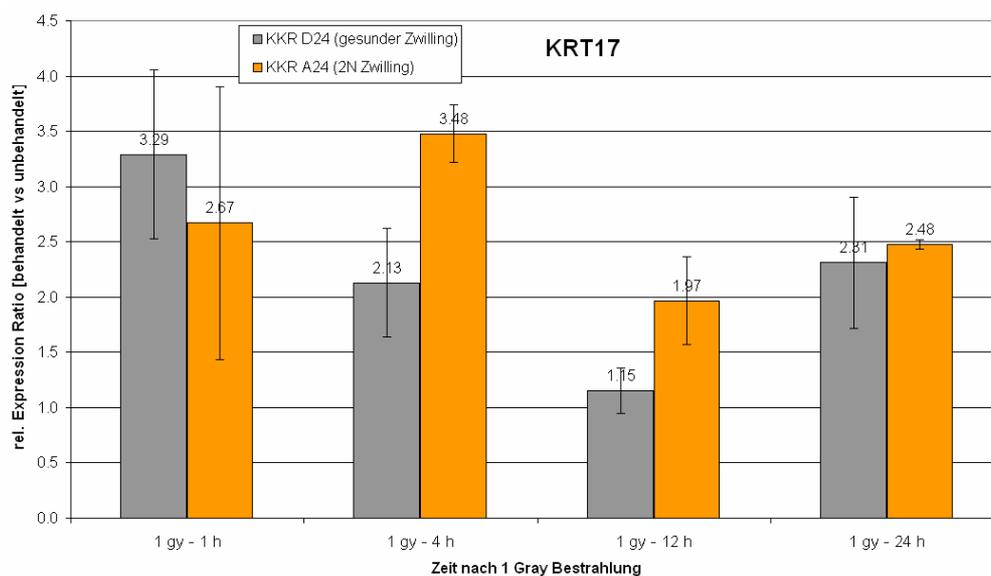


Abbildung 13: Relative Expressionsänderung des Gens *KRT17* 1 h, 4 h, 12 h und 24 h nach Induktion durch 1 Gy Bestrahlung im Vergleich zur konstitutiven Expression für den 2N-Probanden (KKR A24) und seinen monozygoten gesunden Zwilling (KKR D24); gemessen mittels RTq-PCR, normalisiert gegen *TBP* und *RRN18S*; Die Expressionsratios behandelt/unbehandelt der jeweiligen Probe sind als Balkendiagramm mit Standardabweichung (2 Versuche) dargestellt.

Für das Gen *KRT17* (Abbildung 13) wurde 1 h nach Bestrahlung bei beiden Zwillingen eine etwa zwei bis dreifache Hochregulation der mRNA-Expression gemessen. Nach 4 h stieg die *KRT17*-Expression beim 2N-Zwilling noch weiter an, wohingegen sie beim gesunden Zwilling schon wieder absank. Als nach 12 h die *KRT17*-mRNA-Expression beim gesunden Zwilling schon fast wieder auf Ausgangsniveau reduziert war, zeigte auch der 2N-Zwilling eine Reduktion der *KRT17*-mRNA-Expression. Die Zellen von beiden Zwillingen waren dann 24 h nach der Bestrahlung auf dem etwa zweifachen Expressionslevel von *KRT17* im Vergleich zum unbehandelten Status verblieben.

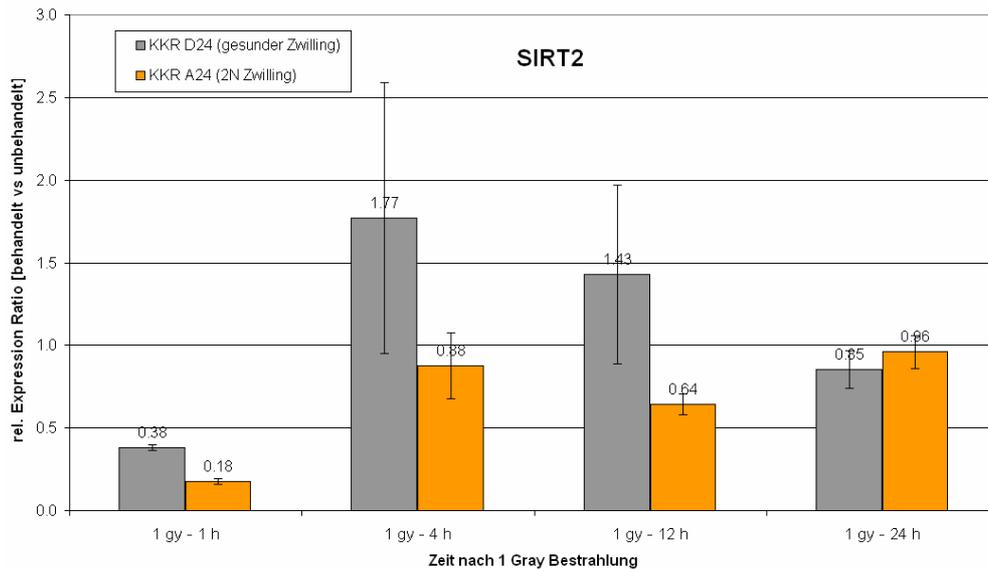


Abbildung 14: Relative Expressionsänderung des Gens *SIRT2* 1 h, 4 h, 12 h und 24 h nach Induktion durch 1 Gy Bestrahlung im Vergleich zur konstitutiven Expression für den 2N-Probanden (KKR A24) und seinen monozygoten gesunden Zwilling (KKR D24); gemessen mittels RTq-PCR, normalisiert gegen *TBP* und *RRN18S*; Die Expressionsratios behandelt/unbehandelt der jeweiligen Probe sind als Balkendiagramm mit Standardabweichung (2 Versuche) dargestellt.

Bei *SIRT2* (Abbildung 14) konnte 1 h nach der Induktion eine starke Verminderung der mRNA-Expression bei beiden Zwillingen detektiert werden, wobei beim 2N-Zwilling die Expression noch stärker reduziert vorlag. 4 h und 12 h nach der Behandlung wurde beim gesunden Zwilling eine Hochregulation der *SIRT2*-Expression gemessen, der 2N-Zwilling zeigte hier nur eine leichte Erhöhung der Regulation über dem Ausgangsniveau. Nach 24 h war die Expression bei beiden Zwillingen wieder auf dem Level der unbehandelten Zellen.

Da für den Zwillingvergleich keine statistische Auswertung durchgeführt werden konnte, sind die Expressionsunterschiede der Gene *ATN1*, *BRCA1*, *KRT17* und *SIRT2* zwar auffällig, aber nur rein deskriptiv.

3.1.3. Western Blot zur Validierung des RAD9A-Antikörpers

Um den größten detektierten Unterschied der *RAD9A*-mRNA-Expression zwischen der 2N- und der 1N-Probandengruppe (siehe Ergebnisse 3.1.2.3. & 3.1.2.4.) auf Proteinebene zu analysieren, wurde ein RAD9A-Antikörper verwendet, der mittels Western Blot exemplarisch für ein Probandenpaar getestet wurde (Abbildung 15). Hierbei zeigten die mit SDS-PAGE aufgetrennten nukleären Proteinfractionen der zwei Probanden im Western Blot mit dem RAD9A-Antikörper Proteinbanden mit der ge-

wünschten Größe (ca. 45 kDa). Eine exemplarische Auswertung dieses einen Probandenpaars ergab für das Verhältnis 2N- zu 1N-Proband einen Wert von 0,65, was eine sichtlich reduzierte (-1,54x) *RAD9A*-Proteinexpression darstellt.

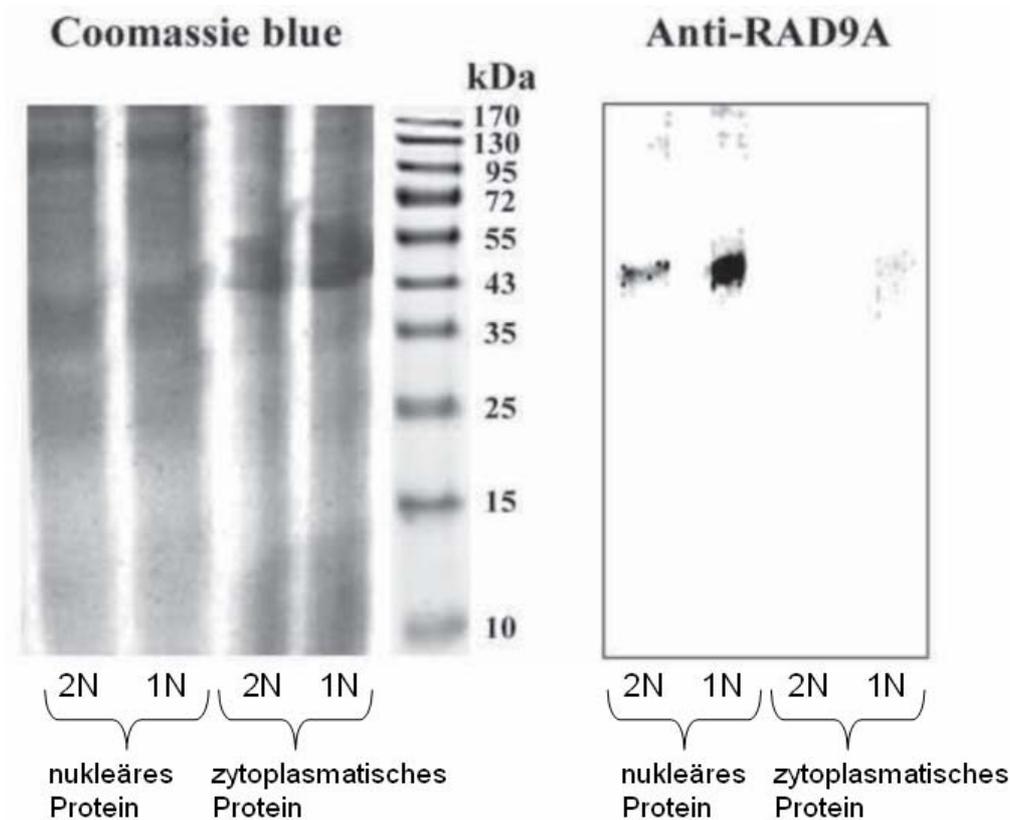


Abbildung 15: Western Blot zur *RAD9A*-Antikörpervalidierung:

Das Gel (links) zeigt die Coomassie Blau-Färbung des nukleären und zytoplasmatischen Proteinextrakts (jeweils 30 µg) aus den unbehandelten Fibroblasten eines gematchten Probandenpaars (2N-Proband = KKR A7, 1N-Proband = KKR B7). Das korrespondierende Gel (rechts) zeigt im Western Blot mit *RAD9A*-Antikörper (2 µg/ml) ein nukleäres Protein in der erwünschten Größe von ca. 45 kDa. Die Auswertung des exemplarischen Probandenpaars ergab für den 2N/1N-Vergleich einen reduzierten *RAD9A* -Proteinlevel von 0,65 (-1,54x).

Da nur geringe Proteinmengen aus den Fibroblasten der 2N- und 1N-Probanden zur Verfügung standen, wurde für die Gesamtanalyse aller Proben nicht Western Blots, sondern Antikörper-Microarrays verwendet. Antikörper-Microarrays erlauben die parallele Messung der Expression verschiedener Proteine (bis zu 30) in vielen Proben. Außerdem zeichnen sie sich durch eine hohe Sensitivität aus, da schon geringe Proteinmengen (1-2 µg) für die Messung ausreichen. Zudem erhöhen die mehrfach gespotteten Antikörper für jedes Protein die Messgenauigkeit und ermöglichen eine statistische Auswertung. Die Antikörper-Microarrayexperimente wurden mit Unterstützung der Augenklinik (Universitätsmedizin Mainz) durchgeführt.

3.1.4. Antikörper-Microarrays

Mittels Antikörper-Microarrays wurde schwerpunktmäßig die *RAD9A*-Proteinexpression in den nicht induzierten als auch in den 1 Gy induzierten Fibroblasten der 2N- und 1N-Probandengruppe untersucht. In den Antikörper-Microarrays wurde zusätzlich noch die Proteinexpression 19 weiterer DNA-Reparaturgene analysiert, für die Antikörper zur Verfügung standen.

3.1.4.1. Probandengruppenvergleich

3.1.4.1.1. Proteinexpression in den uninduzierten Probandenfibroblasten der 2N-Gruppe im Vergleich zur 1N-Gruppe

Zuerst wurde anhand der Antikörper-Microarrays die konstitutive Proteinexpression von *RAD9A* und weiteren DNA-Reparaturproteinen in der nukleären Proteinfraction der Fibroblasten der 2N- und 1N-Probanden analysiert. Zur Veranschaulichung sind in Abbildung 16 die Subarrays mit der fluoreszenzdetektierten nukleären Proteinexpression der nicht induzierten Fibroblasten eines Probandenpaars, KKR A7 (2N) und KKR B7 (1N), dargestellt.

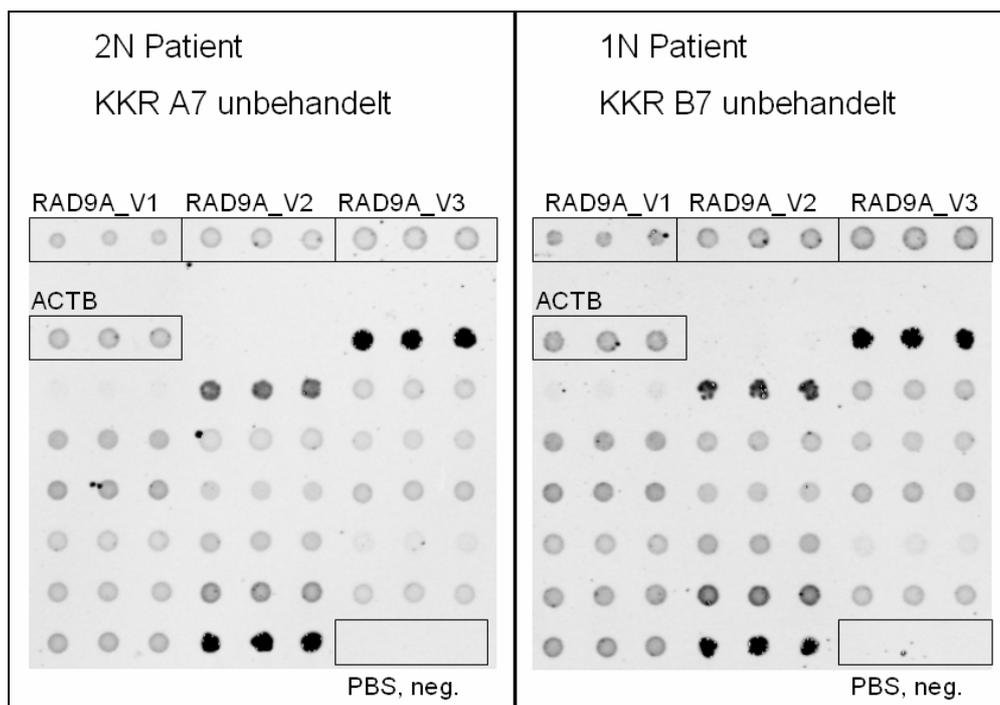


Abbildung 16: Antikörper-Subarrays mit der fluoreszenzdetektierten nukleären Proteinexpression der nicht induzierten Fibroblasten eines Probandenpaars, exemplarisch KKR A7 (2N) und KKR B7 (1N)

In der Auswertung wurden die 2N-Probanden mit den gematchten 1N-Probanden statistisch verglichen (gepaarter Wilcoxon- bzw. Vorzeichentest); sechs Antikörper zeigten hierbei deutliche Unterschiede. Die resultierenden Z Ratios des Proteinvergleichs sind für die sechs auffälligen Proteine in Abbildung 17 dargestellt. Für RAD9A und fünf weitere Proteine, GTBP/MSH6, GADD153/DDIT3, BRCA1, p53 und RAD51, konnte so eine differentielle Proteinexpression in den nicht induzierten Zellen der 2N-Probanden verglichen mit den 1N-Probanden detektiert werden.

Die 2N-Probandengruppe zeigte hierbei einen niedrigeren Proteinexpressionslevel von RAD9A (-1,38x; $p=0,04$), GTBP/MSH6 (-1,16x; $p=0,021$), GADD153/DDIT3 (-1,27x; $p=0,011$), BRCA1 (-1,36x; $p=0,017$), p53 (-1,18x; $p=0,003$) und RAD51 (-1,37x; $p=0,009$) verglichen mit der 1N-Probandengruppe.

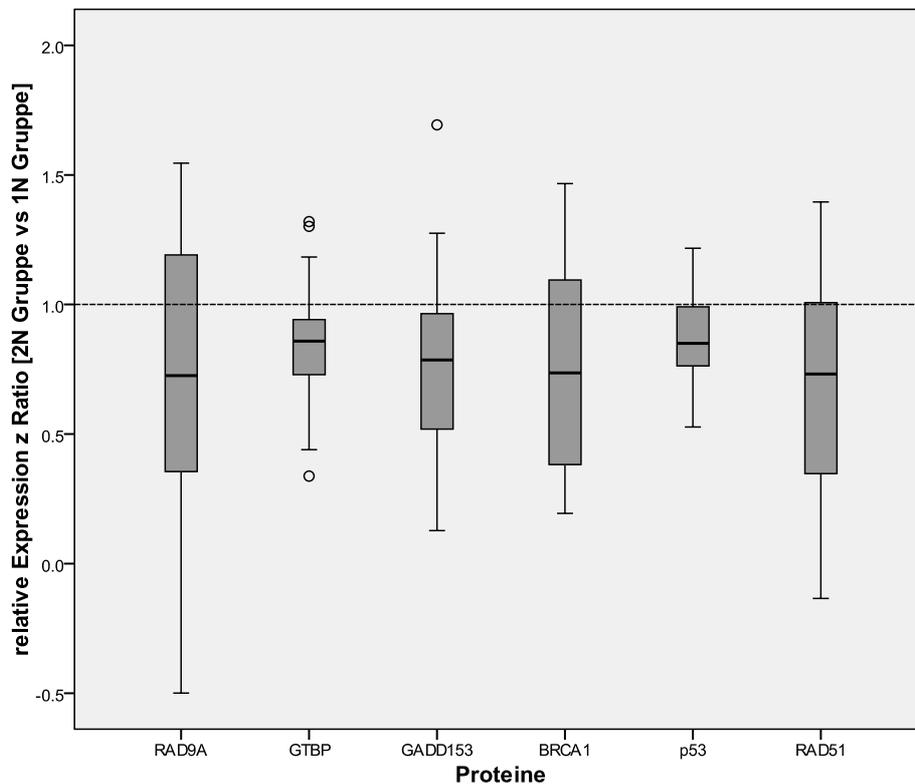


Abbildung 17: konstitutive nukleäre Proteinexpressionsanalyse mittels Antikörper-Microarrays; normalisiert mit log₁₀-Transformation und Z Score Berechnung; Expressionsvergleich 2N/1N mittels Z Ratio Berechnung; RAD9A (-1,38x; $p=0,04$), GTBP (-1,16x; $p=0,021$), GADD153 (-1,27x; $p=0,011$), BRCA1 (-1,36x; $p=0,017$), p53 (-1,18x; $p=0,003$), RAD51 (-1,37x; $p=0,009$), zeigten eine deutlich niedrigere Proteinexpression ($p<0,05$) in den 2N-Probanden verglichen mit den 1N-Probanden. ° markiert Ausreißerwerte.

3.1.4.1.2. Proteinexpression in den Probandenfibroblasten der 2N-Gruppe im Vergleich zur 1N-Gruppe nach Induktion durch 1 Gy Bestrahlung

Nach der Analyse der basalen Proteinexpression wurde mit Hilfe der Antikörper-Microarrays auch die nukleäre Proteinexpression in den Fibroblasten der 2N- und 1N-Probanden nach Induktion mittels 1 Gy Bestrahlung untersucht. Aufgrund der detektierten differentiellen mRNA-Expression von *RAD9A*, wurden hierbei vordergründig die Proben 1 h und 4 h nach Bestrahlung analysiert. Zur Auswertung wurden anschließend die Werte der behandelten Proben mit den jeweiligen der unbehandelten Proben verrechnet, und so die relative Expressionsänderung nach Bestrahlung ermittelt. Der statistische Vergleich (gepaarter Wilcoxon- bzw. Vorzeichentest) der Probandengruppen 2N und 1N ergab, dass drei Proteine, *RAD9A*, *GTBP/MSH6* und *GADD153/DDIT3*, Unterschiede in der Proteinexpression nach der 1 Gy Induktion zeigten (Abbildung 18-20).

- **RAD9A**

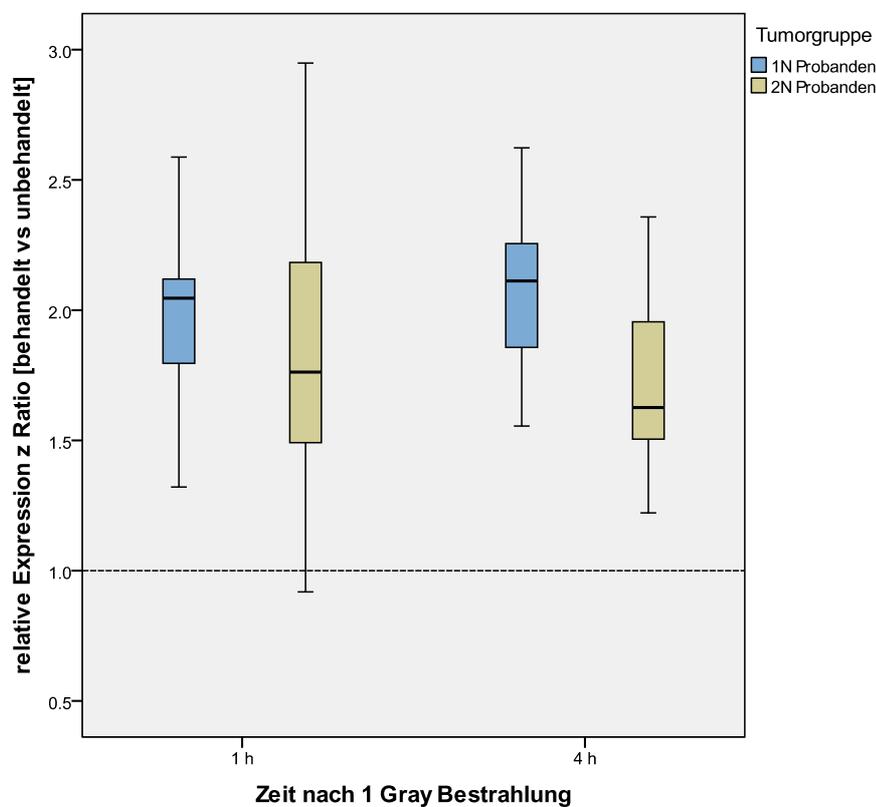


Abbildung 18: relative Änderung der nukleären Proteinexpression von *RAD9A* 1 h und 4 h nach 1 Gy Bestrahlung im Vergleich zur konstitutiven Expression für die 1N- und 2N-Gruppe, gemessen mittels Antikörper-Microarrays; normalisiert mit log₁₀-Transformation und Z Score Berechnung; Expressionsvergleich behandelt/unbehandelt mittels Z Ratio Berechnung; Es liegt ein deutlicher ($p < 0,05$) Unterschied 4 h (-1,44x; $p = 0,012$) nach Induktion zwischen den Gruppen vor.

Die Proteinexpression von RAD9A stieg im Zeitfenster bis 1 h nach der 1 Gy Bestrahlung der Zellen bei beiden Probandengruppen an. Für den Zeitpunkt 1 h nach Induktion (Abbildung 18) konnte bei beiden Gruppen verglichen mit den unbehandelten Zellen eine etwa zweifache RAD9A-Proteinmenge gemessen werden, wobei die 2N-Probanden hier eine geringere Expressionsänderung anzeigten. Für den Zeitpunkt 4 h nach der Bestrahlung konnte dann ein deutlicher Unterschied in der RAD9A-Proteinexpression zwischen den Probandengruppen detektiert werden. Bei den 2N-Probanden lag hier eine geringere RAD9A-Expressionsänderung im Vergleich mit den 1N-Probanden vor (-1,44x; $p=0,012$). In der Proteinexpressionsanalyse wurde zusammenfassend bei den 2N-Probanden eine deutlich niedrigere basale RAD9A-Proteinmenge detektiert und 4 h nach Bestrahlung eine deutlich geringere RAD9A-Proteinexpressionsveränderung.

- **GTBP/MSH6**

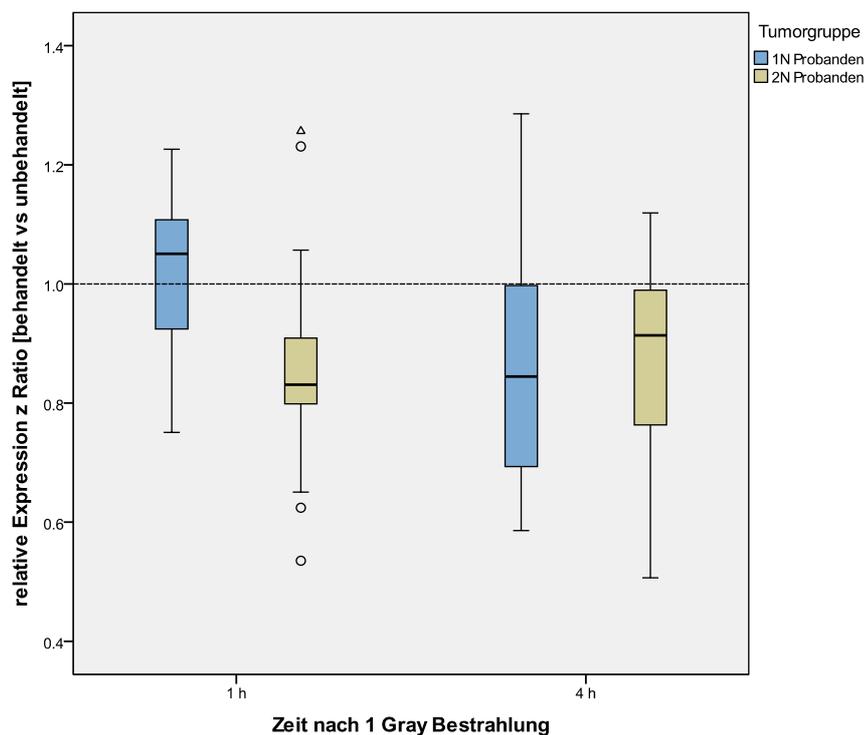


Abbildung 19: relative Änderung der nukleären Proteinexpression von GTBP/MSH6 1 h und 4 h nach 1 Gy Bestrahlung im Vergleich zur konstitutiven Expression für die 1N und 2N-Gruppe, gemessen mittels Antikörper- Microarrays; normalisiert mit log10-Transformation und Z Score Berechnung; Expressionsvergleich behandelt/unbehandelt mittels Z Ratio Berechnung; Es liegt ein deutlicher ($p<0,05$) Unterschied 1 h (-1,21x; $p=0,004$) nach Induktion zwischen den Gruppen vor. ° markiert Ausreißer und Δ extreme Ausreißer.

In Abbildung 19 ist die relative Änderung der nukleäre Proteinexpression von GTBP/MSH6 1 h und 4 h nach der 1 Gy Bestrahlung im Vergleich zur konstitutiven Expression für die 1N- und 2N-Gruppe dargestellt. Die 2N-Probanden zeigten hierbei für den Zeitpunkt 1 h nach der Induktion eine deutlich verringerte Proteinexpression von GTBP/MSH6 (-1,21x; $p=0,004$) im Vergleich zu den 1N-Probanden. Die zuvor in den unbehandelten 2N-Probandenzellen detektierte niedrigere GTBP/MSH6-Proteinexpression wurde durch die 1 Gy Bestrahlung verstärkt, aber nach 4 h konnte keine Expressionsveränderung und keine Unterschiede zwischen den beiden Probandengruppen mehr beobachtet werden.

- **GADD153/DDIT3**

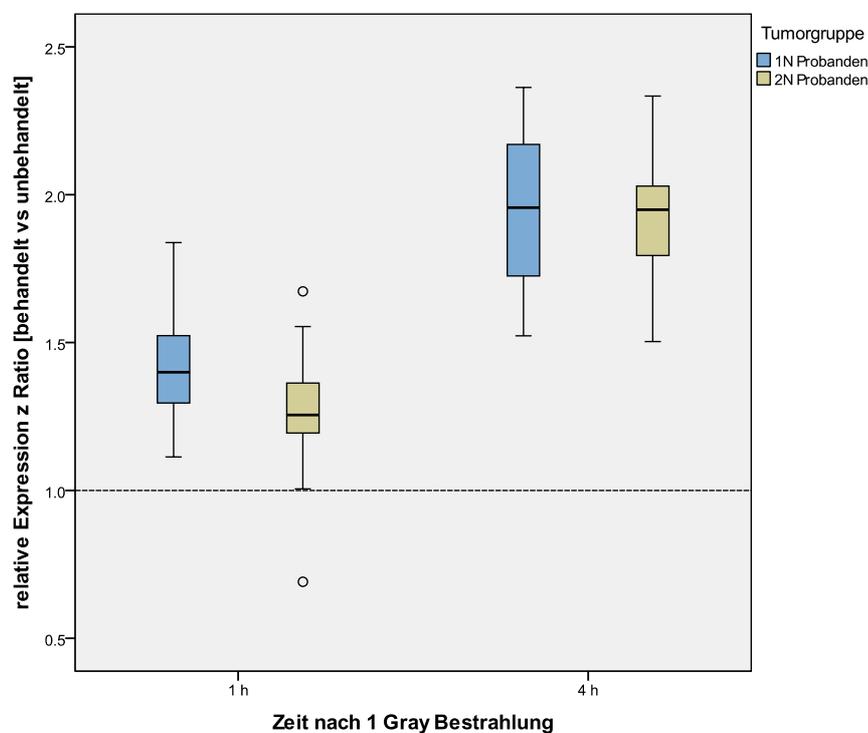


Abbildung 20: relative Änderung der nukleären Proteinexpression von GADD153/DDIT3 1 h und 4 h nach 1 Gy Bestrahlung im Vergleich zur konstitutiven Expression für die 1N- und 2N-Gruppe, gemessen mittels Antikörper-Microarrays; normalisiert mit log10-Transformation und Z Score Berechnung; Expressionsvergleich behandelt/unbehandelt mittels Z Ratio Berechnung; Es liegt ein deutlicher ($p<0,05$) Unterschied 1 h (-1,13x; $p=0,019$) nach Induktion zwischen den Gruppen vor. ° markiert Ausreißerwerte.

Die nukleäre Proteinmenge an GADD153/DDIT3 zeigte nach der 1 Gy Bestrahlung (Abbildung 20) einen Anstieg in den Zellen der beiden Probandengruppen 1N und 2N. Für den Zeitpunkt 1 h nach der Induktion konnte ein leichter, aber deutlicher Unterschied im zunehmenden GADD153/DDIT3 Proteinlevel zwischen der 2N- und der 1N-Gruppe detektiert werden, wobei die 2N-Probanden einen geringeren

GADD153/DDIT3-Proteinlevel (-1,13x; $p=0,019$) im Vergleich zu den 1N-Probanden aufwiesen. Später, 4 h nach der 1 Gy Bestrahlung, wurde bei beiden Gruppen ein ähnlich erhöhter (ca. zweifacher) GADD153/DDIT3-Proteinlevel gemessen.

3.1.4.2. Zwillingsvergleich

3.1.4.2.1. Proteinexpression in den uninduzierten Fibroblasten des 2N-Probanden KKR A24 im Vergleich zu seinem monozygoten gesunden Zwilling KKR D24

In einer separaten Auswertung wurde mit Hilfe der Antikörper-Microarrays die konstitutive Proteinexpression einiger DNA-Reparaturproteine in den Fibroblasten des 2N-Probanden (KKR A24) und seines monozygoten gesunden Zwillings (KKR D24) analysiert. Der Vergleich der nukleären Proteinexpression von KKR A24 und KKR D24 zeigte drei unterschiedlich exprimierte Gene, deren KKR A24 zu KKR D24 Expressionsverhältnisse in Abbildung 21 dargestellt sind. Für die Gene *BRCA1* und *ERCC1* fand sich hierbei eine etwas niedrigere Proteinexpression und für *ATM* eine leicht erhöhte Proteinexpression im 2N-Zwilling KKR A24 im Vergleich zu seinem monozygoten gesunden Zwillings KKR D24.

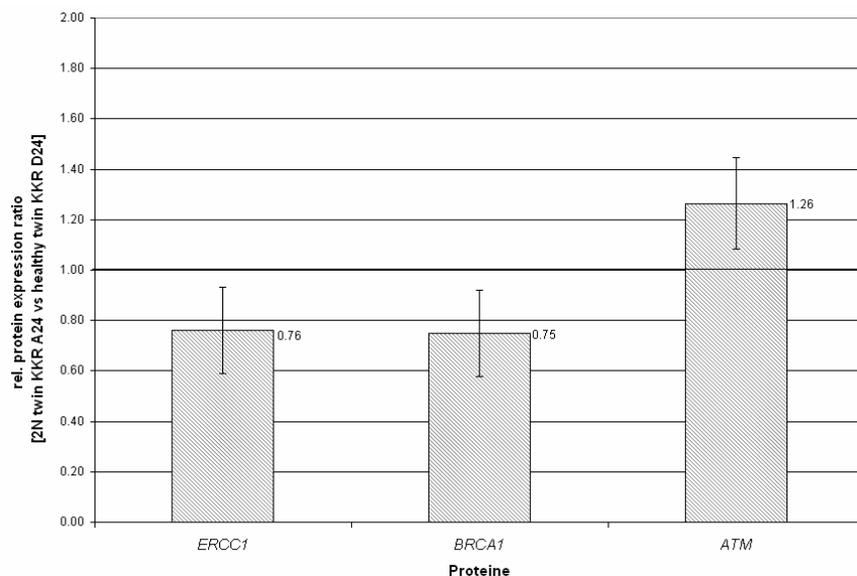


Abbildung 21: relative konstitutive nukleäre Proteinexpression in den Fibroblasten des 2N-Probanden (KKR A24) vs seinen monozygoten gesunden Zwilling (KKR D24); gemessen mittels Antikörper-Microarrays, normalisiert mit \log_{10} Transformation und Z Score Berechnung; Expressionsvergleich KKR A24/KKR D24 mittels Z Ratio Berechnung; Die Proteine, BRCA1, ERCC1 und ATM, zeigten Unterschiede in der Proteinexpression im Vergleich KKR A24 (2N) Proband zu KKR D24 (gesund) Zwilling.

3.1.4.2.2. Proteinexpression nach Induktion durch 1 Gy Bestrahlung in den Fibroblasten des 2N-Probanden KKR A24 im Vergleich zu seinem monozygoten gesunden Zwilling KKR D24

Auch für die Zwillinge wurde die nukleäre Proteinexpression nach Induktion durch 1 Gy Bestrahlung in deren Fibroblasten mittels Antikörper-Microarrays untersucht. Es wurden die Proben 1 h und 4 h nach Bestrahlung analysiert. Bei der Auswertung wurden die Werte der behandelten Proben mit den jeweiligen der unbehandelten Proben verrechnet, und so die relative Expressionsänderung nach Bestrahlung ermittelt. Unterschiede im Proteinlevel zwischen den Zwillingen zeigten hier interessanterweise wieder die drei Proteine BRCA1, ERCC1 und ATM, die schon beim Vergleich der konstitutiven Proteinexpression auffällig waren und deren Expressionsänderungen nach Bestrahlung in den folgenden Diagrammen (Abbildung 22-24) dargestellt sind. Gezeigt ist hier die relative Änderung der nukleäre Proteinexpression 1 h und 4 h nach 1 Gy Bestrahlung im Vergleich zur konstitutiven Expression in den Fibroblasten des jeweiligen Probanden.

- **BRCA1**

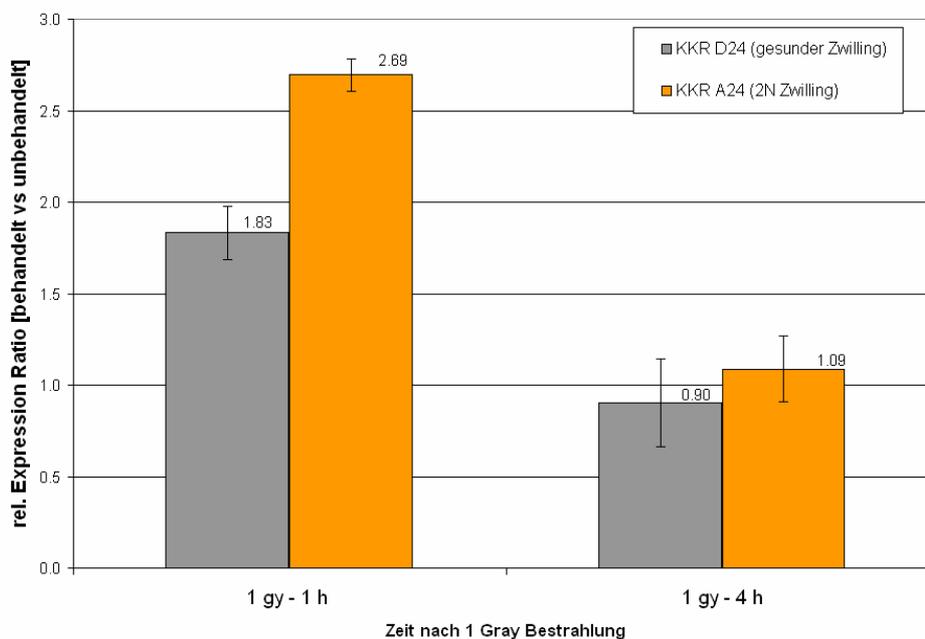


Abbildung 22: relative Änderung der nukleären Proteinexpression von BRCA1 1 h und 4 h nach 1 Gy Bestrahlung im Vergleich zur konstitutiven Expression in den Fibroblasten des 2N-Probanden (KKR A24) und seines monozygoten gesunden Zwilling (KKR D24), gemessen mittels Antikörper-Microarrays; normalisiert mit log10-Transformation und Z Score Berechnung; dargestellt ist der Expressionsvergleich behandelt/unbehandelt. 1 h nach der Bestrahlung zeigten die Zwillinge einen Unterschied in der Expressionsänderung.

Die in Abbildung 22 dargestellte Änderung der BRCA1-Proteinexpression ergab einen Unterschied zwischen den Zwillingen für den Zeitpunkt 1 h nach der 1 Gy Bestrahlung. Hier wurde bei dem 2N-Zwilling KKR A24 eine (etwa 2,7-fach) erhöhte Proteinexpression detektiert, wogegen der gesunde Zwilling KKR D24 eine deutlich geringere (etwa 1,8-fache) Erhöhung des Proteinlevels zeigte. Nach 4 h konnte für beide Zwillinge dann wieder eine BRCA1-Proteinmenge ähnlich dem konstitutiven Status gemessen werden. Die 1 h nach Bestrahlung detektierte, stärker hoch regulierte BRCA1-Proteinexpression des 2N-Zwilling unterstützt das Ergebnis des erhöhten *BRCA1*-mRNA-Expressionsniveaus in den Zellen des 2N-Zwilling 1 h nach Bestrahlung (Abbildung 12). Die erhöhte mRNA-Expression von *BRCA1* 4 h nach Bestrahlung beim 2N-Zwilling konnte nicht mit der BRCA1-Proteinexpression nach 4 h korreliert werden.

- **ERCC1**

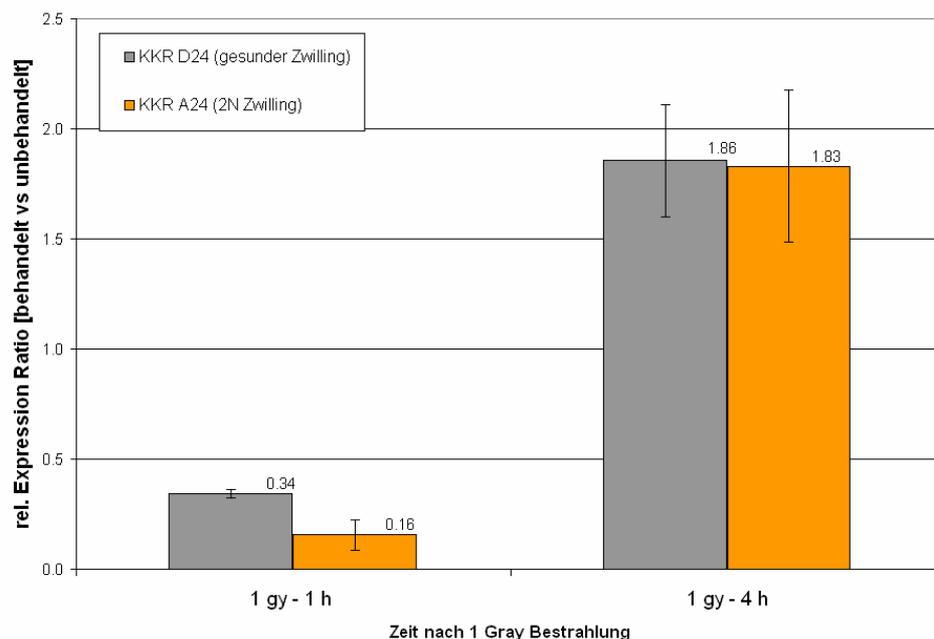


Abbildung 23: relative Änderung der nukleären Proteinexpression von ERCC1 1 h und 4 h nach 1 Gy Bestrahlung im Vergleich zur konstitutiven Expression in den Fibroblasten des 2N-Probanden (KKR A24) und seines monozygoten gesunden Zwilling (KKR D24), gemessen mittels Antikörper-Microarrays; normalisiert mit log₁₀-Transformation und Z Score Berechnung; dargestellt ist der Expressionsvergleich behandelt/unbehandelt. 1 h nach der Bestrahlung zeigten die Zwillinge einen Unterschied in der Expressionsänderung.

Die Regulation der nukleären Proteinexpression von ERCC1 (Abbildung 23) zeigte 1 h nach der 1 Gy Bestrahlung einen Unterschied zwischen dem 2N-Probanden KKR A24 und seinem gesunden Zwilling KKR D24. Zwar wurde die ERCC1-Expression 1 h nach Bestrahlung in den Zellen beider Zwillinge stark herunterreguliert, aber bei

dem 2N-Zwilling konnte ein etwa noch um die Hälfte niedrigeres ERCC1-Proteinexpressionsniveau detektiert werden. 4 h nach Bestrahlung wurde dann für beide Zwillinge eine etwa zweifach erhöhte Proteinexpression im Vergleich zum jeweiligen Ausgangsniveau gemessen.

- **ATM**

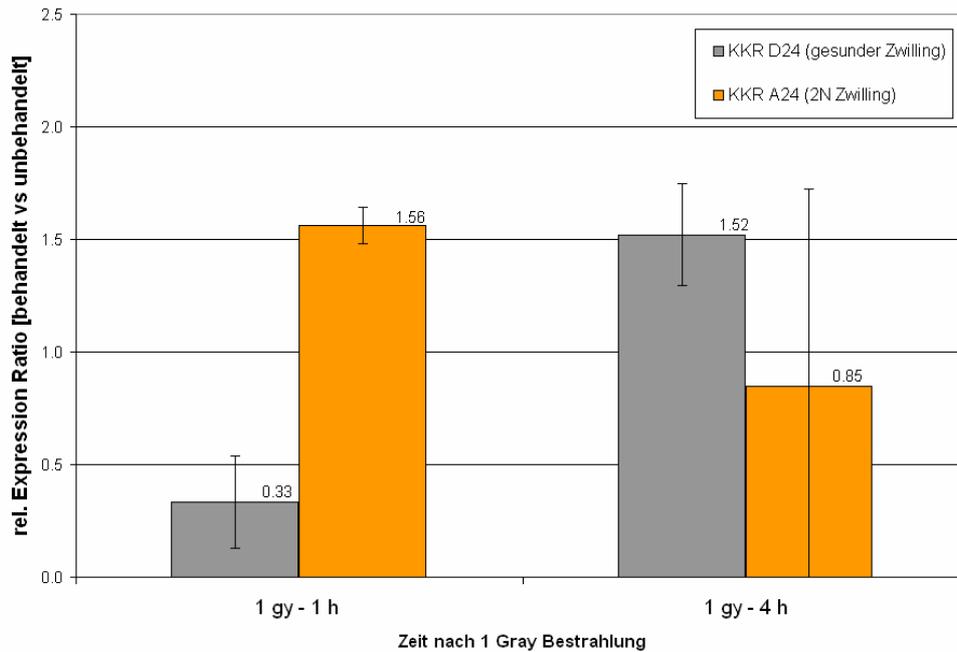


Abbildung 24: relative Änderung der nukleären Proteinexpression von ATM 1 h und 4 h nach 1 Gy Bestrahlung im Vergleich zur konstitutiven Expression in den Fibroblasten des 2N-Probanden (KKR A24) und seines monozygoten gesunden Zwilling (KKR D24), gemessen mittels Antikörper-Microarrays; normalisiert mit \log_{10} -Transformation und Z Score Berechnung; dargestellt ist der Expressionsvergleich behandelt/unbehandelt. 1 h nach der Bestrahlung zeigten die Zwillinge einen Unterschied in der Expressionsänderung.

Für die nukleäre Proteinexpression von ATM (Abbildung 24) wurde zum Zeitpunkt 1 h nach der 1 Gy Bestrahlung ein großer Unterschied zwischen den Zwillingen festgestellt. Hier zeigten die Zwillinge entgegengesetzte Regulationsrichtungen nach Bestrahlung. Für den 2N-Zwilling KKR A24 wurde bei 1 h eine leichte Erhöhung der ATM-Proteinexpression detektiert, wohingegen beim gesunden Zwilling KKR D24 eine starke Reduktion des ATM-Proteinlevels gemessen wurde. Wegen der großen Schwankung in der ATM-Proteinmessung für den 4 h Zeitpunkt beim 2N-Zwilling konnte hier keine Aussage über die vergleichende Proteinexpression bei den Zwillingen gemacht werden.

3.2. Methylierungsanalysen

3.2.1. Methylierungsanalysen der uninduzierten Fibroblasten aller 1N- und 2N-Probanden einschließlich des monozygoten Zwillingspaars KKR A24 (2N) und KKR D24 (gesund)

Aufgrund der Annahme, dass Methylierungsstörungen von Genen zur Krebsprädisposition beitragen, wurde die Promotormethylierung einiger, in der Literatur als krebsrelevant bekannter, sowie in unserer Studie auffälliger Gene mittels Bisulfit-Pyrosequenzierung untersucht. Für die Analyse wurden mehrere CpG-Dinukleotide in den regulatorischen Bereichen der Gene *FBN1*, *GABRB3*, *BRCA1*, *p53*, *p16*, *APC*, *RAD9A* und *EFNA5* in den unbehandelten Fibroblasten aller 1N- und 2N-Probanden der Studie und des außenstehenden Kontrollkollektivs in Zusammenarbeit mit dem Medizindoktoranden Marco Ludwig untersucht.

Die statistischen Vergleiche der Methylierungswerte der drei Gruppen ergaben, dass nur für das Gen *p16* (zwei CpG sites) ein deutlicher Unterschied in der Methylierung zwischen der 2N- und der 1N-Probandengruppe detektiert werden konnte. Hier zeigte (Abbildung 25) die 2N-Gruppe eine geringfügig niedrigere Methylierung im Vergleich zur 1N-Gruppe (ca. -0,5%, $p=0,004$). Bei beiden Gruppen wurde eine fast vollständige Hypomethylierung von *p16* detektiert; die 2N-Gruppe zeigte etwa 2% und die 1N-Gruppe etwa 2,5% Methylierung im Mittel (Median).

Die Gene *FBN1*, *GABRB3*, *BRCA1*, *p53*, *APC*, *RAD9A* und *EFNA5* zeigten im statistischen Gruppenvergleich keinen Unterschied im Methylierungsgrad des untersuchten regulatorischen Bereichs.

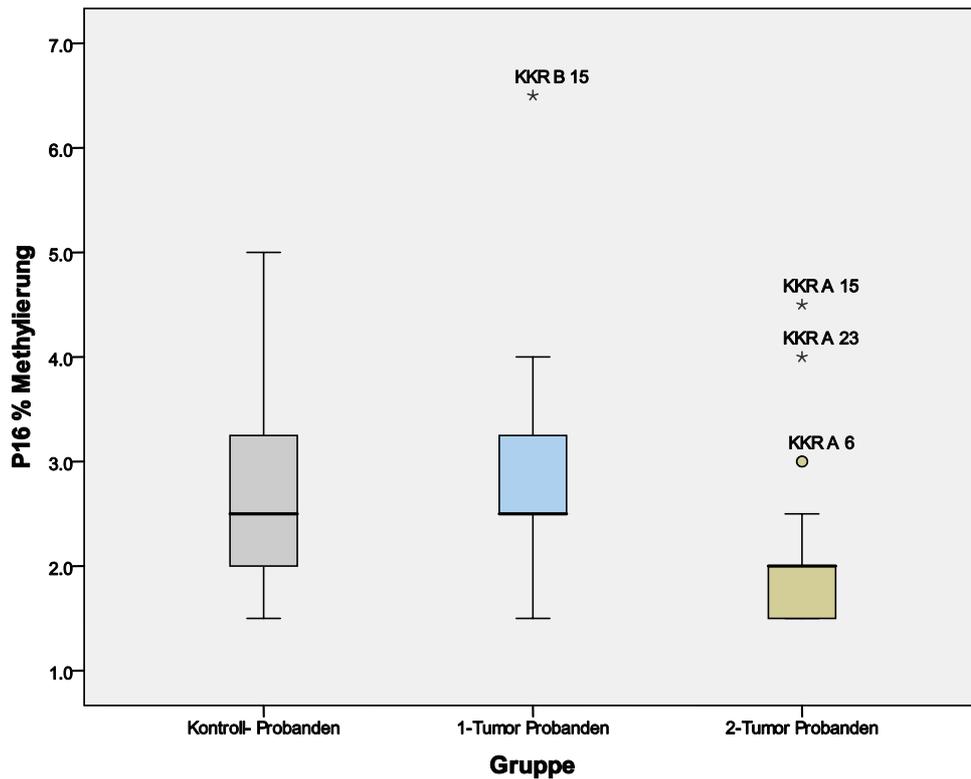


Abbildung 25: Prozentuale Methylierung des Gens *p16* (2 CpG sites) bei den 2N-Probanden, 1N-Probanden und dem Kontrollkollektiv. Für das Gen *p16* fand sich ein deutlicher Unterschied in der Methylierung zwischen der 2N- und der 1N-Probandengruppe. Die 2N-Gruppe zeigte eine geringfügig niedrigere Methylierung im Vergleich zur 1N-Gruppe (ca. -0,5%, $p=0,004$).

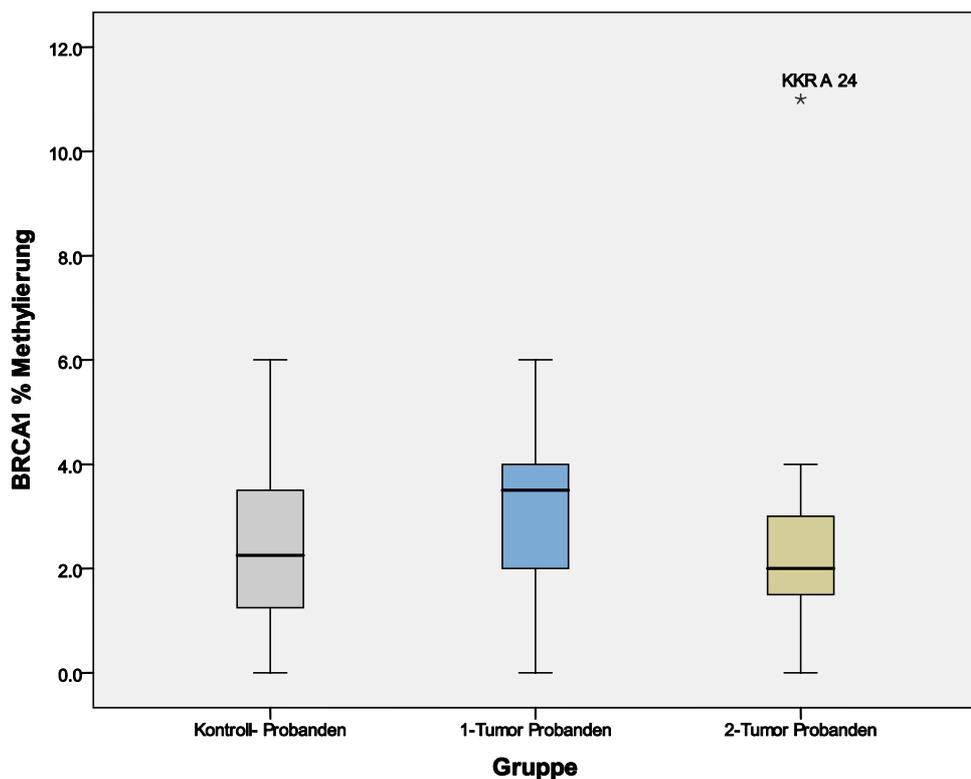


Abbildung 26: Prozentuale Methylierung des Gens *BRCA1* (2 CpG sites) bei den 2N-Probanden, 1N-Probanden und dem Kontrollkollektiv. Im Vergleich mit allen anderen Proben zeigte der 2N-Zwilling KKR A24 eine auffällig erhöhte Methylierung von ca. 10%.

Bei der Methylierungsanalyse von *BRCA1* (zwei CpG sites) fand sich unter den sonst nahezu vollständig hypomethylierten Proben ein auffälliger 2N-Proband mit einer erhöhten Methylierung von ca. 10% (Abbildung 26). Hierbei handelte es sich um den 2N-Zwilling KKR A24. Dieser erhöhte *BRCA1*-Methylierungsgrad konnte anschließend in mehreren Wiederholungen und zusätzlich mit klassischer Bisulfit-Sequenzierung bestätigt werden. Die Ergebnisse der klassischen Bisulfit-Sequenzierung, die von Tamara Hansmann (Humangenetik, Biozentrum Würzburg) durchgeführt wurde, zeigten, dass nur 90% der Allele hypomethyliert und daneben ca. 10% komplett hypermethyliert vorlagen.

3.2.2. *BRCA1*-Methylierungsanalyse nach Induktion durch 1 Gy Bestrahlung in den Fibroblasten des 2N-Probanden KKR A24 im Vergleich zu seinem monozygoten gesunden Zwilling KKR D24

Um auszuschließen, dass die 10% erhöhte *BRCA1*-Methylierung des 2N-Zwillings KKR A24 nichts mit einer Strahlenexposition (angewendet zum Bsp. in der Krebstherapie) zu tun hat, wurde die *BRCA1*-Methylierung nach Induktion durch 1 Gy Bestrahlung in den Fibroblasten des 2N-Probanden KKR A24 im Vergleich zu seinem monozygoten gesunden Zwilling KKR D24 untersucht. Die Untersuchung wurde in Zusammenarbeit mit Tamara Hansmann (Humangenetik, Biozentrum Würzburg) durchgeführt. Es wurden mittels Bisulfit-Pyrosequenzierung diesmal fünf CpG-Dinukleotide im *BRCA1*-Promotor analysiert. Untersucht wurden die unbehandelten Fibroblasten und die Fibroblasten 1 h, 4 h, 12 h und 24 h nach 1 Gy Bestrahlung der beiden Zwillinge. Die Messungen wurden zweimal durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 27 dargestellt. Die *BRCA1*-Methylierung lag beim gesunden Zwilling KKR D24 in den unbehandelten Zellen zwischen 0-5% und veränderte sich nach der Bestrahlung nicht. Alle Proben zeigten ähnliche Werte. Bei den unbehandelten Zellen des 2N-Zwillings KKR A24 konnte wieder eine *BRCA1*-Methylierung von ca. 10% detektiert werden. Nach der 1 Gy Bestrahlung wurde in allen Proben des 2N-Zwillings eine etwa 10%ige *BRCA1*-Methylierung gemessen.

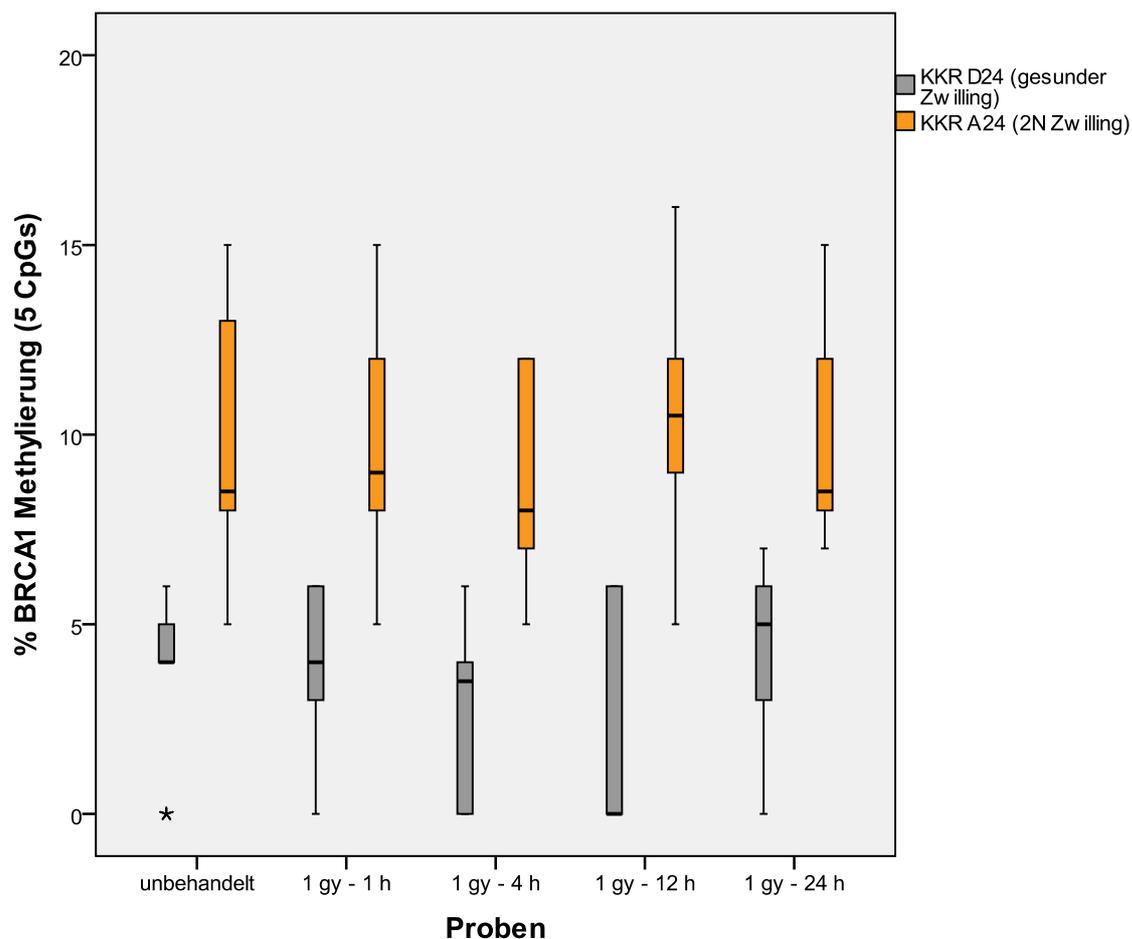


Abbildung 27: Prozentuale *BRCA1*-Methylierung (5 CpG sites) in den unbehandelten Fibroblasten und in den Fibroblasten 1 h, 4 h, 12 h, 24 h nach 1 Gy Bestrahlung für beide Zwillinge, den 2N-Probanden KKR A24 und seinen monozygoten gesunden Zwilling KKR D24.

3.3. γ H2AX-DNA-Reparaturdetektion nach Induktion

Mit Hilfe eines anti- γ H2AX-Immunfluoreszenz-Assays, welcher zur Quantifizierung von DNA-Doppelstrangbrüchen und auch bedingt zur Detektion von Einzelstrangbrüchen geeignet ist, und einem halbautomatisierten γ H2AX-Foci-Zählverfahren wurde die Reparaturkinetik und Kapazität nach Induktion von DNA-Schäden (durch ionisierende Strahlung, UV-C Strahlung und Chemotherapeutika) in den primären Fibroblastenzellkulturen der Patienten untersucht. Die Behandlung der Zellen wurde bei subkonfluenter Zelldichte durchgeführt.

3.3.1. Radioaktive Bestrahlung

3.3.1.1. Etablierung und Vorversuche zur halbautomatisierten Auswertung mit der Metafer 4 Software (Metasystems)

Zur Etablierung der γ H2AX-Foci-Zählung in den Zellkernen wurden Vorversuche mit verschiedenen radioaktiven Bestrahlungsstärken von 1-6 Gy durchgeführt und Zeitpunkte von 30 min bis 24 h nach der Bestrahlung ausgewertet. In diesen Vorversuchen wurden Kontrollfibroblastenzelllinien verwendet. Die Bildaufnahmen der Zellkerne in den verschiedenen Farbstoffkanälen erfolgten automatisch und bei konstanten, angepassten Belichtungszeiten in 63-facher Vergrößerung. Es wurde manuell und halbautomatisiert mit Hilfe der Metafer 4 Software (Metasystems) die mittlere Foci-Zahl pro Zellkern in mindestens 50 Zellen ermittelt. Wir bezeichneten dieses Auswertungsverfahren als halbautomatisiert, weil zu Beginn der Auszählung aufgenommene, aber nicht auswertbare, beispielsweise über- oder unterbelichtete Zellen, nicht in die Auszählung einfließen. Der Vergleich der mittleren Foci-Zahl pro Zellkern ergab, dass bei der manuellen Auszählung mehr Foci pro Zellkern (Faktor 1,3) gezählt wurden als bei der halbautomatisierten Auswertung. Da dieser Fehlerfaktor bei geringen Foci-Zahlen (<40 Foci pro Zellkern) konstant blieb, wurde die halbautomatisierte Auszählung für geringe Foci-Zahlen als reproduzierbar und stabil bewertet. Bei mehr als 40 Foci pro Zellkern war es bei 63-facher Vergrößerung von der Auflösung her nicht mehr möglich, valide Foci-Zahlen bei der halbautomatisierten Zählung zu erhalten. Abhängig vom Zeitpunkt nach der Bestrahlung war es aufgrund der hohen Foci-Zahl bei frühen Zeitpunkten (30 min) nach Bestrahlung nur möglich, bei 1 Gy Bestrahlungsstärke eine halbautomatisierte Auswertung durchzuführen. Um höhere Foci-Zahlen (>40 Foci pro Zellkern) automatisiert auszählen zu lassen, bedarf es eines Überlappungsfilters oder einer höheren Auflösung (>63x). Aufgrund dieser Vorversuche wurde entschieden, die γ H2AX-Foci-Analyse der 2N-Probanden nach einer Bestrahlung mit 1 Gy durchzuführen und die Zeiten 30 min, 4 h und 24 h nach Bestrahlung mittels halbautomatisierter Foci-Zählung auszuwerten.

3.3.1.2. γ H2AX-Foci-Zählung 30 min, 4 h und 24 h nach 1 Gy Bestrahlung in den Fibroblasten von sechs Kontrollen und allen 2N-Probanden

Für die Untersuchung der DNA-Reparaturkinetik der 2N-Probanden wurden DNA-Schäden in den die Fibroblastenzellkulturen aller 2N-Probanden und von sechs Kontrollen mittels 1 Gy radioaktiver Bestrahlung induziert. Um die Reparaturkinetik und Reparaturfähigkeit der Zellen nach Behandlung miteinander zu vergleichen, wurde der Immunfluoreszenz-Assay zum Nachweis von γ H2AX-Foci im Zellkern eingesetzt. Der DNA-Reparaturverlauf wurde mittels halbautomatisierter γ H2AX-Foci-Zählung (Metafer 4 Software) vor Induktion und für die Zeiten 30 min, 4 h, 24 h nach der Behandlung in mehreren Versuchen aufgezeichnet (Bsp. siehe Abbildung 28).

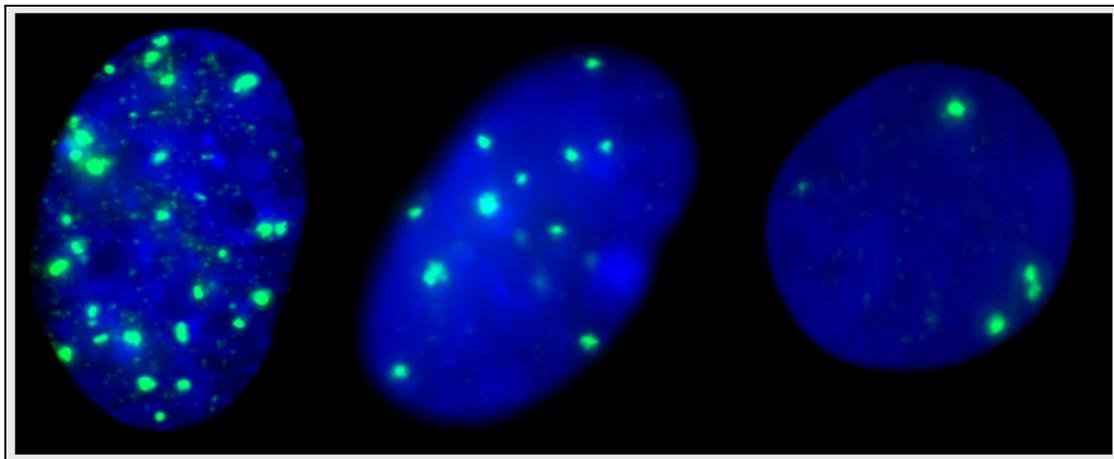


Abbildung 28: Anti- γ H2AX-Immunfluoreszenz-Färbung von primären Fibroblastenzellen 30 min, 4 h und 24 h nach 1 Gy Bestrahlung. γ H2AX-Foci-Detektion mit einem Fluorescein-konjugierten zweiten Antikörper (Grün) und Zellkerngegenfärbung mit DAPI (Blau).

Es wurden für jede Probe die Foci in über 100 Zellkernen ausgezählt und der Mittelwert berechnet. Bei den frühen Zeitpunkten werden die Foci als DNA-Strangbrüche, die für die Reparatur prozessiert werden (positiv) und bei den späten Zeitpunkten als nicht reparierte Schäden (negativ). Die Ergebnisse sind in der nachfolgenden Graphik (Abbildung 29) dargestellt. Die Werte der sechs Kontrollzelllinien sind als Mittelwert zusammengefasst und die 2. Standardabweichung wurde zum Vergleich der Daten herangezogen. Eine erste Auswertung ergab für wenige Proben leichte (± 1 Foci) von der 2. Standardabweichung abweichende Unterschiede in den Mittelwerten. Nach einer statistischen Datenanalyse (durch Hr. Berres, IMBEI) der Foci-Mittelwerte als auch der Verteilung aller Einzelwerte konnten keine deutlichen Unterschiede zwischen den 2N-Probanden und den Kontrollen ausgemacht werden.

Alle 2N-Probanden zeigten bei dieser Messung wie die Kontrollen ein normales Reparaturverhalten für DNA-Doppelstrangbrüche, was man an den erst hohen, aber mit der Zeit zurückgehenden Foci-Zahlen erkennen kann (30 min - ca. 28 Foci; 4 h - ca. 11 Foci; 24 h - ca. 4 Foci; unbehandelt - ca. 4 Foci).

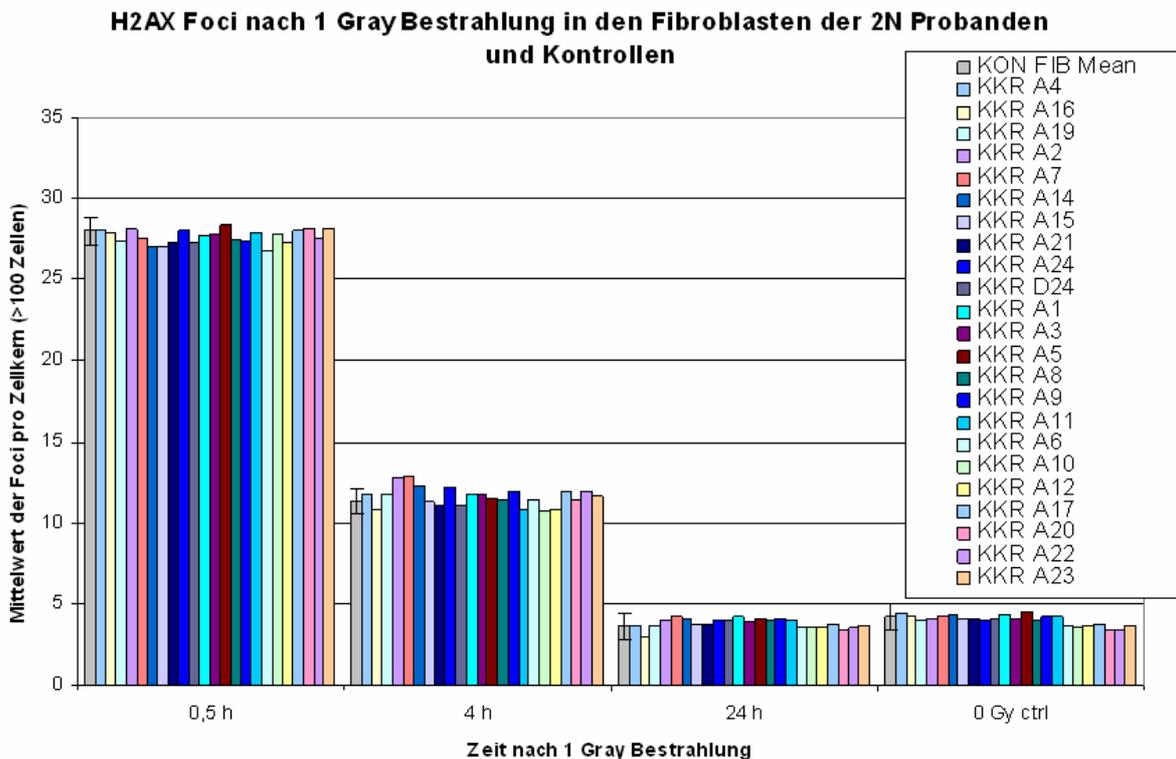


Abbildung 29: Mittelwerte der γ H2AX-Focizahl pro Zellkern, gezählt in über 100 Zellkernen je Proband, vor Induktion und für die Zeiten 30 min, 4 h und 24 h nach 1 Gy Bestrahlung. Alle 2N-Probanden und sechs Kontrollen wurden ausgewertet und mit den sechs Kontrollen und der 2. Standardabweichung verglichen. Es konnte keine deutlichen Unterschiede zwischen den 2N-Probanden und den Kontrollen festgestellt werden.

3.3.2. Andere Noxen im Pilotexperiment

Nachdem die DNA-Reparatur der Zelllinien der 2N-Probanden nach radioaktiver Bestrahlung keine deutlichen Unterschiede gezeigt hatte, wurden als Pilot-Experimente andere Noxen wie UV-C-Bestrahlung und Daunorubicin-Behandlung, zur Induktion weiterer DNA-Reparatursysteme anhand der Zelllinien des monozygoten Zwillingspaars KKR A24 und KKR D24 getestet. Um die Reparaturkinetik und Reparaturfähigkeit der Fibroblastenzellkulturen nach Behandlung des gesunden und des 2N-Zwilling miteinander zu vergleichen, wurde wieder der Immunfluoreszenz-Assay zum Nachweis von γ H2AX-Foci im Zellkern eingesetzt.

3.3.2.1. γ H2AX-Foci-Zählung 30 min, 4 h, 12 h und 24 h nach UV-C-Bestrahlung (20 J/m^2) in Fibroblasten des 2N-Probanden KKR A24 und seines monozygoten gesunden Zwillings KKR D24

Zuerst wurde das Reparaturverhalten nach DNA-Schädigung durch UV-C-Bestrahlung (20 J/m^2) in den Fibroblastenzellen des 2N-Probanden KKR A24 und seines monozygoten gesunden Zwillings KKR D24 in mehreren (mind. zwei) Versuchen erprobt. Mit Hilfe des anti- γ H2AX-Immunfluoreszenz-Assays und der halbautomatisierten γ H2AX-Foci-Zählung (Metafer 4 Software) wurden hierzu Proben vor der Induktion und für die Zeiten 30 min, 4 h, 12 h, 24 h nach der Behandlung analysiert. Bei dieser Auswertung wurden die Foci in etwa 200 Zellkernen pro Probe ausgezählt und der Mittelwert berechnet. Die Ergebnisse aller Versuche sind in Abbildung 30 dargestellt.

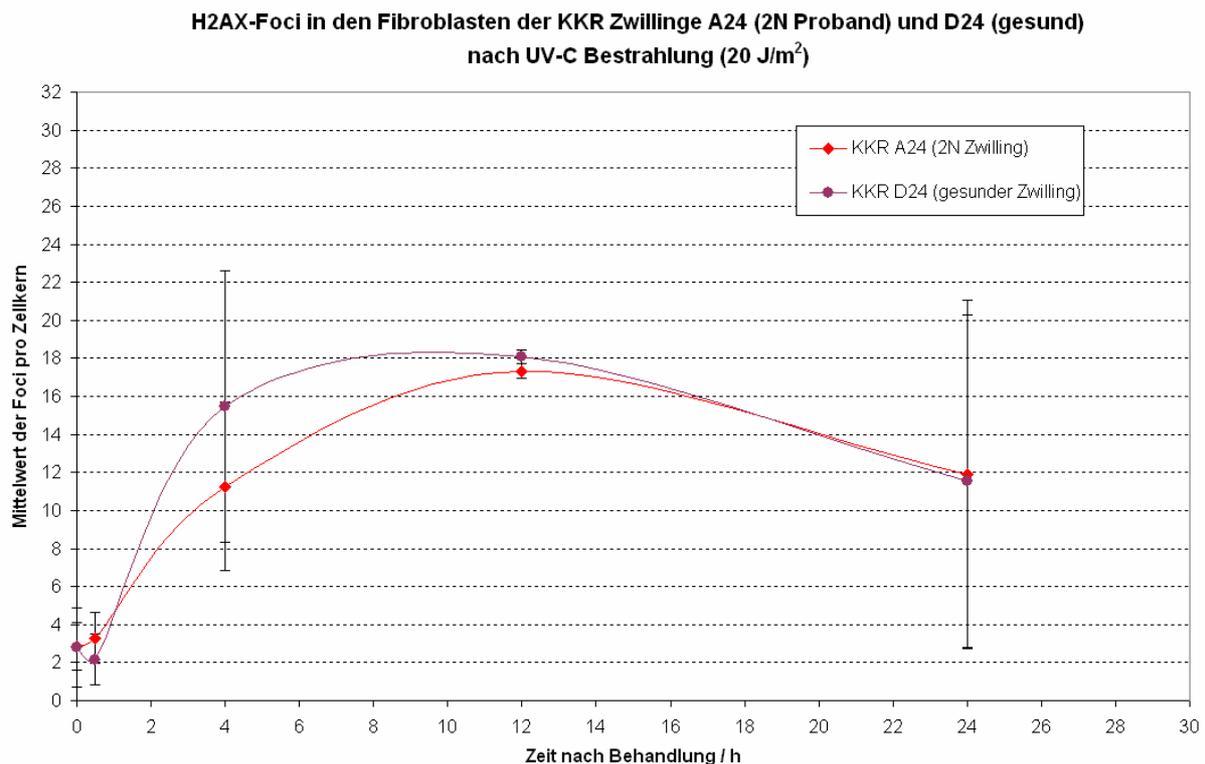


Abbildung 30: Mittelwerte der γ H2AX-Foci (pro Analyse ca. 200 Zellkerne ausgewertet) nach UV-C-Bestrahlung (20 J/m^2) der Fibroblastenzellkulturen des gesunden (KKR D24) und des zweifach an Krebs erkrankten Zwillings (KKR A24).

Für die Zeitpunkte vor Induktion und 30 min nach der UV-C-Bestrahlung wurden niedrige (ca. drei Foci pro Zellkern), sehr ähnliche Foci-Mittelwert für beide Zwillinge detektiert. 4 h nach UV-C-Bestrahlung zeigten sich für beide Zwillinge erhöhte Foci-

Zahlen mit größeren Unterschieden in den Foci-Mittelwerten. Es wurden beim gesunden Zwilling KKR D24 im Mittel ca. vier Foci mehr als beim 2N-Zwilling KKR A24 gemessen, allerdings bei einer sehr hohen Schwankung der Messwerte zwischen den Versuchen. Beide Zwillinge zeigten nach 12 h immer noch erhöhte, aber wieder sehr ähnliche Foci-Mittelwerte (ca. 17/18). 24 h nach Bestrahlung konnten immer noch leicht erhöhte, ähnliche Foci-Mittelwerte (ca. 12), allerdings wieder mit einer hohen Messungenauigkeit behaftet, für beide Zwillinge festgestellt werden.

3.3.2.2. γ H2AX-Foci-Zählung 1 h, 4 h, 12 h und 24 h nach Daunorubicin (3 μ M, 2 h) -Behandlung der Fibroblasten des 2N-Probanden KKR A24 und seines monozygoten gesunden Zwillings KKR D24

Im Weiteren wurden die Fibroblastenzellen des 2N-Probanden KKR A24 und seines monozygoten gesunden Zwillings KKR D24 mit Daunorubicin (3 μ M, 2 h), einem zur Krebstherapie verwendeten Chemotherapeutikum, behandelt und wieder mittels anti- γ H2AX-Immunfluoreszenz-Assay und halbautomatisierter γ H2AX-Foci-Zählung (Metafer 4 Software) ausgewertet. Es wurden mehrere (mind. zwei) Versuche durchgeführt und Proben vor der Induktion und für die Zeiten 30 min, 4 h, 12 h, 24 h nach der Behandlung analysiert. Zur Auswertung wurden die Foci wieder in etwa 200 Zellkernen pro Probandenprobe ausgezählt und der Mittelwert berechnet. Die Ergebnisse aller Versuche sind in Abbildung 31 dargestellt.

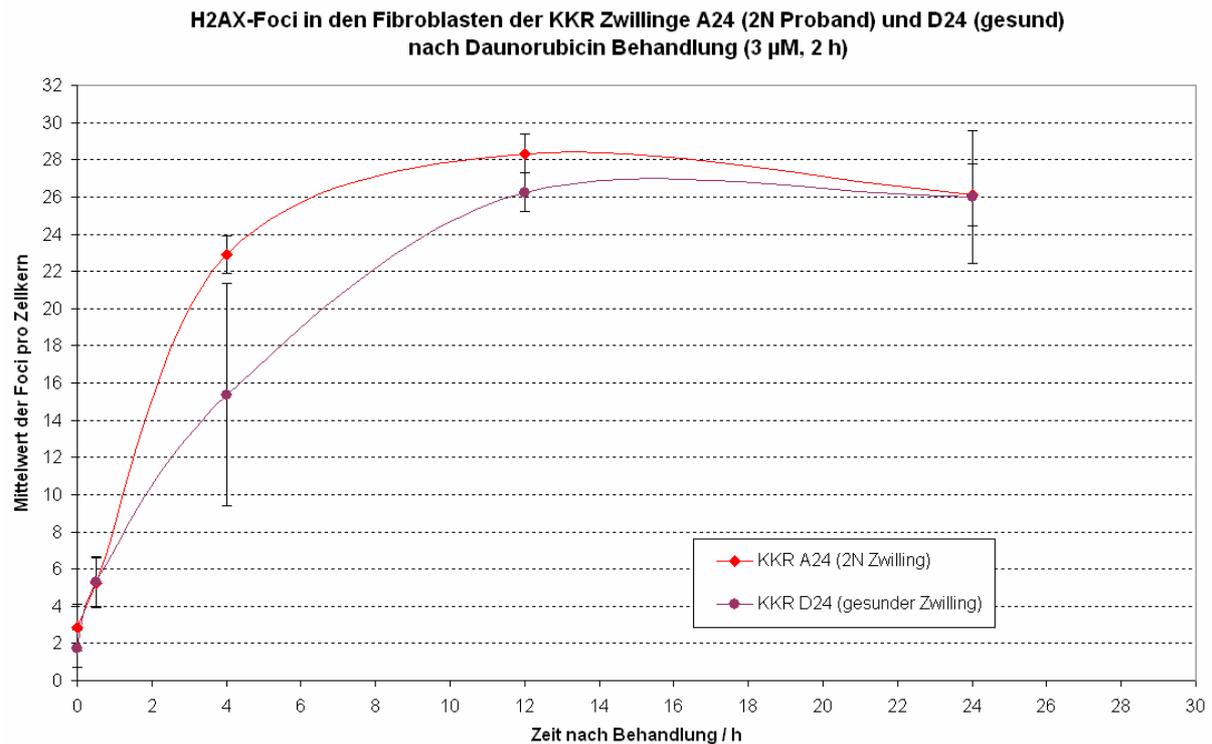


Abbildung 31: Mittelwerte der γ H2AX-Foci (pro Analyse ca. 200 Zellkerne ausgewertet) nach Daunorubicin-Behandlung (3 μ M, 2 h) der Fibroblastenzellkulturen des gesunden (KKR D24) und des zweifach an Krebs erkrankten Zwilling (KKR A24).

Auch hier fand sich vor Induktion und zum Zeitpunkt 30 min nach Behandlung keine erhöhten, sondern annähernd gleiche Foci-Zahlen bei beiden Zwillingen. Nach 4 h zeigten dann beide Zwillinge einen Anstieg der Foci im Zellkern, wobei der 2N-Zwilling eine deutlich höhere Anzahl, ca. acht Foci mehr, als der gesunde Zwilling aufwies. Hierbei lag allerdings eine hohe Schwankung der Messwerte zwischen den Versuchen vor. Später, nach 12 h und auch nach 24 h, wurde eine ähnlich hohe, gleichbleibende Foci-Zahl von ca. 26-28 Foci bei beiden Zwillingen detektiert.

3.4. Genkopienzahlanalysen

3.4.1. SNP-Array-Screening der unbehandelten Fibroblasten-DNA aller 1N- und 2N-Probanden einschließlich des monozygoten Zwillingspaars KKR A24 (2N) und KKR D24 (gesund)

Da auch zytogenetisch kryptische Deletionen und Duplikationen der DNA eine Rolle bei der Krebsentstehung spielen können, indem sie z. Bsp. die Expression von DNA-Reparaturgenen verändern und/oder die Reparaturleistung modulieren, wurde ein genomweites Screening mittels SNP-Arrays vorgenommen. Hierzu wurde die geno-

mische DNA aus den unbehandelten Fibroblasten aller 2N- und 1N-Probanden einschließlich des monozygoten Zwillingspaars KKR A24 (2N) und KKR D24 (gesund) mit dem Affymetrix SNP Array 6.0 untersucht. Die SNP-Array-Analysen wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Tanja Zeller (II. Med. Klinik, Universitätsmedizin Mainz) durchgeführt. Zum Abgleich der Daten und für die anschließende Beurteilung der Ergebnisse standen ein größeres zusätzliches Kollektiv an gesunden Kontrollen und verschiedene Datenbanken zur Verfügung.

In dieser Analyse konnte kein genereller Unterschied zwischen den 2N-Probanden und den 1N-Probanden festgestellt werden. Jeder einzelne Patient zeigte ein individuelles Muster an Genkopienzahlvariationen (Copy number variations, CNVs). Nur sehr wenige Gene mit CNVs konnten in mehr als zwei Probanden detektiert werden. In wieweit diese individuellen Deletionen und Duplikationen bestimmter Gene und genomischer Bereiche jedes einzelnen Probanden eine tatsächliche Rolle bei der jeweiligen Krebsentstehung spielten, konnte nicht festgestellt werden.

3.4.2. Pilotexperimente zur Validierung der SNP-Array-Ergebnisse mittels FISH und genomischer quantitativer PCR (mit SYBR Green)

Für einzelne Probanden wurde versucht, auffällige, möglicherweise krankheitsrelevante Deletionen oder Duplikationen aus dem SNP-Array-Screening in Pilotexperimenten mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) und genomischer quantitativer PCR mit SYBR Green-Detektion zu verifizieren (Übersicht Tabelle 13). Die Durchführung der Experimente zur Validierung der SNP-Array-Ergebnisse erfolgte in Zusammenarbeit mit Miriam Grunow im Rahmen ihrer Bachelorarbeit (Details siehe Bachelorarbeit Miriam Grunow). Bei den 2N-Probanden KKR A6, A7, A10, A16 und dem Zwillingspaar KKR A24 (2N-Patient) und KKR D24 (gesund) wurden hierzu ausgewählte CNVs überprüft.

Bei Patient KKR A6 wurde die im SNP-Array detektierte heterozygote Duplikation von ca. 797 kb Länge im Bereich 16p13.11 untersucht. Der duplizierte Bereich enthielt insgesamt zehn Gene und begann mit dem teilweise duplizierten Gen *MPV17L* und endete mit dem teilweise duplizierten Gen *ABCC6*. Der Patient KKR A7 zeigte im SNP-Array eine heterozygote Duplikation im Bereich 2q31.2, die eine Länge von ca. 96 kb aufwies, welche überprüft wurde. Hierbei waren keine Gene direkt betroffen, aber die zwei Gene *SESTD1* und *ZNF385B* lagen unmittelbarer Nähe. Beim Patien-

ten KKR A10 wurde im Zentromerbereich des Chromosoms 2 eine ca. 431 kb große heterozygote Duplikation untersucht, welche die Gene *TEKT4* und *MAL* komplett dupliziert sowie *MRPS5* teilweise dupliziert enthielt. Für den Patienten KKR A12 wurde eine heterozygote Duplikation von ca. 167 kb Länge im Bereich 19q13.41 validiert. Betroffen waren hier fünf Gene für Zinkfingerproteine, wovon die Gene *ZNF578* und *ZNF83* nur teilweise dupliziert vorlagen. Bei Patient KKR A16 wurde eine heterozygote Deletion im Bereich 2q32.1 von ca. 105 kb Länge untersucht. Im deletierten Bereich, der sich zwischen den Genen *FSIP2* und *ZC3H15* befand, lagen keine Gene. Bei dem 2N-Zwilling KKR A24 wurde im Vergleich zum gesunden Zwilling KKR D24 eine heterozygote Deletion von ca. 184 kb im Bereich 6q22.33 im SNP-Array detektiert. Das hier teilweise deletierte Gen *RSPO3* wurde für die Zwillinge verifiziert. Dieser Ausschnitt der SNP-Array-Analyse für die Zwillinge KKR A24 (blau) und KKR D24 (grün) ist in Abbildung 32 dargestellt.

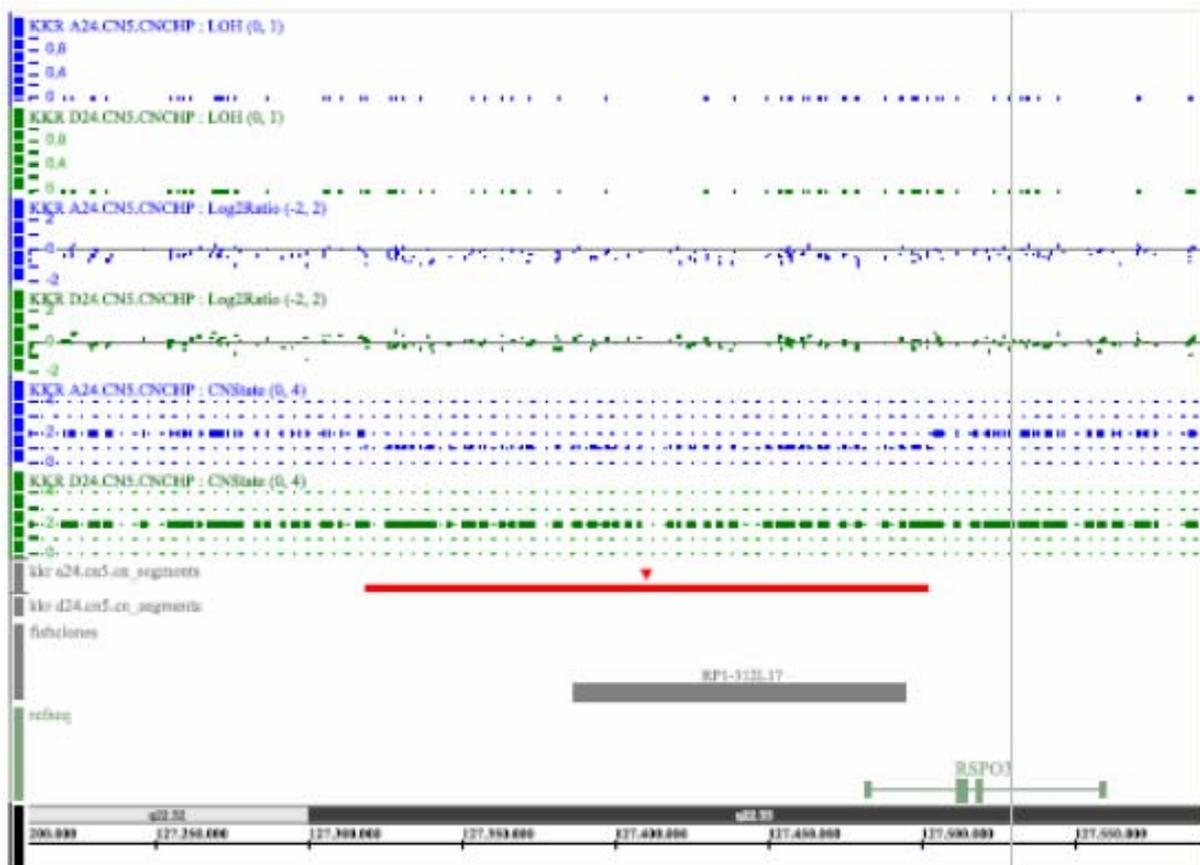


Abbildung 32: SNP-Array-Analyse der Zwillinge KKR A24 (blau) und KKR D24 (grün). Gezeigt ist die Deletion (rot) auf Chromosom 6q22.33 des 2N-Zwilling KKR A24, das teilweise betroffene Gen *RSPO3* (grau-grün) und der BAC-Klon (grau) in dieser Region.

Die zur Validierung ausgewählten Ergebnisse der Genome-Wide Human SNP-Array-Analyse plus zugehöriger FISH- und genomischer qPCR-Ergebnisse sind zusammengefasst in Tabelle 13 dargestellt und werden im Folgenden näher erläutert.

Zuerst wurde die FISH für die Validierung durchgeführt. Für die duplizierten Bereiche bei KKR A6 und A10 und den deletierten Bereich des Probanden KKR A24 standen geeignete BAC-Klone zur Verfügung, sodass hier eine Analyse mittels FISH gemacht werden konnte. Für die anderen Bereiche standen leider keine oder keine geeigneten BACs zur Verfügung. Die untersuchten Duplikationen konnten mit FISH nicht bestätigt werden. Es wurden zwar zwei unterschiedlich starke Signale auf den Metaphasenchromosomen festgestellt, was aber kein sicherer Beweis für eine Duplikation ist. Die Deletion bei 6q22.33 für KKR A24 konnte zunächst nicht nachgewiesen werden. Da bei der FISH Lymphozyten aus Blut verwendet wurden und der 2N-Proband KKR A24 eine Knochenmarkstransplantation erhalten hatte, war es nicht möglich, diese Deletion im Spendermaterial zu detektieren. Deshalb wurde die FISH an den Fibroblasten der Zwillinge für den Bereich 6q22.33 durch Herrn Dr. Nanda (Human-genetik, Biozentrum Würzburg) wiederholt. Hierbei zeigten im Vergleich zum gesunden Zwilling KKR D24 ca. 20% der Zellen von KKR A24 (2N) nur ein Signal, was auf ein mögliches Zellmosaik beim 2N-Zwilling hinweist.

Die FISH konnte nur in vier von sieben Fällen zur Validierung eingesetzt werden und lieferte nur in einem dieser vier Fälle eine erfolgreiche Verifizierung des SNP-Array-Ergebnisses; beim gesunden Zwilling KKR D24 konnte eine Deletion oder Duplikation ausgeschlossen werden. Insbesondere zum Nachweis von Duplikationen liefert die FISH zumeist kein eindeutig quantifizierbares Ergebnis. Für einige Bereiche, u. a. weil sie zu klein waren, standen keine geeigneten BAC-Klone zur Verfügung. Zudem mussten die Ergebnisse an den Lymphozyten zum Teil verworfen werden, da einige Patienten eine Knochenmarkstransplantation bekommen hatten. Zusammengefasst ist die FISH zur Validierung von SNP-Array-Ergebnissen nur bedingt geeignet.

Tabelle 13: Übersicht über die Ergebnisse der Validierung der Ergebnisse der Genome-Wide Human SNP Array-Analyse mittels FISH und genomischen qPCR (mit SYBR Green)

Patient	SNP-Array					FISH		qPCR
	Chromosomaler Lokus	Status	Position Start	Position End	Größe [kb]	BAC-Klon	Status	Status
KKR A6	16p13.11	Dupliziert	15406308	16203401	800	RP11-139D07	2 unterschiedlich starke Signale; kein Beweis für Duplikation	Dupliziert
KKR A7	2q31.2	Dupliziert	180140944	180236596	97	BAC zu groß	-	Nicht dupliziert
KKR A10	2 Zentromer	Dupliziert	95326260	95757721	431	RP11-327M19	2 unterschiedlich starke Signale; kein Beweis für Duplikation	Dupliziert
KKR A12	19q13.41	Dupliziert	57661891	57829395	168	kein BAC	-	Dupliziert
KKR A16	2q32.1	Heterozygot deletiert	186556015	186661569	106	BAC zu groß	-	Deletiert
KKR A24	6q22.33	Heterozygot deletiert	127318574	127502284	184	RP1-312L17	20% der Zellen zeigten nur 1 Signal; möglicherweise Mosaik-Deletion	leicht erniedrigter Wert (0,7-0,8); möglicherweise Mosaik-Deletion
KKR D24 ctrl	6q22.33	keine CNV	127318574	127502284	184	RP1-312L17	keine CNV	keine CNV

Im Weiteren wurden alle sechs CNVs der ausgewählten Probanden mittels genomischer qPCR mit SYBR Green-Detektion validiert. Hierbei konnten fast alle Resultate der SNP-Array-Analyse bestätigt werden. Die Duplikation bei 2q31.2 konnte für den Probanden KKR A7 nicht nachgewiesen werden. Auch für den 2N-Zwilling KKR A24 konnte die qPCR die im SNP-Array detektierte Deletion bei 6q22.33 nicht bestätigen. KKR A24 zeigte allerdings im Vergleich zum gesunden Zwilling KKR D24 und weiteren Kontrollen einen leicht erniedrigten Wert für den deletierten Bereich (Promotor und Exon 1) des Gens *RSPO3*, was einen Hinweis auf eine im Mosaik vorhandene heterozygote Deletion darstellen könnte.

Die genomische qPCR-Analyse an den Fibroblasten der Probanden konnte somit in fünf von sieben Fällen erfolgreich zur Validierung eingesetzt werden. Ein Vorteil dabei war, dass man fast alle genomischen Bereiche jeder Größe mit speziell gewählten Primer untersuchen konnte. Die genomische qPCR wurde weiterhin zur Überprüfung der SNP-Array-Ergebnisse eingesetzt.

3.4.3. Validierung der SNP-Array-Ergebnisse für den 2N-Probanden KKR A24 und seinen monozygoten gesunden Zwilling KKR D24 mittels genomischer qPCR mit UPL-Sonden

Für das monozygote Zwillingpaar wurden die im SNP-Array detektierten CNVs des 2N-Zwillings KKR A24 mittels genomischer qPCR weiter untersucht. Für diese Validierung wurde nicht mehr die SYBR Green-Messung verwendet, sondern das Detektionsverfahren mit UPL(Universal ProbeLibrary)-Sonden (Roche) gewählt. Die Verwendung dieser Hydrolysesonden ermöglichte eine noch genauere Messung. Die Ergebnisse der SNP-Array-Analyse des 2N-Zwillings KKR A24 im Vergleich zum gesunden Zwilling KKR D24 und über 100 Kontrollen lieferte sechs chromosomale Loci mit CNVs (Tabelle 14). Die in den Bereichen betroffenen Gene *RSPO3*, *RPN2*, *CCND3*, *C5orf13*, *UBE2Q2P2* und *KRAS* wurden mittels genomischer qPCR bei dem 2N-Zwilling KKR A24, dem gesunden Zwilling KKR D24 und Kontrollfibroblasten untersucht.

Tabelle 14: Ergebnisse der SNP-Array-Analyse des 2N-Zwillings KKR A24 im Vergleich zum gesunden Zwilling KKR D24 und Kontrollen. Chromosomale Loci mit CNVs und betroffene, in der genomischen qPCR-Validierung untersuchte Gene/-bereiche.

Chromosomaler Locus	Status	Position Start	Position End	Größe [kb]	Betroffenes, untersuchtes Gen	in >100 Kontrollen
6q22.33	Heterozygot deletiert	127318026-127318574	127499522-127502090	180	<i>RSPO3</i> (Promoter + Exon 1)	-
5q22.1	Heterozygot deletiert	111048833-111054154	111139012-111139685	85	<i>C5orf13</i>	-
20q11.23	Heterozygot deletiert	35278573-35280460	35296275-35301633	16	<i>RPN2</i> (Exon + 3'UTR)	-
6p21.1	Dupliziert	42013226-42013647	42016012-42016112	2,4	<i>CCND3</i>	-
15q25.2	Dupliziert	80368482-80393465	80996390-80999012	603	<i>UBE2Q2P2</i>	-
12p12.1	Dupliziert	25254282-25257762	25269928-25270425	12,6	<i>KRAS</i>	-

Die Duplikationen der drei Gene *CCND3*, *UBE2Q2P2* und *KRAS* aus der SNP-Array-Analyse für KKR A24 konnten in der Validierung mit genomischer qPCR mit UPL-Sonden (Roche) nicht bestätigt werden. Auch die teilweise Deletion des Gens *RPN2* konnte in der qPCR für KKR A24 nicht nachgewiesen werden.

Für zwei Gene konnte in der genomischen qPCR zwar keine eindeutige Deletion detektiert, aber erniedrigte Werte beim 2N-Zwilling KKR A24 im Vergleich zu dem gesunden Zwilling KKR D24 und Kontrollen gemessen werden.

Wie in der Abbildung 33 dargestellt ist, fanden sich, wie schon in der vorhergehenden Analysen, erniedrigte Messwerte bei der Verifizierung der Deletion (ein Mosaik) von *RSPO3* für den 2N-Zwilling KKR A24 im Vergleich zu dem gesunden Zwilling KKR D24 und Kontrollfibroblasten. Auch für die Deletion des Gens *C5orf13* konnten leicht erniedrigte Messwerte beim 2N-Zwilling KKR A24 im Vergleich zu den Kontrollen festgestellt werden.

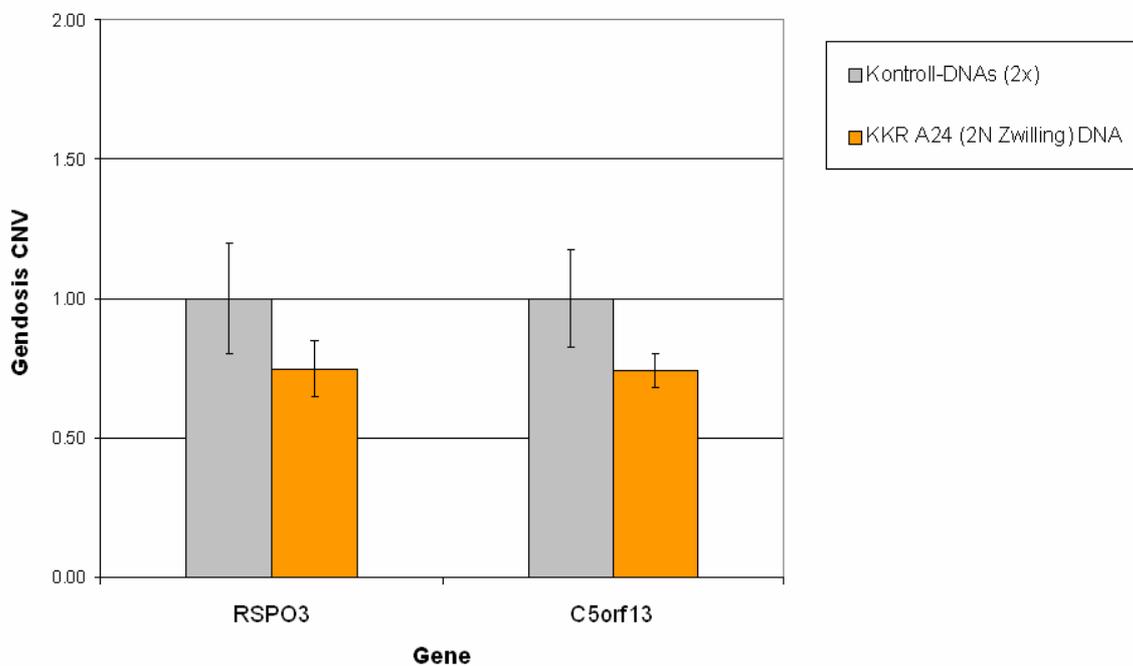


Abbildung 33: Kopienzahl der zwei Gene *RSPO3* und *C5orf13* beim 2N-Zwilling KKR A24 und Kontrollen, detektiert mittels genomischer qPCR mit UPL-Sonden (Roche), normalisiert gegen Kopienzahl des Gens *RFC3* und verglichen mit Kontrollen (KKR D24 und FIB KON1).

Diese nur leicht reduzierten Messwerte von ca. 0,7-0,8 (ca. 0,5 wäre heterzygot deletiert) bei den zwei Genen *RSPO3* und *C5orf13* sprechen eventuell für eine im Mosaik vorhandene Deletion beim 2N-Probant KKR A24.

4. Diskussion

In dieser Arbeit wurden genetische und epigenetische Risikofaktoren für die Entstehung von Krebs im Kindesalter untersucht. Hierzu wurden in der Hauptanalyse Kinderkrebspatienten, die einen Zweittumor entwickelt haben, mit solchen ohne Zweittumor als Kontrollgruppe im matched pairs-Design verglichen. Es sollte mittels verschiedener Analysen die Hypothese überprüft werden, dass Zweittumore nach Therapie eines kindlichen Malignoms (durch Bestrahlung oder Behandlung mit DNA-schädigenden Substanzen) durch Modulationen/Fehlregulationen von DNA-Reparaturmechanismen entstehen können.

4.1. Das Patientenkollektiv und das Kontrollkollektiv

Die untersuchten 2N- und 1N-Probanden stellen ein relativ heterogenes Patientenkollektiv mit vielen unterschiedlichen Krebserkrankungen dar. Da zweimalige Krebserkrankungen im Kindes- und Jugendalter eher selten sind, konnte man nur ein heterogenes Kollektiv an 2N-Probanden mit verschiedenen Tumorarten für diese Studie rekrutieren. Es war keine Selektion nach einer bestimmten Tumorart möglich. Die Patienten wiesen verschiedenste Kombinationen aus Erst- und Zweittumoren mit verschiedenen Therapien auf. 46% der kontaktierten 2N-Probanden und 18% der 1N-Probanden haben an der Studie teilgenommen. Lymphoide Leukämie war in unserem Patientenkollektiv insgesamt die häufigste Diagnose (Material & Methoden, Tabelle 1). Da die Überlebensrate bei einer zweiten Krebserkrankung deutlich schlechter als die durchschnittliche Überlebensrate bei Kinderkrebspatienten ist und nur lebende Patienten in die Studie eingeschlossen werden konnten, repräsentieren die 2N-Probanden unserer Studie nicht die 2N-Probandenpopulation des Deutschen Kindeskrebsregisters. Die häufigste registrierte zweifache Krebskombination ist die akute myeloische Leukämie nach einer lymphatischen Leukämie als Ersterkrankung. Allerdings geht diese Kombination mit einer sehr geringen Überlebensrate einher, sodass diese 2N-Probanden nicht in unserem Kollektiv vorkamen. Schilddrüsentumoren, die als zweite Krebserkrankung sehr gut behandelbar sind, stellten in unserem Patientenkollektiv die häufigste Zweittumordiagnose dar. Aktuell sind alle Patienten außer einem 2N Probanden zum heutigen Zeitpunkt noch am Leben.

[Info Deutsches Kindeskrebsregister, <http://www.kinderkrebsregister.de/>]

Es standen in dieser Studie keine gematchten Probanden ohne Krebserkrankung zur Verfügung. Als gesunde Kontrollen wurden 25 Fibroblastenzellkulturen aus anonymen Hautproben verwendet, die bei chirurgischen Eingriffen von Patienten ohne Krebserkrankung gewonnen wurden. Diese Kontrollprobanden waren im Durchschnitt 2-4 Dekaden älter als die 2N- und 1N-Probanden. Außerdem wurden deren Hautproben an anderen Körperstellen entnommen.

In den cDNA-Microarray-Experimenten wurden diese gesunden Kontrollen als Vergleichskontrollpool verwendet. Zum Zeitpunkt, als die Studie geplant wurde, war der Einsatz von gepoolten Proben üblich, da hierdurch die biologische Variabilität unserer Vergleichsgröße verringert werden sollte [37]. Heutzutage wird dies allerdings kritisch betrachtet, da durch die Verwendung der Pools zum Vergleich von Proben Informationen verloren gehen und stark abweichende Proben im Pool zu einer Verfälschung der Ergebnisse führen können.

Bei den Genexpressionsmessungen via RTq-PCR zeigten unsere gesunden Kontrollen auffallende Unterschiede bei der Messung fast aller Gene (Daten nicht gezeigt), was darauf hindeutet, dass die Genexpression der untersuchten Gene altersabhängig [38] und möglicherweise auch lokalisationsabhängig in somatischen Körperzellen ist. Deshalb wurde hier nur der Vergleich der gematchten Probandenpaare betrachtet. Für zukünftige Studien sollten perfekt gematchte Probanden ohne Krebserkrankung rekrutiert werden.

Nur für einen 2N-Probanden (KKR A24) stand in der Studie sein gesunder monozygoter Zwilling (KKR D24) als perfekt gematchte gesunde Kontrolle zur Verfügung. Die Ergebnisse der Analysen für dieses interessante Zwillingpaar werden nach dem Gesamtprobandengruppenvergleich separat diskutiert.

4.2. Das Untersuchungsmaterial

In dieser Studie wurden hauptsächlich die primären Hautfibroblasten der Probanden untersucht. Primäre Hautfibroblasten repräsentieren einen somatischen Zelltyp. Im Gegensatz zu Blut oder EBV-transformierten Lymphoblasten, welche leichter verfügbar sind, stellen primäre Fibroblasten eine homogene Zellpopulation dar und zeichnen sich durch einen intakten Zellzyklus und intakte DNA-Reparatur-Checkpoints aus.

Einige Probanden unserer Studie (n=6) wurden einer Knochenmarkstransplantation unterzogen. Die Untersuchung von Blutproben wäre also bei diesen Probanden somit nicht sinnvoll gewesen, da man das Spendermaterial untersuchen würde.

Verglichen mit den enormen Bemühungen, Transkriptome und Proteome von Tumorzellen zu charakterisieren, gibt es nur relativ wenige Studien, in denen nach Genexpressionsunterschieden in normalen somatischen Zellen von Tumorpatienten gesucht wird. Entsprechend gibt es nicht viele Studien, die an primären Fibroblasten von Krebspatienten durchgeführt wurden. Al-Khodairy et al. (2004) haben zum Beispiel in primären Fibroblasten von Brust- und Schilddrüsenkrebspatienten eine defekte DNA-Reparatur und/oder Zellzyklusregulation nachgewiesen [39]. Von Chuang et al. (2006) konnten in somatischen Zellen eine abnormale Genexpression bei nicht betroffenen Eltern von Retinoblastompatienten mit einer genetischen Krebsprädisposition assoziieren [40].

4.3. Probandengruppenvergleich

4.3.1. Basale mRNA-Expression (cDNA-Microarray)

In unserer Studie wurde zuerst mittels cDNA-Microarray-Screening nach Unterschieden in der basalen mRNA-Expression von DNA-Reparaturgenen zwischen den 2N-Probanden und den gematchten 1N-Probanden gesucht. Die Auswertung der cDNA-Microarray-Experimente ergab, dass nach Korrektur für multiples Testen mit einer False Discovery Rate (FDR) von 5% für kein Gen ein signifikanter p-Wert detektiert wurde. Zwischen der 2N-Gruppe und der 1N-Gruppe konnte kein signifikanter Unterschied in der Expression der untersuchten Gene auf dem Chip festgestellt werden. Das bedeutet jedoch nicht, dass es keinen signifikanten Unterschied in der basalen mRNA-Expression von DNA-Reparaturgenen zwischen den Probandengruppen gibt. Durch die geringe Fallzahl dieser Studie und die große Anzahl gleichzeitig untersuchter Gene auf dem Chip war ein signifikantes Ergebnis unwahrscheinlich. Multiples Testen ist ein Problem in Genexpressions-Microarray-Studien, in denen hunderte bis tausende Gene gleichzeitig untersucht werden.

Ohne Korrektur für multiples Testen konnten Gene mit kleinen p-Werten im gepaarten t-Test für die Gruppenvergleiche detektiert werden. Diese Genlisten, welche die Gene mit den kleinsten p-Werten aus dem Gesamtgruppenvergleich und auch den

Subgruppenanalysen enthalten, sind für die verschiedenen Normalisierungsverfahren teilweise sehr unterschiedlich (Ergebnisse, Tabelle 9-11). Kleine p-Werte können immer auch ein Zufallsereignis sein und sollten nicht überinterpretiert werden [41]. Aufgrund dieses Sachverhalts und dem nur kleinen Unterschied im Expressionsverhältnis 2N/1N-Gruppe von 0,85-1,17 Ratio Mittelwert für die Gene bei der Datenauswertung nach dem kleinsten p-Wert wurden die Daten zusätzlich noch nach dem Kriterium, dass das Expressionsverhältnis größer als 1,2 bzw. kleiner als 0,8 sein muss, für jeden Probanden separat ausgewertet. Es wurden nur Gene berücksichtigt, die bei mindestens zwei Probanden stärker reguliert vorgefunden wurden.

Trotz der geringen Probandenzahl zeigen die Ergebnisse die prinzipielle Durchführbarkeit der Studie. Mit einem größeren Probandenkollektiv könnten möglicherweise signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen nachgewiesen werden. Es wurden 20 Gene aus den cDNA-Microarray-Daten des basalen mRNA-Expressionsvergleichs der Probandengruppen 2N vs 1N herausgefiltert, die in den anschließenden Analysen mittels RTq-PCR validiert wurden. Die Analysen nach Tumorart-Subgruppen wurden aufgrund der sehr geringen Fallzahlen nicht weiterverfolgt.

4.3.2. mRNA-Expression (RTq-PCR)

Die cDNA-Microarray-Ergebnisse wurden mittels RTq-PCR validiert. Zur Normalisierung der mRNA-Expressionsmessung mittels RTq-PCR wurden zwei endogene Kontrollen, *TBP* und *RRN18S*, verwendet. Das Gen *TBP* zeigte eine sehr konstante Expression und *RRN18S* lässt Rückschlüsse auf den Gesamtexpressionsstatus der Zelle zu. Deshalb wurden diese Gene für die Normalisierung verwendet.

4.3.2.1. Basale mRNA-Expression

Die Validierung der 20 Kandidatengene aus der cDNA-Microarray-Untersuchung für den basalen mRNA-Expressionsvergleich der 2N-Probanden mit den 1N-Probanden ergab, dass drei Gene, *RAD9A*, *CDKN1A* und *FTH1*, differentiell exprimiert sind (Ergebnisse, Abbildung 7). Die Gene *FTH1* (+1,64x; p=0,041) und *CDKN1A* (+1,25x; p=0,003) zeigten eine erhöhte mRNA-Expression und *RAD9A* (-2,40x; p=0,004) eine

deutlich niedrigere mRNA-Expression in den 2N-Probanden im Vergleich zu den 1N-Probanden.

FTH1 kodiert für die schwere Untereinheit des Proteins Ferritin, welches seine Hauptfunktion in der Eisenspeicherung hat. Das Gen *FTH1* hat multiple Pseudogene und einige alternativ gespleißte Transkriptvarianten, deren biologische Funktionen und Bedeutungen noch unklar sind. Defekte in Ferritinen sind assoziiert mit verschiedenen neurodegenerativen Erkrankungen [42]. Es wird vermutet, dass Ferritine eine regulatorische Rolle bei der zellulären Differenzierung haben. Außerdem haben Ferritine mit einem hohen H/L Verhältnis (saure Isoferritine) eine inhibitorische Wirkung in der Myelopoese bei Leukämiepatienten [43]. Im Zusammenhang mit Krebs wurde bisher nur in Prostata Tumoren eine Hochregulation der RNA-Expression von *FTH1* festgestellt [44]. Allerdings ist die leicht erhöhte basale mRNA-Expression von *FTH1* in den 2N-Probanden aufgrund der hohen Expressionsvariabilität, seiner multiplen Pseudogene und etlicher alternativer Transkriptvarianten schwierig zu interpretieren. *FTH1* wurde trotz detektiertem Expressionsunterschied zwischen 2N- und 1N-Gruppe deshalb nicht in die anschließenden Analysen miteingeschlossen.

CDKN1A, der Zyklin-abhängige Kinaseinhibitor 1A (p21), ist einer der Hauptregulatoren des G1/S Checkpoints und wichtig zur Unterbindung der Zellteilung nach DNA-Schädigung [45]. Ein Expressions- oder Funktionsverlust von *CDKN1A* spielt bei der Entwicklung oder dem Fortschreiten vieler humaner Malignome eine Rolle [46]. Da *CDKN1A* eine wichtige regulatorische Rolle im Zellzyklus hat und im Zusammenhang mit Tumorgenese steht, ist es denkbar, dass eine abnorme Expression von *CDKN1A* in die Zweittumorentstehung involviert ist. Bei einer Untersuchung von SNPs im *CDKN1A*-Gen konnte keine Assoziation mit Leukämien im Kindesalter gefunden werden [47].

Das Gen *RAD9A* (RAD9 homolog A) kodiert für ein Zellzyklusprotein, das multiple Funktionen hat. Es ist sowohl wichtig für den Erhalt der genomischen Integrität, die Zellzyklus-Checkpoint-Kontrolle, den Zellzyklusarrest, die DNA-Reparatur nach DNA-Schädigung als auch für die Apoptose. Eine abnormale Expression von *RAD9A* wurde in verschiedenen Studien mit Tumorgenese in Verbindung gebracht [48,49]. Da in der basalen mRNA-Expression von *RAD9A* der größte Unterschied zwischen den 2N-Probanden und den 1N-Probanden in der RTq-PCR (-2,40x; p=0,004) nachgewiesen wurde und eine veränderte Expression von *RAD9A* in Zusammenhang mit

Tumorentwicklung beschrieben wurde, wurde die Expressionsanalyse von *RAD9A* weiterverfolgt.

Die erhöhte Expression von *CDKN1A* und die stark reduzierte Expression von *RAD9A* waren die deutlichsten Unterschiede beim Vergleich der basalen mRNA-Expression von 2N-Probanden und 1N-Probanden.

4.3.2.2. Induzierte mRNA-Expression

Die DNA-Reparatur spielt für die Integrität des Genoms und das Überleben einer Zelle besonders nach DNA-Schädigung eine wichtige Rolle. Bei der Krebsbehandlung wird häufig die DNA-schädigende Strahlentherapie eingesetzt. Daher wurde in dieser Studie untersucht, ob Unterschiede zwischen den 1N- und 2N-Patienten in der mRNA-Expression von DNA-Reparaturgenen nach der Bestrahlung der Probandenzellen vorliegen. Analysiert wurde hierzu die mRNA-Expression der Gene *RAD9A*, *CDKN1A*, *RFC2*, *KRT17* und *VIM* nach Induktion der DNA-Reparatur durch 1 Gy Bestrahlung in den Zellen der Probanden.

Die mRNA-Expression des Gens *CDKN1A*, welche in beiden Probandengruppen 4 h nach der Bestrahlung ca. zweifach hochreguliert vorlag, kann als Beweis für die Induktion der DNA-Reparatur gewertet werden (Daten nicht gezeigt). *CDKN1A* zeigte allerdings keinen Unterschied zwischen den Probandengruppen. Unterschiede zwischen den Probandengruppen in der mRNA-Expression nach Bestrahlung fanden sich nur für das Gen *RAD9A* (Ergebnisse, Abbildung 8). Nach Verrechnung auf das Ausgangsexpressionsniveau der jeweiligen unbehandelten Zellen, zeigte die 2N-Gruppe eine deutlich niedrigere *RAD9A* mRNA-Expression 1 h (-1,17x; p=0,041) und 4 h (-1,10x; p=0,041) nach der 1 Gy Bestrahlung. Es konnte im gewählten Zeitfenster keine Hochregulation der *RAD9A*-mRNA-Expression nach der Bestrahlung detektiert werden. Da es für DNA-Reparaturgene eher unwahrscheinlich ist, dass sie nach Strahlenexposition herunterreguliert werden (siehe z. B. *CDKN1A*), vermuten wir, dass es sehr früh (0-1 h) nach der Behandlung möglicherweise zu einer Hochregulation gekommen sein muss. Darüber, wie sich eine 1 Gy Bestrahlung auf die *RAD9A*-mRNA-Expression in Fibroblasten auswirkt, ist nichts bekannt. Es gibt z. B. eine Studie an Lungenkrebszelllinien mit verschiedener Radiosensitivität, bei der die mRNA-Expression des Gens *RAD9A* in radioresistenten Lungenkrebszellen differentiell reguliert war; 6 h nach Bestrahlung kam es zu einer leichten Hochregulation von

RAD9A; 24 h nach Bestrahlung zeigten die radioresistenten Lungenkrebszellen dagegen eine herunterregulierte Expression von *RAD9A* [50]. Die *RAD9A*-Expression für frühe Zeiten (0-1 h) nach Bestrahlung wurde nicht untersucht.

Vergleicht man nur die 2N-Probanden mit den 1N-Probanden, unbehandelt als auch bestrahlt nach 1, 4 und 24 h, fällt für alle Proben der deutliche, etwa gleich bleibende *RAD9A*-Expressionsunterschied zwischen den Probandengruppen auf. Dies ist als Graphik hier noch mal zusätzlich in Abbildung 34 dargestellt. Ohne DNA-Reparaturinduktion zeigten die 2N-Patienten im Vergleich zu den 1N-Patienten (siehe auch Ergebnisse, Abbildung 7) einen deutlich reduziertes *RAD9A*-mRNA-Level (-2,40x, $p=0.004$), aber auch 1 h (-2.54x, $p=0.003$), 4 h (-2.62x, $p=0.003$), und 24 h (-2.54x, $p=0.003$) nach Bestrahlung.

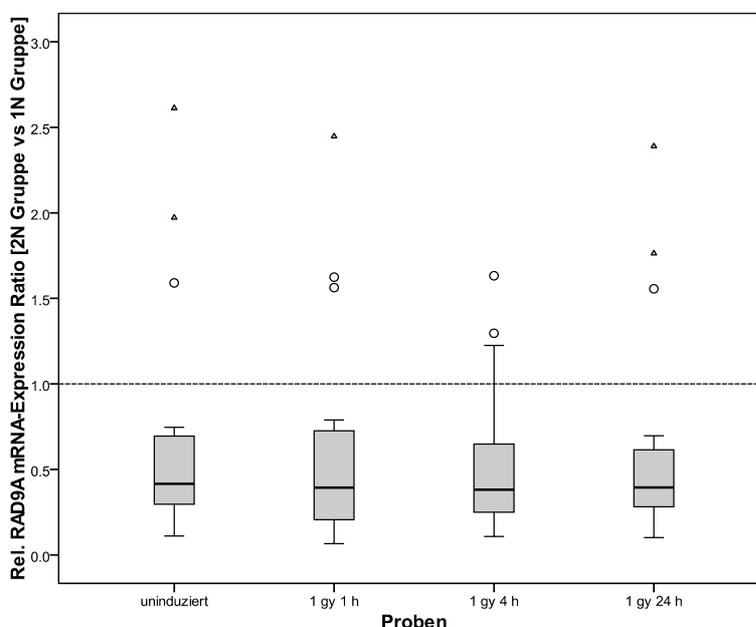


Abbildung 34: Verminderte *RAD9A*-mRNA-Expression in unbehandelten und bestrahlten (1 h, 4 h und 24 h nach 1 Gy) Fibroblasten der 2N-Patienten im Vergleich zu den 1N-Patienten. mRNA wurde mittels RTq-PCR quantifiziert (normalisiert mit der $\Delta\Delta$ -CT Methode und zwei endogenen Kontrollgenen). Die Boxplots zeigen die gematchten 2N vs 1N Expressionsratios. Ausreißerwerte sind mit ° und extreme Ausreißer mit Δ markiert. 2N-Patienten zeigen im Vergleich zu den 1N-Patienten einen reduziertes *RAD9A*-mRNA-Level ohne Induktion (-2,40x, $p=0,004$) als auch 1 h (-2,54x, $p=0,003$), 4 h (-2,62x, $p=0,003$), und 24 h (-2,54x, $p=0,003$) nach 1 Gy Bestrahlung.

Unabhängig von der Strahlenexposition scheint dieser Expressionsunterschied zwischen den Probandengruppen konstant vorzuliegen. Nur drei Probandenpaare zeigten sowohl behandelt als auch unbehandelt eine erhöhte *RAD9A*-mRNA-Expressionswerte für den 2N/1N-Vergleich (siehe Ausreißerwerte, Abbildung 7 und 34). Für diese drei Probandenpaare konnten allerdings keine Gemeinsamkeiten (z. B. bezüglich der Tumorart) gefunden werden.

4.3.3. Proteinexpression

4.3.3.1. Basale Proteinexpression

Zur weiteren Abklärung des *RAD9A*-Expressionsunterschieds wurde die nukleäre Proteinexpression von *RAD9A* und 19 weiterer DNA-Reparaturproteine mittels Antikörper-Microarrays untersucht. Hierbei konnte für *RAD9A* und fünf weitere Proteine, *GTBP/MSH6*, *GADD153/DDIT3*, *BRCA1*, *p53*, *RAD51*, eine unterschiedliche Proteinexpression in den uninduzierten Zellen der 2N-Probanden verglichen mit den 1N-Probanden detektiert werden (Ergebnisse, Abbildung 17). Die 2N-Probandengruppe zeigte hierbei einen niedrigeren Proteinexpressionslevel von *BRCA1* (-1,36x; $p=0,017$), *RAD51* (-1,37x; $p=0,009$), *p53* (-1,18x; $p=0,003$), *GTBP/MSH6* (-1,16x; $p=0,021$), *GADD153/DDIT3* (-1,27x; $p=0,011$) und *RAD9A* (-1,38x; $p=0,04$) verglichen mit der 1N-Probandengruppe. Hierbei war *RAD9A* das Gen mit der am stärksten herunterregulierten Proteinexpression in den 2N-Patienten gegenüber den 1N-Patienten. Dieser Trend der *RAD9A*-Proteinexpression in den 2N-Patienten konnte auch in den exemplarischen Western Blots (ca. -1,54x) sichtbar gemacht werden (Ergebnisse, Abbildung 15). Für die gemessenen Proteine *RAD9A* und *ATM* wurden auch mRNA-Expressionsuntersuchungen durchgeführt. Das Gen *ATM* zeigte sowohl in der basalen mRNA-Expression als auch in der Proteinexpression keinen Unterschied im Probandengruppenvergleich (Daten nicht gezeigt). Das Gen *RAD9A* zeigte einen übereinstimmenden niedrigeren Level für die basale mRNA- und Proteinexpression bei der 2N-Probandengruppe im Vergleich zur 1N-Probandengruppe.

Im Nachfolgenden werden nun die Gene *BRCA1*, *RAD51*, *p53*, *GTBP/MSH6*, *GADD153/DDIT3* und *RAD9A*, die einen niedrigeren basalen Proteinlevel bei den 2N-Patienten zeigten, diskutiert. Diese sechs basal niedriger exprimierten Proteine in den 2N-Probandenfibroblasten sind alle Proteine, die bei der DNA-Reparatur eine Rolle spielen und unter bestimmten Bedingungen zur Krebsentstehung beitragen können. Sie wirken aber nur zum Teil in denselben Pathways (z.B. *BRCA1* und *RAD51* in der DSB-Reparatur). Eine verminderte Expression dieser Proteine könnte ein möglicher Risikofaktor für die Krebsentwicklung sein, da eine präzise Regulation der Expression insbesondere nach DNA-Schädigung erforderlich ist.

Das Gen *BRCA1* (breast cancer 1, early onset) kodiert für ein nukleäres Phosphoprotein, das eine wichtige Rolle bei der Erhaltung der genomischen Integrität spielt, bei DNA-Reparatur von Doppelstrangbrüchen, Rekombination und Transkription mitwirkt und als Tumorsuppressor agiert. Das Protein BRCA1 interagiert mit den Proteinen RAD51 und BRCA2. Mutationen oder Deletionen des *BRCA1*-Gens erhöhen die Wahrscheinlichkeit der Tumorbildung und sind in besonderem Maße für erblichen Brustkrebs verantwortlich, aber auch für Ovarial-, Kolon-, Pankreas- und Prostatakarzinome [51]. Die reduzierte, konstitutive Proteinexpression des Tumorsuppressors *BRCA1* bei den 2N-Probanden könnte somit eine Krebsprädisposition darstellen. Für die maligne Entartung einer Zelle bedarf es allerdings (nach Knudson's two-hit Hypothese) bei Tumorsuppressorgenen zumeist des Funktionsverlusts beider Allele [21].

Das Gen *RAD51* (RAD51 homolog) kodiert für ein wichtiges Protein der homologen DNA-Rekombinationsreparatur. Dieses Protein bildet komplexe Netzwerke mit DNA-Schadenssensoren, Tumorsuppressoren, Zellzyklus- und Apoptoseregulatoren und spielt in Interaktion mit BRCA1 und BRCA2 eine wichtige Rolle in der zellulären Antwort auf DNA-Schädigung. Mutationen im Gen sind assoziiert mit Tumorgenese. *RAD51* wurde in vielen Krebsarten überexprimiert gefunden [52,53]. Da die Proteine BRCA1 und RAD51 interagieren und in unseren Ergebnissen für beide eine niedrigere Proteinmenge in den 2N-Probanden gefunden wurde, stellt die niedrigere Proteinexpression von *RAD51* wahrscheinlich einen DNA-Reparaturnachteil für die Zellen dar.

Das Protein p53 (Tumor protein p53) hat eine Schlüsselrolle in der Antwort auf zellulären Stress. Als DNA-bindender Transkriptionsfaktor vermittelt es Veränderungen in der Genexpression, die Zellzyklusarrest, Apoptose, Seneszenz oder DNA-Reparatur induzieren, und wirkt als Tumorsuppressor. Mutationen in *p53* kommen häufig in Krebszellen vor. Keimbahnmutationen in *p53* verursachen das Li-Fraumeni-Syndrom (LFS). Mutationen in *p53*, ob somatisch oder vererbt, stellen einen Krebsrisikofaktor dar [54]. *p53* setzt sehr viele DNA-Reparaturprozesse in Gang, sodass eine geringere konstitutive Proteinmenge bei den 2N-Probanden eine Tumorgenese begünstigen könnte.

GTBP/MSH6 (MutS homolog 6) ist ein wichtiges DNA-Mismatch-Reparaturprotein, das zusammen mit MSH2 einen Mismatch-Erkennungskomplex bildet. Patienten mit erblichem nicht-polypösem Kolonkarzinom (HNPCC) und Endometriumkarzinom zeigen Mutationen im *MSH6*-Gen. Eine reduzierte Expression von GTBP/MSH6, einem

wichtigen Mismatch-Reparaturprotein, führt vermutlich zu einer verminderten Reparaturkapazität [55,56], sodass die 2N-Probanden möglicherweise durch die geringere konstitutive GTBP/MSH6-Proteinexpression einen DNA-Reparaturnachteil haben.

Das GADD153/DDIT3 (DNA damage-inducible transcript 3) Protein ist ein Transkriptionsfaktor, der zur Familie der CCAAT/Enhancer-binding Proteine (C/EBP) gehört. Dieses Protein spielt eine Rolle in der Lipogenese und Erythropoese, wird aktiviert durch Stress des Endoplasmatischen Retikulums und fördert die Apoptose. Es finden sich beim Liposarkom oder Ewing-Sarkom, durch chromosomale Translokationen generierte, Fusionsprodukte der Gene *DDIT3* und *FUS* [57]. GADD153/DDIT3 ist ein potentieller Tumorsuppressor und involviert in die Regulation des Zellwachstums und der Differenzierung. In Patienten mit chronischer myeloischer Leukämie (CML) wurde eine Hypermethylierung des *DDIT3*-Promotors und ein signifikant niedrigerer Transkriptlevel von *DDIT3* im Vergleich zu nicht betroffenen Kontrollen nachgewiesen [58]. Der konstitutiv niedrigere Proteinlevel von GADD153/DDIT3 der 2N-Probanden könnte von Nachteil für die Zelle sein und somit vielleicht einen Krebsrisikofaktor darstellen.

Das Zellzyklus-Checkpoint-Protein RAD9A (RAD9 homolog A), welches bereits erwähnt wurde (Diskussion 4.3.2.1.), wird für den Zellzyklusarrest benötigt und interagiert bei der DNA-Reparaturantwort. Das Protein RAD9A besitzt eine 3'-5'-Exonukleaseaktivität, die vermutlich eine Rolle bei der Detektion und der Reparatur von DNA-Schäden spielt. Es wird vermutet, dass viele dieser Funktionen durch den nukleären Proteinkomplex RAD9A-HUS1-Rad1 vermittelt werden [48,49]. Eine abnormale Expression von RAD9A wird mit Tumorgenese in Verbindung gebracht. RAD9A kann als Tumorsuppressor agieren, sodass die reduzierte basale Proteinexpression in den 2N-Probanden einen möglichen Nachteil in der DNA-Reparaturkapazität bedeutet.

4.3.3.2. Induzierte Proteinexpression

Die DNA-Reparatur ist insbesondere nach DNA-Schädigung essentiell für das Überleben der Zelle. In der Krebstherapie spielt die DNA-schädigende Bestrahlung eine wichtige Rolle. Daher wurde im Weiteren untersucht, ob es Unterschiede zwischen den Probandengruppen in der Proteinexpression von DNA-Reparaturproteinen nach einer Bestrahlung der Probandenzellen gibt. Der Vergleich der Probandengruppen

2N und 1N ergab hier, dass die drei Proteine, GTBP/MSH6, GADD153/DDIT3 und RAD9A, Unterschiede in der Expression nach der 1 Gy Induktion zeigten (Ergebnisse, Abbildung 18-20). 1 h nach der Bestrahlung konnten die Proteine GTBP/MSH6 und GADD153/DDIT3 mit niedrigerem Proteinlevel in den 2N-Probanden detektiert werden und 4 h nach der Induktion wurde ein geringerer RAD9A-Proteinlevel in den 2N-Probanden gemessen. Insgesamt zeigte RAD9A in der Proteinexpression die größten Unterschiede zwischen den beiden Probandengruppen.

Für die drei Proteine GTBP/MSH6, GADD153/DDIT3 und RAD9A wurde schon in den nicht induzierten Zellen der 2N-Probanden eine deutlich niedrigere Proteinexpression gemessen und auch nach einer Bestrahlung mit 1 Gy.

Für das Protein GTBP/MSH6 kam es zu keinem Anstieg der Proteinexpression (Ergebnisse, Abbildung 19) nach der Bestrahlung der Zellen beider Probandengruppen, aber 1 h nach der 1 Gy Strahlenexposition zeigten die 2N-Probanden eine deutlich verringerte Proteinexpression von GTBP/MSH6 (-1,21x; $p=0,004$) im Vergleich zu den 1N-Probanden. Dagegen wurde für GADD153/DDIT3 eine ansteigende Proteinexpression (Ergebnisse, Abbildung 20) in den Zellen beider Probandengruppen nach der Bestrahlung gemessen. Für den Zeitpunkt 1 h nach der Bestrahlung zeigten die 2N-Probanden einen deutlich geringeren Anstieg des GADD153/DDIT3-Proteinlevels (-1,13x; $p=0,019$) im Vergleich zu den 1N-Probanden. Auch die RAD9A-Proteinexpression (Ergebnisse, Abbildung 18) stieg nach der 1 Gy Bestrahlung der Zellen bei beiden Probandengruppen an. 1 h nach Induktion konnte bei beiden Gruppen eine etwa zweifach erhöhte RAD9A-Proteinmenge detektiert werden, wobei die 2N-Probanden hier eine etwas geringere Expressionsänderung zeigten. 4 h nach der Bestrahlung wurde bei den 2N-Probanden ein deutlich geringerer RAD9A-Proteinexpressionslevel (-1,44x; $p=0,012$) im Vergleich mit den 1N-Probanden gemessen.

GTBP/MSH6, GADD153/DDIT3 und RAD9A wurden bereits in der Diskussion dargestellt (siehe Diskussion 4.3.2.1. und 4.3.3.1.). Diese drei Proteine, GTBP/MSH6, ein wichtiges DNA-Mismatch-Reparaturprotein, GADD153/DDIT3, ein potentieller Tumorsuppressor, und RAD9A, ein Protein mit multiplen Funktionen, wichtig bei Zellzyklus-Checkpoint-Kontrolle und DNA-Reparatur, sind essentiell für das Überleben der Zelle nach einer DNA-Schädigung. Eine verminderte Expression dieser Proteine könnte bei und nach einer Bestrahlung ein möglicher Risikofaktor für die Zellen sein.

Gerade die präzise Regulation von DNA-Reparaturproteinen ist wichtig um eine Tumorgenese zu unterbinden.

Die bei den 2N-Probanden am stärksten verringerte Expression auf Protein- als auch auf mRNA-Ebene basal als auch nach 1 Gy Bestrahlung wurde für *RAD9A* detektiert. Für *RAD9A* wurde eine abnormale Expression im Zusammenhang mit Tumorgenese beschrieben [48]. Der verringerte Expressionslevel von *RAD9A* bei den 2N-Probanden stellt einen potentiellen Krebsprädispositionsfaktor dar.

4.3.4. DNA-Methylierung

Da die DNA-Methylierung als epigenetische Modifikation im Allgemeinen zur Abschaltung eines Gens führen kann und die Veränderung der Methylierung z. B. von wichtigen DNA-Reparaturgenen zur Krebsentstehung beitragen kann, wurde die Promotormethylierung einiger in der Literatur als Krebs-relevant bekannter sowie in unserer Studie bzgl. Expression auffälliger Gene untersucht, um Unterschiede zwischen den Probandengruppen aufzudecken. Die Untersuchung der Promotormethylierung von acht Genen mittels Bisulfit-Pyrosequenzierung ergab, dass die beiden Probandengruppen 2N und 1N nur bei der Methylierung des Gens *p16/CDKN2A* einen Unterschied zeigten (Ergebnisse, Abbildung 25).

Das auffällige Gen *p16/CDKN2A* (cyclin-dependent kinase inhibitor 2A) ist ein Tumorsuppressorgen, welches das Zellwachstum über den p16-CDK4-RB-Weg am G1/S-Zellzyklus-Checkpoint kontrolliert. Dieses Gen findet sich häufig mutiert oder deletiert in Tumoren. Eine aberrante Methylierung der CpG-Insel ist der Hauptmechanismus zur Inaktivierung von *p16* in der frühen Karzinogenese, so dass die *p16*-Methylierung als potentieller Biomarker zur Früherkennung von malignen Transformationen verwendet wird [59].

In unseren Analysen konnte für die 2N-Probandengruppe eine geringfügig niedrigere *p16*-Methylierung im Vergleich zur 1N-Probandengruppe (ca. -0,5%, $p=0,004$) detektiert werden. Bei beiden Gruppen wurde eine fast vollständige Hypomethylierung des Gens *p16/CDKN2A* nachgewiesen. Die 2N-Gruppe zeigte dabei etwa 2% und die 1N-Gruppe etwa 2,5% Methylierung im Mittel. Die Tatsache, dass die 1N-Gruppe den leicht höheren Wert und somit die stärkere Tendenz zur Inaktivierung anzeigt, widerspricht unserer Hypothese, dass die 2N-Probandengruppe die höhere Krebsprädisposition aufweist. Man kann davon ausgehen, dass dieser geringe Unterschied

bei einer fast vollständigen Hypomethylierung der meisten Proben (1-5% Methylierung) keine funktionelle Bedeutung hat. Höchstwahrscheinlich handelt es sich bei diesem 0,5% Unterschied nicht um einen regulatorischen Effekt, sondern um eine statistische Schwankung. Die Messwerte der Pyrosequenzierung zeigen bei technischen Wiederholungen eine Messungengenauigkeit von $\pm 2\%$.

Für das Gen *RAD9A* wurde in dieser Analyse die Methylierung der putativen regulatorischen Region in Intron 2 des Gens untersucht. Es ist bekannt, dass die Methylierung dieser Region die *RAD9A*-Expression beeinflusst [60]. Diese Region war in den uninduzierten Zellen der 2N- und 1N-Probanden nahezu unmethyliert (4-10% Methylierung). Es wurde kein deutlicher Unterschied in der Methylierung der 2N-Probanden- und der 1N-Probandengruppe gefunden, der die Expressionsunterschiede zwischen den beiden Probandengruppen erklären könnte.

4.3.5. DNA-Reparaturkinetik

Bei der Analyse der DNA-Reparaturkinetik nach 1 Gy Bestrahlung wurden die Fibroblasten der 2N-Probanden und sechs gesunder Kontrollindividuen (kein Krebs) mittels Immunfluoreszenz-Assay zum Nachweis von γ H2AX-Foci untersucht. Mit der verwendeten Detektionsmethode wurden strahleninduzierte DNA-Strangbrüche, hauptsächlich Doppelstrangbrüche (DSBs) aber auch Einzelstrangbrüche (SSBs), über die Phosphorylierung des Histons H2AX nachgewiesen. Auf die Entstehung von DNA-Brüchen folgt immer die Phosphorylierung des Histons H2AX, einem Mitglied der H2A-Protein-Familie, durch Kinasen. Das phosphorylierte Protein, γ -H2AX, stellt den ersten Schritt der Rekrutierung und Lokalisierung weiterer DNA-Reparaturproteine dar. Die Reparatur der DSBs findet zellzyklusabhängig durch Nicht-homologes Endjoining (NHEJ) oder Homologe Rekombination (HR) statt [61,62].

Im gegebenen Versuchsaufbau zeigten alle Zelllinien nach der 1 Gy Bestrahlung anhand der Foci-Zahlen einen normalen Reparaturverlauf, mit einer frühen sehr hohen Foci-Zahl pro Kern, die dann nach 24 h wieder auf etwa das Niveau der unbehandelten Zellen absank (Ergebnisse, Abbildung 29). Nach statistischer Datenanalyse konnte kein Unterschied in den Foci-Mittelwerten und der Foci-Verteilung zwischen den Kontrollen und den 2N-Probanden gefunden werden. Da die Untersuchung der DNA-Reparaturantwort über die γ -H2AX-Foci eine sehr sensitive Methode ist, kann

davon ausgegangen werden, dass keine der untersuchten Kontrollindividuen und 2N-Probanden einen Defekt in der NHEJ- und HR-DNA-Reparatur aufweisen. Aufgrund dieser Ergebnisse und des hohen Zeitaufwands für diese Experimente wurde diese Analyse mit den 1N-Probandenzellen nicht durchgeführt.

Als problematisch stellte sich bezüglich des Versuchsaufbaus der Einsatz subkonfluenter proliferierender Zellen dar. Da sich diese Zellen in verschiedenen Zellzyklusphasen befanden, kam es bei der Auswertung zu einer teilweise recht starken Streuung bei der Foci-Verteilung. Die Verwendung synchronisierter Zellen hätte hier möglicherweise zu einer gleichmäßigeren Verteilung geführt. Da in unserer Analyse die Foci in über 100 Zellkernen pro Probe mittels halbautomatisierter Zählung (Metafer 4 Software) ausgewertet wurden, ergab sich ein stabiles Messergebnis.

4.3.6. DNA-Kopienzahlvariationen (Copy Number Variations, CNVs)

In der genomweiten SNP-Array-Analyse mittels dem Affymetrix GeneChip Genome Wide Human SNP array 6.0 konnte kein genereller genomweiter Unterschied bzgl. SNPs, CNVs, Deletionen oder Duplikationen zwischen den beiden Probandengruppen festgestellt werden. Dieses Ergebnis ist wahrscheinlich auf das kleine und zudem heterogene Patientenkollektiv mit verschiedenen Krebserkrankungen zurückzuführen. In größer angelegten Studien mit homogeneren Probandengruppen ist es durchaus möglich, mit dieser Art Screening potentiell krankheitsrelevante Unterschiede zu detektieren. So wurden z. B. in einer japanischen Studie von 2010 zur Untersuchung akuter lymphatischer Leukämie im Kindesalter mittels genomweiter SNP-Arrays sechs SNPs in vier Genen (*HAO1*, *EPB41L2*, *C2orf3*, *MAN2A1*) gefunden, die möglicherweise in Zusammenhang mit erhöhter Krebsanfälligkeit im frühen Kindesalter stehen [63].

Wegen des *RAD9A*-Expressionsunterschieds zwischen den Probandengruppen wurde die genomische Region des *RAD9A*-Gens auf Chromosom 11q13.1 in allen 2N- und 1N-Patienten auf CNVs untersucht. Dieser Bereich ist bei verschiedenen Krebsarten häufig amplifiziert [60]. Alle untersuchten 1N- und 2N-Probanden zeigten in dieser Analyse zwei Kopien des *RAD9A*-Gens, sodass der Expressionsunterschied zwischen den beiden Probandengruppen nicht auf eine CNV zurückzuführen ist.

Die FISH- und die qPCR-Methode wurde hier nur zur individuellen Validierung der im Array angezeigten CNVs verwendet, aber nicht zum gesamten Probandengruppenvergleich eingesetzt.

In einer weiteren momentan laufenden Studie sollen nun die individuellen Unterschiede in der DNA-Kopienzahl aus der genomweiten SNP-Array-Analyse validiert werden.

4.3.7. Zusammenfassung des Probandengruppenvergleichs und mögliche Schlussfolgerungen

Um die Hypothese zu untersuchen, dass Modulationen in DNA-Reparatursignalwegen das Risiko einer Zweittumorentwicklung nach Therapie (durch Bestrahlung oder Behandlung mit DNA-schädigenden Substanzen) einer Krebserkrankung im Kindesalter beeinflussen, wurden Genexpression und genetische sowie epigenetische Faktoren in den primären Fibroblasten der gematchten Zweit- (2N) und Eintumorpatienten (1N) verglichen. Zum einen wurde sowohl die konstitutive als auch die induzierte (durch Bestrahlung) mRNA- und Proteinexpression von DNA-Reparatur-assoziierten Genen in den primären Fibroblasten der 2N- und 1N-Patienten analysiert. Außerdem wurde in den Fibroblasten der Patienten die Methylierung einiger krebsrelevanter Gene gemessen, genomweit nach CNVs gesucht und eine Analyse zur Reparaturkinetik/-kapazität nach Induktion von DNA-Schäden (durch Bestrahlung) durchgeführt.

Die aufschlussreichsten Ergebnisse lieferten die Proteinuntersuchungen mittels Antikörper-Microarrays. Hierbei wurde in den primären Fibroblasten der 2N-Probanden verglichen mit den 1N-Probanden für sechs der 19 untersuchten DNA-Reparaturproteine, RAD9A, GTBP/MSH6, GADD153/DDIT3, BRCA1, p53 und RAD51, eine konstitutiv erniedrigte Expression detektiert. Nach Induktion durch Bestrahlung zeigten wiederum drei Proteine, RAD9A, GTBP/MSH6 und GADD153/DDIT3, die auch schon konstitutiv aufgefallen waren, eine niedrigere Expression bei den 2N-Probanden. Diese Ergebnisse unterstützen die Hypothese, dass die DNA-Reparatursignalwege der 2N-Patienten weniger leistungsfähig bei der Bewältigung der DNA-Schäden sind, verglichen mit denen der 1N-Patienten. Bei den Expressionsuntersuchungen auf mRNA- und Proteinebene ist das Gen *RAD9A* besonders aufgefallen. In den primären Fibroblasten konnte eine geringere sowohl

konstitutive als auch DNA-Schadeninduzierte *RAD9A* mRNA- und Proteinexpression bei den 2N-Patienten festgestellt werden. Das verringerte Expressionsniveau von *RAD9A* in den 2N-Probanden stellte den deutlichsten mRNA- und Proteinexpressionsunterschied dar. Es wurde ausgeschlossen, dass die differentielle *RAD9A*-Expression durch DNA-Methylierung oder CNVs vermittelt wird.

Das Gen *RAD9A* ist evolutionär hoch konserviert, was generell als guter Indikator für funktionale Signifikanz angesehen wird. Das Protein RAD9A ist in multiplen Signalwegen wie Basenexzisionsreparatur, homologe Rekombination, Mismatch-Reparatur als auch in Zellzykluskontrolle und Apoptose von Bedeutung. Viele dieser Funktionen werden vermutlich durch den nukleären Proteinkomplex RAD9A-HUS1-Rad1 vermittelt [48,49]. Es wurde festgestellt, dass Maus-*Rad9^{-/-}*- und *Rad9^{+/-}*-Knockout-Zellen [64] und humane RNAi Knockdown-Zellen mit reduziertem RAD9A-Level [65] auf verschiedene Arten von DNA-Schädigung empfindlich reagieren, und eine genomische Instabilität, DNA-Reparaturdefizienz und veränderte Zellzyklus-Checkpoints zeigen. Die embryonale Letalität der Maus-*Rad9^{-/-}*-Mutation weist darauf hin, dass die multiplen Funktionen von RAD9A essentiell für die Embryogenese und eine normale Entwicklung sind. Außerdem sind Mäuse mit *Rad9^{-/-}*-Deletion in Keratinozyten hochgradig anfällig für Genotoxin-induzierte Hauttumorbildung [66,67]. *Rad9^{-/-}*-Keratinozyten zeigen eine große Anzahl spontaner und Genotoxin-induzierter DNA-Brüche, eine aberrante Zellzyklusverteilung und eine erhöhte Apoptoserate. Diese Funde unterstützen die Ansicht, dass RAD9A als Tumorsuppressor in Haut und anderen Geweben fungiert, indem RAD9A die DNA-Reparatur in geschädigten Zellen fördert, das Genom stabilisiert und so einer Tumorgenese entgegenwirkt. Allerdings ist interessant, dass beides, eine Herunterregulation als auch eine Hochregulation der *RAD9A*-Expression mit Tumorgenese assoziiert ist [48]. Eine *RAD9A*-Überexpression wurde in verschiedenen Tumoren wie Brustkrebs [60], Lungenkrebs [68], Schilddrüsenkrebs [69] und Prostatakrebs [70] beobachtet. Das deutet darauf hin, dass *RAD9A* auch als Onkogen fungieren kann, das zur aberranten Transaktivierung von Downstream-Zielgenen führt. Im Allgemeinen korreliert hier die RAD9A-Menge mit Tumorgöße und/oder Tumorstadium. *RAD9A* gehört also zur wachsenden Gruppe der Gene mit einer dualen Rolle bei Krebs. Abhängig von Zelltyp und Gewebe kann es entweder eine tumorfördernde oder eine tumorunterdrückende Aktivität zeigen [48]. Die Mechanismen, durch die das multifunktionale Protein RAD9A als ein Onkogen und ein Tumorsuppressorgen agieren kann, sind bisher unbekannt.

Unsere Ergebnisse legen nahe, dass die konstitutive *RAD9A*-Expression als auch das Ausmaß der induzierten *RAD9A*-Expression nach DNA-Schädigung sich zwischen den Zweitumor- (2N) und den Eintumorpatienten (1N) unterscheidet. Wir nehmen an, dass *RAD9A* in Hautfibroblasten und möglicherweise auch anderen normalen Körperzellen als Tumorsuppressor wirkt und dabei hilft, einer Zweitumor-entwicklung entgegenzuwirken. In Anbetracht dieser Ergebnisse ist *RAD9A* ein guter Kandidat als möglicher Prädispositionsfaktor für eine Zweitumorentwicklung.

4.3.8. Ausblick Probandengruppenvergleich

Zukünftig könnte eine Analyse der *RAD9A*-Expression in Fibroblasten und anderen somatischen Zelltypen innerhalb eines größeren Patientenkollektivs (mit z. B. nur einer Tumorart) die Rolle von *RAD9A* bei der Chemo- oder Radiotherapie induzierten Karzinogenese weiter aufklären. Hierzu müssten weitere 2N- und 1N-Probanden und zusätzlich gematchte gesunde Kontrollen rekrutiert werden. Für unser Patientenkollektiv sind weiterführende Studien zur Reparaturkinetik einschließlich Zellzyklusanalysen geplant (bei Prof. Löbrich, Radiation Biology and DNA Repair, TU-Darmstadt). Bezüglich des *RAD9A*-Expressionsunterschieds der Probandengruppen sind Analysen des Zellzyklus interessant, da *RAD9A* als Zellzykluscheckpointprotein bei der Zellzykluskontrolle eine wichtige Rolle spielt.

Außerdem ist es angedacht, weitere fehlende mRNA- und Proteinexpressionsmessungen zu erheben. Aus den Ergebnissen der genomweiten SNP-Array-Analyse sollen noch die individuellen Unterschiede in der DNA-Kopienzahl für die einzelnen Probanden extrahiert und validiert werden. Im Weiteren ist geplant, Stammbaumanalysen durchzuführen um eine möglicherweise erbliche Krebsprädisposition der einzelnen Probanden nachzuweisen.

4.4. Zwillingsvergleich

Um Hinweise für die erhöhte Krebsprädisposition des 2N-Probanden KKR A24 zu erhalten, wurden separate Vergleiche mit seinem monozygoten, gesunden Zwillingspartner KKR D24 durchgeführt. Die Studienteilnahme des gesunden, monozygoten Zwillings als perfekt gematchte gesunde Kontrolle zu dem 2N-Probanden war aufgrund des gleichen genetischen Hintergrunds wissenschaftlich besonders interessant. Vergleiche z. B. der Genexpression von monozygoten Zwillingen sind besonders interessant, weil es bei genetischer Identität einfacher ist, möglicherweise krebserrelevante Unterschiede zu detektieren [71].

4.4.1. mRNA-Expression (cDNA-Microarray)

Um Unterschiede in der konstitutiven mRNA-Expression in den Fibroblasten der Zwillinge aufzudecken, wurde der 2N-Proband A24 mit seinem monozygoten gesunden Zwillingspartner D24 im cDNA-Microarrayexperiment direkt verglichen. Dieser Vergleich ergab neun potentiell unterschiedlich regulierte Gene, die mittels RTq-PCR anschließend validiert wurden.

4.4.2. mRNA-Expression (RTq-PCR)

4.4.2.1. Basale mRNA-Expression

Für drei der neun Gene aus dem cDNA-Microarray-Screening konnten die Unterschiede in der konstitutiven mRNA-Expression mittels RTq-PCR bestätigt werden. In den unbehandelten Fibroblasten des 2N-Zwillings waren im Vergleich zu denen des gesunden Zwillings zwei Gene, *KRT17* (-5,55x) und *RSPO3* (-2,79x), stark vermindert und ein Gen, *SIRT2* (+1,61x), deutlich höher exprimiert (Ergebnisse, Abbildung 10). Diese drei Gene werden im Folgenden diskutiert.

Das Gen *KRT17* kodiert für das Intermediärfilament Keratin 17, welches vor allem in der Epidermis exprimiert wird (z. B. in Nagelbett, Haarfollikeln und Talgdrüsen). Mutationen in *KRT17* führen zu Pachyonychia congenita vom Typ Jackson-Lawler und Steatocystoma multiplex [72]. *KRT17* fördert die epitheliale Proliferation und das Tumorstadium. Es wurde gezeigt, dass die genetische Eliminierung des Proteins Ke-

ratin 17, das in Tumoren der Haut überexprimiert wird, zur Verzögerung der Tumorentstehung und des Tumorwachstums führt [73]. Eine erhöhte *KRT17*-mRNA-Expression wurde im oralen Plattenepithelkarzinom im Vergleich zu nicht bösartigen Läsionen im Mund festgestellt [74]. Im Zusammenhang mit Krebs wurde nur die Hochregulation von *KRT17* beobachtet, sodass die beim 2N-Zwilling detektierte stark erniedrigte konstitutive mRNA-Expression schwierig zu interpretieren ist und höchstens als eine Fehlregulation beim 2N-Zwilling eingeschätzt werden kann.

Das Gen *RSPO3* kodiert das R-Spondin-3-Protein, ein Mitglied der Thrombospondin Typ 1 Familie. Das Protein RSPO3 hat eine wichtige Rolle in der Wnt/ β -catenin-Signalkaskade, reguliert über epitheliale Zell-Zell-Kontakte Zellwachstum und Entwicklung und fördert so z. B. embryonale Angiogenese [75], aber auch die Tumorentwicklung. Durch Onkovirus-Integration kommt es in der genomischen Region von *RSPO3* häufig zur Hochregulation. Es wurde gezeigt, dass die Überexpression von RSPO3 in p53-defizienten Brustepithelzelllinien (bei Injektion in Mäuse) die Tumorgenese fördert und *RSPO3* dabei als Onkogen fungiert. In Brusttumoren ohne provirale Integration im *RSPO3*-Locus konnte zum Teil überhaupt keine *RSPO3*-Expression detektiert werden [76]. Bei der in den primären Fibroblasten des 2N-Zwillings nachgewiesenen niedrigeren *RSPO3*-mRNA-Expression könnte es sich möglicherweise um eine krebsrelevante, aberrante Expression handeln.

Das Gen *SIRT2* ist ein Mitglied der Genfamilie der Sirtuine Klasse I und kodiert das Protein Sirtuin 2, eine dem Zytoskelett angehörende Tubulin-Deacetylase. Die Funktion der humanen Sirtuine ist nicht gesichert. Es werden interzelluläre regulatorische Prozesse vermutet. Der genomische *SIRT2*-Locus ist in humanen Gliomen häufig deletiert. Für humane Gliome und Gliom-Zelllinien konnte eine Herunterregulation der mRNA- und Proteinexpression von *SIRT2* nachgewiesen werden. Das lässt vermuten, dass *SIRT2* möglicherweise über die Regulation des Mikrotubuli-Netzwerks als Tumorsuppressorgen fungiert [77]. Die leicht erhöhte mRNA-Expression von *SIRT2* im 2N-Zwilling KKR A24 im Vergleich zum gesunden Zwilling KKR D24 kann demnach nicht direkt mit Krebs assoziiert werden.

Für die Expressionsunterschiede der Gene *KRT17* (-5,55x), und *SIRT2* (+1,61x) bei den Zwillingen konnte keine eindeutige Verbindung mit Tumorentstehung aufgezeigt werden. Möglicherweise liegt beim 2N-Zwilling eine unabhängig von der erhöhten Krebsprädisposition auftretende Fehl- oder Deregulation dieser Gene vor. Die ver-

minderte mRNA-Expression von *RSPO3* (-2,79x) hingegen könnte einen Krebsrisikofaktor für die Zellen des 2N-Zwillings darstellen.

4.4.2.2. Induzierte mRNA-Expression

Die Untersuchung der mRNA-Expression in den Fibroblasten der Zwillinge nach Induktion durch 1 Gy Bestrahlung sollte uns weitere Aufschlüsse geben. Nach einer 1 Gy Strahlenexposition zeigten die Gene *ATN1*, *BRCA1* und wiederum *KRT17* und *SIRT2* die größten Unterschiede in der mRNA-Expression zwischen den Zwillingen (Ergebnisse, Abbildung 11-14).

Das Gen *ATN1* kodiert das Protein Atrophin-1, welches als nukleärer Rezeptorkorepressor fungiert und durch Bindung an Transkriptionsregulatoren die Transkription beeinflussen kann. Eine aberrante Form von *ATN1* ist beim Menschen mit neurodegenerative Erkrankungen und Krebs assoziiert. Das Gen *ATN1* wurde als ursächlicher Faktor für die neurodegenerative Erkrankung Dentatorubral Pallidoluysian Atrophy (DRPLA) identifiziert. Die Anzahl der CAG-Trinukleotid-Wiederholungen (Glutamin kodierend) innerhalb des *ATN1*-Gens ist bei DRPLA-Patienten erhöht. Das Protein *ATN1* interagiert mit ETO/MTG8, einem transkriptionalen Koregulator, dessen Fusion mit *RUNX1* durch eine t(8;21)-Translokation die häufigste Ursache akuter myeloischer Leukämie (AML) ist. Die Assoziation zwischen ETO/MTG8 und transkriptionellen Korepressoren suggeriert, dass die transkriptionelle Repression der regulatorischen *RUNX1*-Signalwege durch die ETO-*RUNX1*-Proteinfusion eine Ursache für die AML-Pathogenese darstellt [78].

Die nach der 1 Gy Bestrahlung beim 2N-Zwilling gemessene früher einsetzende Hochregulation der mRNA-Expression von *ATN1* (Ergebnisse, Abbildung 11) könnte auf eine empfindlichere Reaktion bei Strahlenexposition hindeuten. Eine schnellere, verstärkte *ATN1*-Produktion könnte möglicherweise durch Repression der Transkription die DNA-Reparatur beim 2N-Zwilling KKR A24 ungünstig beeinflussen. Eine Rolle dieser schnelleren, empfindlichen mRNA-Erhöhung von *ATN1* nach Induktion bei der Tumorgenese ist allerdings unklar.

Für das bereits beschriebene (siehe Diskussion 4.3.3.1.) Tumorsuppressorgen *BRCA1*, wichtig für genomische Integrität und DNA-Reparatur, konnte nach der 1 Gy Bestrahlung beim 2N-Zwilling KKR A24 eine stärker schwankende mRNA-Expression detektiert werden (Ergebnisse, Abbildung 12), wohingegen die Expression des ge-

sunden Zwillings KKR D24 stabil und unverändert blieb. Zum Zeitpunkt 1 h und 4 h zeigten die Zellen des 2N-Zwillings ein erhöhtes *BRCA1*-Expressionsniveau und nach 12 h bzw. 24 h konnte eine verminderte Expression detektiert werden. Diese Beobachtungen sprechen für eine mögliche Deregulation der *BRCA1*-mRNA-Expression in den Zellen des 2N-Zwillings.

Das bereits beschriebene (siehe Diskussion 4.4.2.1.) Gen *KRT17*, welches das Kera-
tin 17 Protein kodiert, zeigte nach 1 Gy Strahlenexposition eine länger anhaltende, erhöhte mRNA-Expression beim 2N Zwilling im Vergleich zum gesunden Zwilling (Ergebnisse, Abbildung 13). Dies könnte möglicherweise für einen Zusammenhang mit der Krebsprädisposition beim 2N-Zwilling sprechen, da in Krebsgewebe die Hochregulation von *KRT17* beobachtet wurde [74].

Bei den basalen mRNA-Expressionsunterschieden zwischen den Zwillingen wurde auch das potentielle Tumorsuppressorgen *SIRT2*, das für das dem Zytoskelett angehörende Protein Sirtuin 2 kodiert, bereits beschrieben (siehe Diskussion 4.4.2.1.). Die Zwillinge zeigten 1h nach der 1 Gy Strahlenexposition eine starke Herunterregulation der *SIRT2*-mRNA-Expression (Ergebnisse, Abbildung 14), wobei die Expression beim 2N-Zwilling im Vergleich zum Ausgangsexpressionsniveau stärker reduziert war. Nach 4 h und 12 h fand sich im Vergleich zum gesunden Zwilling, der eine Hochregulation der *SIRT2*-Expression zeigte, beim 2N-Zwilling keine Regulation. Diese ausbleibende Hochregulation der *SIRT2*-mRNA-Expression nach der Bestrahlung könnte möglicherweise einen regulatorischen Nachteil in den Zellen des 2N-Zwillings bedeuten, da eine verminderte Expression von *SIRT2* bei Krebs bereits nachgewiesen wurde [77].

Die veränderte Regulation der vier Gene *ATN1*, *BRCA1*, *KRT17* und *SIRT2*, die beim 2N-Zwilling auffällige Unterschiede in der mRNA-Expression nach 1 Gy Bestrahlung zeigten, könnte auf eine potentiell krebsbegünstigende Wirkung hindeuten und zu einem erhöhten Krebsrisiko des 2N-Zwillings KKR A24 beitragen.

4.4.3. Proteinexpression

4.4.3.1. Basale und induzierte Proteinexpression

Die Analyse der basalen und induzierten Proteinexpression mittels Antikörper-Microarrays ergab, dass die Zwillinge, 2N-Proband KKR A24 und sein monozygoter gesunder Zwilling KKR D24, stärkere Unterschiede in der nukleären Expression der Proteine ERCC1, BRCA1 und ATM sowohl konstitutiv als auch nach der 1 Gy Bestrahlung aufwiesen (Ergebnisse, Abbildung 21-24).

Das Gen *ERCC1* zeigte eine leicht erniedrigte konstitutive Proteinexpression und 1 h nach der 1 Gy Bestrahlung eine stärkere Herunterregulation der Expression beim 2N-Zwilling im Vergleich zum gesunden Zwilling. Eine Korrelation mit der *ERCC1*-mRNA-Expression kann nicht hergestellt werden, da sie nicht bestimmt worden war. Beim 2N-Zwilling im Vergleich zum gesunden Zwilling fand sich für das Gen *BRCA1* eine leicht erniedrigte konstitutive Proteinexpression und 1 h nach der 1 Gy Bestrahlung eine deutlich stärker erhöhte Proteinmenge. Dieses Ergebnis wird durch die *BRCA1*-mRNA-Expressionsmessung (Ergebnisse, Abbildung 12) unterstützt. Die *BRCA1*-Proteinmenge 4 h nach der Bestrahlung war bei beiden Zwillingen wieder ähnlich dem konstitutiven Status und konnte, möglicherweise aufgrund der verschiedenen Messtechniken und des nur geringen mRNA-Expressionsunterschieds, nicht mit der erhöhten *BRCA1*-mRNA-Expression beim 2N-Zwilling 4 h nach Bestrahlung korreliert werden.

Die konstitutive Expression des Proteins ATM war beim 2N-Zwilling verglichen mit dem gesunden Zwilling leicht erhöht. Zum Zeitpunkt 1 h nach der 1 Gy Bestrahlung wurde eine größere Differenz zwischen den Zwillingen festgestellt; der 2N-Zwilling KKR A24 zeigte eine leichte Erhöhung der ATM-Proteinexpression, wogegen der gesunde Zwilling KKR D24 eine starke Reduktion des ATM-Proteinlevels aufwies. Beim Vergleich der basalen *ATM*-mRNA-Expression konnte kein Unterschied zwischen den Zwillingen detektiert werden und eine *ATM*-mRNA-Expressionsmessung nach Induktion wurde nicht durchgeführt.

Das Genprodukt von *ERCC1* (Excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 1) hat eine wichtige Funktion in der Nukleotidexzisionsreparatur und wird hier vor allem für die DNA-Reparatur von DNA-Läsionen, die durch UV-Licht oder elektrophile Substanzen wie Cisplatin hervorgerufen werden,

benötigt. Das Protein ERCC1 bildet ein Heterodimer mit ERCC4 und ist auch bei der DNA-Rekombinations-Reparatur und der Reparatur von Interstrand-Crosslinks beteiligt. Mutationen im Gen *ERCC1* führen zu dem Cerebrooculofacioskeletal-Syndrom. Polymorphismen in *ERCC1* führen zu einer veränderten Genexpression, die vermutlich eine Rolle in der Karzinogenese spielt. Es wurde in Studien die mRNA- und Proteinexpression von ERCC1 in humanen Tumoren (z. B. Hodenkrebs, Lungenkrebs) untersucht und festgestellt, dass die Krebspatienten ein niedrigeres Level an ERCC1 aufwiesen und dass eine höhere ERCC1-Expression eine bessere Überlebensrate bedeutete [79,80,81]. Aufgrund dieser Literatur zu ERCC1 spricht die reduzierte ERCC1-Proteinexpression für einen potentiellen DNA-Reparaturnachteil beim 2N-Zwilling.

Das Protein BRCA1, welches bereits erwähnt wurde (siehe Diskussion 4.3.3.1.), ist ein wichtiger Tumorsuppressor, der bei der Regulation der Transkription, der Zellzykluskontrolle, der DNA-Doppelstrangbruchreparatur und der Rekombination mitwirkt. Die Inaktivierung von BRCA1 spielt eine wichtige Rolle bei der Karzinogenese von Brust- und Lungenkrebs [80,82,83]. Bei Betrachtung unserer Ergebnisse spricht die konstitutiv niedrigere BRCA1-Proteinexpression beim 2N-Zwilling also für eine Tumorprädisposition. 1 h nach 1 Gy Bestrahlung zeigt allerdings der 2N-Zwilling im Vergleich zum gesunden Zwilling eine stärkere Hochregulation der Proteinexpression des Tumorsuppressors BRCA1, was wiederum nicht für einen DNA-Reparaturnachteil sprechen würde, aber möglicherweise für eine Fehlregulation der BRCA1-Expression.

Das Protein ATM (Ataxia telangiectasia mutated) ist eine wichtige Zellzyklus-Checkpoint-Kinase, die viele Proteine reguliert, u.a. die Tumorsuppressorproteine p53 und BRCA1 sowie das Zellzyklus-Checkpoint-Protein RAD9A. Das Protein ATM bildet mit der Kinase ATR vermutlich das Hauptkontrollsystem, welches zur zellulären Antwort auf DNA-Schäden und für genomische Stabilität benötigt wird. Mutationen im Gen *ATM* sind assoziiert mit Ataxia telangiectasia, einer autosomal-rezessiven DNA-Reparatur-Erkrankung. Deletionen in dieser Region sind mit dem Mantelzell-Lymphom, einem B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphom (B-NHL), assoziiert [84,85]. Eine erhöhte ATM-Genexpression wurde in primären Fibroblasten von Fanconi-Anämie-Patienten (FANCA) gefunden [86]. Fanconi-Anämie, eine autosomal-rezessive Erkrankung, wird durch einen genetischen Defekt hervorgerufen, der zu einer erhöhten Chromosomenbrüchigkeit führt. Interessant ist in diesem Zusammenhang die erhöhte

ATM-Genexpression beim 2N-Zwilling im Vergleich zum Kontrollzwilling; die Fibroblasten des 2N-Zwillings zeigten bei unseren Analysen sowohl konstitutiv als auch nach Bestrahlung eine erhöhte ATM-Proteinexpression.

4.4.4. DNA-Methylierung

Bei der DNA-Methylierungsanalyse des *BRCA1*-Promotors wurde ein auffällig erhöhter Methylierungsgrad von ca. 10% beim 2N-Zwilling KKR A24 gefunden. Der gesunde Zwilling KKR D24, sowie allen anderen Probanden und Kontrollen zeigten eine Hypomethylierung zwischen 0% und 6% (Ergebnisse, Abbildung 26). Durch klassische Bisulfit-Sequenzierung konnte gezeigt werden, dass es sich bei der 10%-igen *BRCA1*-Methylierung des 2N-Zwillings um eine Mischung aus ca. 90% hypomethylierter Allele und ca. 10% hypermethylierter Allele in den Fibroblasten des 2N-Zwillings handelt, was für ein Zellmosaik spricht. Nach 1 Gy Bestrahlung der Fibroblasten der Zwillinge trat keine Änderung des *BRCA1*-Methylierungsgrades auf (Ergebnisse, Abbildung 27); der 2N-Zwilling zeigte in allen Proben eine ca. 10%ige Methylierung und der gesunde Zwilling zeigte niedrigere, hypomethylierte Werte von 0-5% Methylierung. Daraus lässt sich schließen, dass eine 1 Gy Bestrahlung von primären Zellen die Methylierung von *BRCA1* nicht verändert und die erhöhte Methylierung in den Zellen des 2N-Zwillings nicht strahleninduziert ist. Dieses Ergebnis passt zu der Tatsache, dass der 2N-Zwilling KKR A24 bei seiner Ersttumor Erkrankung ALL keine Radiotherapie erhalten hat.

Das Vorliegen einer Hypermethylierung von *BRCA1* in somatischen Zellen des 2N-Zwillings stellt eine Krebsprädisposition dar. *BRCA1* spielt eine wichtige Rolle in der DNA-Reparatur, insbesondere nach DNA-Schädigung. Eine *BRCA1*-Hypermethylierung korreliert mit einer reduzierten mRNA- und Proteinexpression. Es ist bekannt, dass eine erhöhte konstitutionale *BRCA1*-Promotermethylierung für Brust- und Ovarialkrebs prädisponiert. Bei einer Patientin mit Brust- und Ovarialkrebs, aber ohne *BRCA1/BRCA2*-Sequenzmutation, wurde eine 10%-ige *BRCA1*-Methylierung im Blut festgestellt, d.h. ca. 20% der Zellen trügen ein methyliertes Allel [87]. Solche Mosaik der *BRCA1*-Methylierung wurden in somatischem Gewebe bei einigen Brustkrebspatientinnen detektiert. Die Promotormethylierung, welche zur Inaktivierung von *BRCA1* führt, kann in der Keimbahn oder durch ein frühes somatisches Ereignis verursacht werden und stellt einen Risikofaktor für Brustkrebs dar [88].

Bei Untersuchungen der *BRCA1*-Expression in Patienten mit AML wurde festgestellt, dass bei therapieinduzierter akuter myeloischer Leukämie (t-AML) häufig eine auf Promotormethylierung zurückzuführende reduzierte Expression von *BRCA1* und eine erhöhte Rate an chromosomalen Translokationen und anderen Aberrationen bei den Patienten auftraten [89]. Somit stellt eine *BRCA1*-Hypermethylierung auch als Zellmosaik eine Krebsprädisposition dar und kann möglicherweise zu Erst- und Zweitumorentwicklung beitragen. Bei den Messungen der konstitutiven Expression wurde beim 2N-Zwilling eine leicht reduzierte *BRCA1*-Proteinexpression (Ergebnisse, Abbildung 21) festgestellt. Allerdings wurde bei dem 2N-Zwilling keine reduzierte *BRCA1*-mRNA-Expression gefunden. Wahrscheinlich reicht die Messgenauigkeit der RTq-PCR nicht aus, um ein 20%iges Mosaik der Zellen aufzulösen. Entscheidend für die DNA-Reparatur in der Zelle ist letztlich die Proteinexpression. Hier konnte eine reduzierte *BRCA1*-Proteinexpression beim 2N-Zwilling festgestellt werden. Eine Korrelation oder Interpretation der mRNA- und Proteinexpressionsmessung nach 1 Gy Strahlendosis war schwierig, da der 2N-Zwilling hier zu Beginn die höhere Expression zeigte. Möglicherweise könnte dies für eine Fehlregulation der *BRCA1*-Expression beim 2N-Zwilling sprechen.

Zusammenfassend konnte beim 2N-Zwilling KKR A24 als möglicher Krebsrisikofaktor eine *BRCA1*-Hypermethylierung in ca. 20% seiner primären Fibroblasten und eine damit assoziierte, konstitutiv reduzierte *BRCA1*-Proteinexpression nachgewiesen werden.

4.4.5. DNA-Reparaturkinetik

Um einen möglichen Defekt in der DNA-Reparaturkinetik und Kapazität des 2N-Zwillings aufzudecken, wurden die primären, subkonfluenten Fibroblastenzellkulturen der Zwillinge nach Induktion von DNA-Schäden durch ionisierende Strahlung, UV-C-Strahlung und das Chemotherapeutikum Daunorubicin mit Hilfe des halbautomatisierten γ H2AX-Foci-Zählverfahrens untersucht.

Im gegebenen Versuchsaufbau konnte nach DNA-Schädigung durch 1 Gy Bestrahlung (Ergebnisse, Abbildung 29) kein Defekt in der Reparaturantwort des 2N-Zwillings KKR A24 festgestellt werden. Beide Zwillinge zeigten, wie alle anderen untersuchten Proben, anhand der Foci-Zahlen einen normalen Reparaturverlauf. Da

durch die Messungen strahleninduzierte Doppelstrangbrüche (DSBs) nachgewiesen wurden, deren Reparatur zellzyklusabhängig durch Nicht-homologes Endjoining (NHEJ) oder Homologe Rekombination (HR) stattfindet [61,62], kann davon ausgegangen werden, dass weder der 2N-Zwilling KKR A24 noch der gesunde Zwilling KKR D24 einen essentiellen Defekt in der NHEJ- und HR-DNA-Reparatur aufweist.

Nach DNA-Schädigung durch UV-C-Bestrahlung (Ergebnisse, Abbildung 30) zeigten die Zellen der Zwillinge zunächst einen langsamen Anstieg und anschließend einen Abfall der Foci-Zahlen über die Zeit, sodass bei beiden Zwillingen DNA-Reparatur stattzufinden scheint. Die einzige, größere Auffälligkeit zwischen den Zwillingen lag 4 h nach der UV-C-Bestrahlung vor. Der Versuch war aber trotz Wiederholungen mit einer hohen Messgenauigkeit behaftet, sodass kein deutlicher Unterschied in der DNA-Reparatur nach UV-C-Bestrahlung zwischen den Zwillingen nachgewiesen werden konnte. In den Zellen beider Zwillinge wurde 24 h nach der Bestrahlung noch eine erhöhte Anzahl der verbleibenden Foci pro Zellkern (ca. 12 Foci) detektiert. Anders als radioaktive Strahlung induziert die artifizielle kurzwellige UV-C-Strahlung nicht direkt DSBs, sondern führt über unreparierte Läsionen während der DNA-Replikation zur Bildung und Akkumulation von DSBs [90]. Diese Foci-Bildung ist stark zellzyklusabhängig, sodass der Einsatz nicht-synchronisierter subkonfluenter Zellen in diesem Versuch wahrscheinlich den großen Messfehler erklärt. Die Messergebnisse ergaben keinen Hinweis auf eine ineffizientere DNA-Reparatur des 2N-Zwilling im Vergleich zum gesunden Zwilling nach UV-C-Schädigung. Dieses Pilotexperiment mit UV-C-Bestrahlung wurde deshalb nicht zur weiteren Untersuchung von Kontrollen und Probanden eingesetzt.

Nach DNA-Schädigung durch die Behandlung der Zellen beider Zwillinge mit Daunorubicin (DNR) konnte ein langsamer Anstieg der Foci-Zahlen über die Zeit beobachtet werden, aber kein Abfall (Ergebnisse, Abbildung 31). Nach 24 h blieb bei beiden Zwillingen eine große Zahl an Foci pro Zellkern (ca. 26 Foci) zurück, was darauf hindeutete, dass die Daunorubicin-Einwirkung über den Zellzyklus und die DNA-Replikation zu einer Akkumulation von DNA-Schäden führte. Das Anthracyclin Daunorubicin interkaliert zwischen den Nukleinsäuren der DNA und blockiert durch Inhibition der Topoisomerase II die Transkription und die Replikation der Zelle. Diese Wechselwirkungen von Daunorubicin führen zur Ausbildung und Akkumulation von

DSBs über den Zellzyklus [12]. Da die gemessenen Foci-Zahlen im Versuch mit Daunorubicin-Behandlung nicht zurückgingen, wurden hier nur DNA-Schäden detektiert, die bei beiden Zwillingen vergleichbar hoch waren, aber keine Reparaturvorgänge beobachtet. Zur DNA-Reparaturdetektion hätten spätere Zeitpunkte untersucht werden müssen. Dieser Pilotversuch der Daunorubicin-Behandlung wurde nicht zur weiteren Analyse von Kontrollen und Probanden herangezogen.

4.4.6. DNA-Kopienzahlvariationen

Um möglicherweise krankheitsrelevante Deletionen und Duplikationen der DNA des 2N-Zwilling KKR A24 im Vergleich zum gesunden Zwilling KKR D24 aufzuspüren, wurde die genomische DNA aus den unbehandelten Fibroblasten der Zwillinge mittels Affymetrix SNP-Arrays untersucht. Hierbei fanden sich einige auffällige Regionen in der genomischen DNA des 2N-Zwilling, die anschließend mittels FISH und/oder genomischer qPCR validiert wurden (Ergebnisse, Tabelle 13-14). Die heterozygote Deletion von ca. 184 kb im Bereich 6q22.33, die das Gen *RSPO3* teilweise (Promotor und Exon 1) deletiert, konnte mittels FISH in den Fibroblasten des 2N-Zwilling KKR A24 in einem Teil der Zellen nachgewiesen werden. Im Vergleich zum gesunden Zwilling KKR D24 zeigten hier ca. 20% der Zellen des 2N-Probanden KKR A24 (2N) nur ein Signal, was auf ein mögliches Zellmosaik hinweist. In der genomischen qPCR konnte mit zwei verschiedenen Detektionsverfahren für den im SNP-Array als deletiert angezeigten Bereich in 6q22.33 erniedrigte Messwerte beim 2N-Zwilling detektiert werden (Ergebnisse, Tabelle 13 und Abbildung 33). Dieses Ergebnis ist keine Bestätigung einer Deletion, spricht aber wiederum für das Vorliegen eines somatischen Zellmosaiks bei dem 2N-Probanden KKR A24. Die qPCR-Validierung von zusätzlichen CNVs aus dem SNP-Array lieferte auch für das Gen *C5orf13* erniedrigte Messwerte (Ergebnisse, Abbildung 33). Dies untermauert die These, dass ein gewisser Anteil der Zellen des 2N-Zwilling KKR A24 CNVs zeigt. Die Auswirkungen von Deletionen im Bereich von *RSPO3* und *C5orf13/P311* wurden bislang nicht beschrieben.

Das Gen *RSPO3*, welches das R-Spondin-3-Protein kodiert, wurde schon in der Diskussion erwähnt (siehe Diskussion 4.4.2.1.), da der 2N-Zwilling für *RSPO3* in der RTq-PCR eine niedrigere konstitutive mRNA-Expression im Vergleich zu seinem gesunden Zwilling gezeigt hat. *RSPO3* spielt eine Rolle in der Tumorentwicklung. Die

teilweise Deletion des *RSPO3*-Gens im somatischen Zellmosaik in den primären Fibroblasten des 2N-Zwillings könnte ursächlich für die gemessene niedrigere mRNA-Expression von *RSPO3* (-2,79x) sein und zur erhöhten Krebsprädisposition beim 2N-Zwilling beitragen.

Das Gen *C5orf13/P311* (Chromosome 5 open reading frame 13) kodiert ein Protein, das noch keiner Proteinfamilie zugeordnet wurde und dessen Funktionen sowie Signalwege unklar sind. In humanen Fibroblasten ist die Funktion von *C5orf13/P311* unbekannt, aber in der Untersuchung hypertropher Narbenbildung wurde eine hochregulierte *C5orf13/P311*-Expression detektiert. Außerdem ist eine Überexpression von *C5orf13/P311* mit einem erhöhten Level an *TGFB1* und *COL1A1* assoziiert. Das Gen *TGFB1* wird häufig in Tumorzellen hochreguliert [91]. Die *C5orf13*-Expression spielt eventuell eine Rolle in der Entwicklung von Lungenkrebs [92]. Die Krebsassoziation für das Gen *C5orf13/P311* ist unklar. In dieser Studie wurden keine Expressionsdaten bezüglich *C5orf13/P311* für die Zwillinge erhoben. Die möglicherweise in Mosaikform in den primären Fibroblasten des 2N-Zwillings vorhandene Deletion von *C5orf13/P311* könnte einen Krebsrisikofaktor für den 2N-Zwilling darstellen.

4.4.7. Ergebniszusammenfassung des Zwillingsvergleichs und mögliche Schlussfolgerungen

Die Untersuchungen des monozygoten Zwillingspaars lieferten einige deskriptive Hinweise für die erhöhte Krebsprädisposition des 2N-Probanden KKR A24 im Vergleich zu seinem gesunden monozygoten Zwilling KKR D24.

Für die Unterschiede der Zwillinge in der konstitutiven mRNA-Expression der Gene *KRT17* und *SIRT2* konnten keine eindeutigen Assoziationen mit Tumorentstehung und Krebs aufgezeigt werden. Möglicherweise liegt beim 2N-Zwilling eine leichte Fehl- oder Deregulation dieser Gene vor. Die niedrigere konstitutive mRNA-Expression von *RSPO3* beim 2N-Zwilling könnte krebsassoziiert und durch eine Deletion bedingt sein. Die veränderte Regulation der mRNA-Expression der Gene *ATN1*, *BRCA1*, *KRT17* und *SIRT2* nach 1 Gy Bestrahlung könnte laut der gefundenen Literatur im Zusammenhang mit der Tumorgenese stehen. Sowohl die niedrigere ERCC1- und *BRCA1*-Proteinexpression als auch die erhöhte ATM-Proteinexpression könnte die DNA-Reparatur des 2N-Zwillings beeinflussen.

Für das auffälligste Gen in der Probandengruppenanalyse, *RAD9A*, welches eine niedrigere mRNA- und Proteinexpression basal als auch induziert nach 1 Gray Bestrahlung in der 2N-Probandengruppe zeigte, konnten beim Zwillingsvergleich keine deutlichen Unterschiede in der mRNA- und/oder Proteinexpression festgestellt werden.

Nicht nur im Vergleich mit dem gesunden Zwilling, sondern auch mit allen anderen untersuchten Probanden, stellt die detektierte *BRCA1*-Hypermethylierung des 2N-Zwillings KKR A24 in ca. 20% seiner primären Fibroblasten ein besonders interessantes Ergebnis dar. Laut Literatur führt eine *BRCA1*-Hypermethylierung auch als Zellmosaik zu einer Krebsprädisposition und hat möglicherweise zur Tumorentwicklung des 2N-Zwillings beigetragen. Die 10%-ige *BRCA1*-Methylierung korreliert außerdem mit einer reduzierten konstitutiven *BRCA1*-Proteinexpression des 2N-Zwillings KKR A24.

Ein weiteres besonders beachtenswertes Ergebnis ist die teilweise Deletion des Gens *RSPO3*, die wahrscheinlich als somatisches Mosaik in ca. 20% der Zellen des 2N-Zwillings vorliegt. Diese im Zellmosaik vorliegende Deletion des Gens *RSPO3* könnte die beim 2N-Zwilling erniedrigte mRNA-Expression von *RSPO3* (-2,79x) erklären und ist vermutlich mit Krebs assoziiert sein.

Die Deletion des Gens *C5orf13/P311*, welche wahrscheinlich ebenfalls als somatisches Zellmosaik in den primären Fibroblasten des 2N-Zwillings vorliegt, könnte einen weiteren Krebsrisikofaktor für den 2N-Zwilling darstellen.

4.4.8. Ausblick Zwillingsvergleich

Zur Sicherung der Ergebnisse und zur Bestätigung des Mosaikstatus des 2N-Zwillings sollten die vermutlich ca. 20% aberranten Zellen des 2N-Zwillings KKR A24 in weiteren Studien noch genauer untersucht werden. Es ist geplant, klonale Zelllinien der aberranten Zellen zu etablieren, um genauere Aussagen über die Krebsprädisposition dieser Zellen machen zu können. Um einen möglichen somatischen Zellmosaikstatus des 2N-Zwillings KKR A24 zu bestätigen, könnten außerdem Next Generation Sequencing (NGS)-Methoden herangezogen werden.

5. Zusammenfassung

Die Ursachen der Zweittumorentwicklung bei Personen, die eine Krebserkrankung in der Kindheit überlebten, sind weitgehend unklar. Strahlenexposition oder Chemotherapie führen in normalen somatischen Zellen zu DNA-Schäden, welche bei fehlerhafter Reparatur eine Karzinogenese auslösen können. Es ist denkbar, dass genetische Unterschiede z. B. in den Signalwegen der Zellzykluskontrolle und der DNA-Reparatur nach therapieinduzierten DNA-Schäden eine entscheidende Rolle bei der Zweittumorentwicklung spielen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden 20 Personen, die eine Krebserkrankung in der Kindheit überlebten und einen unabhängigen Zweittumor entwickelten, mit 20 gematchten Kontrollpersonen ohne Zweittumorentwicklung verglichen. Die primären Fibroblasten der Patienten wurden auf somatische, genetische und/oder epigenetische Unterschiede in DNA-Reparaturnetzwerken untersucht. Die biologisch relevantesten Ergebnisse lieferten Proteinuntersuchungen mittels Antikörper-Microarrays. Hierbei wurde eine konstitutiv erniedrigte Menge an RAD9A und einigen anderen DNA-Reparatur-Proteinen (BRCA1, DDIT3, MSH6, p53, RAD51) in den Zweittumorpatienten im Vergleich zu den Eintumorpatienten festgestellt. Nach einer DNA-Schädigung durch 1 Gray Bestrahlung erhöhte sich die RAD9A-Proteinmenge, wobei die Zweittumorpatienten eine geringere Induktion als die Eintumorpatienten zeigten. Bei der Quantifizierung der mRNA-Expression mittels RTq-PCR wurde ein niedrigerer *RAD9A*-mRNA-Level sowohl in den unbehandelten und als auch in den 1 Gray bestrahlten Zellen der Zweittumorpatienten festgestellt. SNP-Array und Methylierungsanalysen konnten keine Auffälligkeiten im *RAD9A*-Lokus nachweisen. Diese Ergebnisse unterstützen die Hypothese, dass Modulationen von RAD9A und anderen Zellzyklusarrest- und DNA-Reparaturproteinen zum Risiko einer Zweittumorentwicklung in Kinderkrebspatienten beiträgt. Bei einem diskordanten monozygoten Zwillingsspaar wurde in ca. 20% der Zellen des Zweittumorzwillinges eine Hypermethylierung des Tumorsuppressorgens *BRCA1* festgestellt, die mit einer konstitutiv erniedrigten BRCA1-Proteinexpression einhergeht und einen möglichen Krebsrisikofaktor darstellt. Die partielle Deletion des Gens *RSPO3*, die wahrscheinlich als somatisches Zellmosaik beim Zweittumorzwilling vorliegt, korreliert mit einer niedrigeren *RSPO3*-mRNA-Expression und ist vermutlich auch mit einer erhöhten Krebsprädisposition assoziiert.

6. Literatur

- [1] Anand P, Kunnumakkara AB, Kunnumakara AB, Sundaram C, Harikumar KB, Tharakan ST, Lai OS, Sung B, Aggarwal BB. Cancer is a preventable disease that requires major lifestyle changes. *Pharm. Res.* 2008 Sept; 25 (9): 2097–116.
- [2] Kaatsch P. Epidemiology of childhood cancer. *Cancer Treat Rev.* 2010 Jun; 36 (4): 277-85.
- [3] Strahm B, Malkin D. Hereditary cancer predisposition in children: genetic basis and clinical implications. *Int J Cancer.* 2006 Nov 1; 119 (9): 2001-6.
- [4] Narod SA. Genetic epidemiology of childhood cancer. *Biochim Biophys Acta.* 1996 Dec 9; 1288 (3): F141-50.
- [5] Kony SJ, de Vathaire F, Chompret A, Shamsaldim A, Grimaud E, Raquin MA, Oberlin O, Brugieres L, Feunteun J, Eschwege F, Chavaudra J, Lemerle J, Bonaiti Pellie C. Radiation and genetic factors in the risk of second malignant neoplasms after a first cancer in childhood. *Lancet.* 1997 Jul 12; 350 (9071): 91-5.
- [6] Rahman N, Scott RH. Cancer genes associated with phenotypes in monoallelic and biallelic mutation carriers: new lessons from old players. *Hum Mol Genet.* 2007 Apr 15; 16 Spec No 1: R60-6.
- [7] Plon SE, Nathanson K. Inherited susceptibility for pediatric cancer. *Cancer J.* 2005 Jul-Aug; 11 (4): 255-67.
- [8] Kaatsch P. Das Deutsche Kinderkrebsregister im Umfeld günstiger Rahmenbedingungen (German Childhood Cancer Registry and its favorable setting). *Bundesgesundheitsbl - Gesundheitsforsch - Gesundheitsschutz.* 2004; 47 (5): 437-443.
- [9] Marnett LJ, Plataras JP. Endogenous DNA damage and mutation. *Trends Genet.* 2001 Apr; 17 (4): 214-21.
- [10] Friedberg EC. DNA damage and repair. *Nature.* 2003 Jan 23; 421 (6921): 436-40.
- [11] Strachan T, Read AP. *Molekulare Humangenetik.* 3. Aufl. München: Elsevier, Spektrum Akademischer Verlag; 2005: 400-1.
- [12] Przybylska M, Koceva-Chyla A, Rózga B, Józwiak Z. Cytotoxicity of daunorubicin in trisomic (+21) human fibroblasts: relation to drug uptake and cell membrane fluidity. *Cell Biol Int.* 2001; 25 (2): 157-70.
- [13] Sancar A, Lindsey-Boltz LA, Unsal-Kaçmaz K, Linn S. Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annu Rev Biochem.* 2004; 73: 39-85.
- [14] Staszewski O, Nikolova T, Kaina B. Kinetics of gamma-H2AX focus formation upon treatment of cells with UV light and alkylating agents. *Environ Mol Mutagen.* 2008 Dec; 49 (9): 734-40.
- [15] Wood RD, Mitchell M, Lindahl T. Human DNA repair genes, 2005. *Mutat Res.* 2005 Sep 4; 577 (1-2): 275-83.
- [16] Branzei D, Foiani M. Regulation of DNA repair throughout the cell cycle. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008 Apr; 9 (4): 297-308.
- [17] Edinger AL, Thompson CB. Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy. *Curr Opin Cell Biol.* 2004 Dec; 16 (6): 663-9.
- [18] Cohen SM, Ellwein LB. Genetic errors, cell proliferation, and carcinogenesis. *Cancer Res.* 1991 Dec 15; 51 (24): 6493-505.
- [19] Vogelstein B, Kinzler KW. Cancer genes and the pathways they control. *Nat Med.* 2004 Aug; 10 (8): 789-99.
- [20] Knudson AG. Cancer genetics. *Am J Med Genet.* 2002 Jul 22; 111 (1): 96-102.
- [21] Payne SR, Kemp CJ. Tumor suppressor genetics. *Carcinogenesis.* 2005 Dec; 26 (12): 2031-45.
- [22] Tost J. DNA methylation: an introduction to the biology and the disease-associated changes of a promising biomarker. *Mol Biotechnol.* 2010 Jan; 44 (1): 71-81.
- [23] Mund C, Lyko F. Epigenetic cancer therapy: Proof of concept and remaining challenges. *Bioessays.* 2010 Nov; 32 (11): 949-57.
- [24] Deutsches Krebsforschungszentrum. *Behandlungsverfahren bei Krebs: Eine Übersicht.* Zuletzt aktualisiert 10.08.2011 [zitiert am 27.08.2011]. URL: <http://www.krebsinformationsdienst.de/themen/behandlung/index.php>

- [25] Herdegen T. Kurzlehrbuch Pharmakologie und Toxikologie. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG; 2011: 307-22.
- [26] Infante-Rivard C, Mathonnet G, Sinnott D. Risk of childhood leukemia associated with diagnostic irradiation and polymorphisms in DNA repair genes. *Environ Health Perspect.* 2000 Jun; 108 (6): 495-8.
- [27] Boulton E, Cleary H, Papworth D, Plumb M. Susceptibility to radiation-induced leukaemia/lymphoma is genetically separable from sensitivity to radiation-induced genomic instability. *Int J Radiat Biol.* 2001 Jan; 77 (1): 21-9.
- [28] Kaatsch P, Reinisch I, Spix C, Berthold F, Janka-Schaub G, Mergenthaler A, Michaelis J, Blettner M. Case-control study on the therapy of childhood cancer and the occurrence of second malignant neoplasms in Germany. *Cancer Causes Control.* 2009 Aug; 20 (6): 965-80.
- [29] Jaehde U, Kloft C. Zytostatika maßgeschneidert dosieren, Dosis-Individualisierung in der Krebs-Chemotherapie. *Pharm. Unserer Zeit.* 2006; 2 (35): 150-6.
- [30] Buness A, Huber W, Steiner K, Sülthmann H, Poustka A. ArrayMagic: two-colour cDNA microarray quality control and preprocessing. *Bioinformatics.* 2005 Feb 15; 21 (4): 554-6.
- [31] Benjamini Y, Hochberg Y. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *Journal of the Royal Statistic Society. Series B (Method).* 1995; 57 (1): 298-300.
- [32] Komatsu K, Wharton W, Hang H, Wu C, Singh S, Lieberman HB, Pledger WJ, Wang HG. PCNA interacts with hHus1/hRad9 in response to DNA damage and replication inhibition. *Oncogene.* 2000 Nov 2; 19 (46): 5291-7.
- [33] De Haro LP, Wray J, Williamson EA, Durant ST, Corwin L, Gentry AC, Osheroff N, Lee SH, Hromas R, Nickoloff JA. Metnase promotes restart and repair of stalled and collapsed replication forks. *Nucleic Acids Res.* 2010 Sep 1; 38 (17): 5681-91.
- [34] Cheadle C, Vawter MP, Freed WJ, Becker KG. Analysis of microarray data using Z score transformation. *J Mol Diagn.* 2003 May; 5 (2): 73-81.
- [35] The Holmgren Lab. DNA Isolation From BAC & PAC Clones. Last updated 11.08.2010 [zitiert am 20.05.2011]. URL: www.biochem.northwestern.edu/holmgren/protocols/DNA_Isolation_From_BAC2.doc
- [36] Kis E, Szatmári T, Keszei M, Farkas R, Esik O, Lumniczky K, Falus A, Sáfrány G. Microarray analysis of radiation response genes in primary human fibroblasts. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2006 Dec 1; 66 (5): 1506-14.
- [37] Kendzierski CM, Zhang Y, Lan H, Attie AD. The efficiency of pooling mRNA in microarray experiments. *Biostatistics.* 2003; 4 (3): 465-77.
- [38] Weinert BT, Timiras PS. Invited review: Theories of aging. *J Appl Physiol.* 2003 Oct; 95 (4): 1706-16.
- [39] Al-Khodairy FM, Kunhi M, Siddiqui YM, Arif JM, Al-Ahdal MN, Hannan MA. Defective repair of UV-induced DNA damage in cultured primary skin fibroblasts from Saudi thyroid cancer patients. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2004 Apr-Jun; 5 (2): 139-43.
- [40] Chuang EY, Chen X, Tsai MH, Yan H, Li CY, Mitchell JB, Nagasawa H, Wilson PF, Peng Y, Fitzek MM, Bedford JS, Little JB. Abnormal gene expression profiles in unaffected parents of patients with hereditary-type retinoblastoma. *Cancer Res.* 2006 Apr 1; 66 (7): 3428-33.
- [41] Victor A, Elsässer A, Hommel G, Blettner M. Judging a plethora of p-values: how to contend with the problem of multiple testing-part 10 of a series on evaluation of scientific publications. *Dtsch Arztebl Int.* 2010 Jan; 107 (4): 50-6.
- [42] Percy ME, Wong S, Bauer S, Liaghati-Nasseri N, Perry MD, Chauthaiwale VM, Dhar M, Joshi JG. Iron metabolism and human ferritin heavy chain cDNA from adult brain with an elongated untranslated region: new findings and insights. *Analyst.* 1998 Jan; 123 (1): 41-50.
- [43] Broxmeyer HE, Bognacki J, Dorner MH, de Sousa M. Identification of leukemia-associated inhibitory activity as acidic isoferritin: a regulatory role for acidic ferritins in the production of granulocytes and macrophages. *J. Exp. Med.* 1981 Jun 1; 153 (6): 1426-44.
- [44] Grzmil M, Voigt S, Thelen P, Hemmerlein B, Helmke K, Burfeind P. Up-regulated expression of the MAT-8 gene in prostate cancer and its siRNA-mediated inhibition of expression induces a decrease in proliferation of human prostate carcinoma cells. *Int J Oncol.* 2004 Jan; 24 (1): 97-105.

- [45] Johnson DG, Walker CL. Cyclins and cell cycle checkpoints. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1999; 39: 295-312.
- [46] Abukhdeir AM, Park BH. p21 and p27: roles in carcinogenesis and drug resistance. *Expert Rev Mol Med.* 2008 Jul 1; 10: e19.
- [47] Healy J, Belangere H, Beaulieu P, Lariviere M, Labuda D, Sinnott D. Promotor SNPs in the G1/S checkpoint regulators and their impact on susceptibility to childhood leukaemia. *Blood.* 2007 Jan 15; 109 (2): 683-92.
- [48] Lieberman HB, Bernstock JD, Broustas CG, Hopkins KM, Leloup C, Zhu A. The role of RAD9 in tumorigenesis. *J Mol Cell Biol.* 2011 Feb; 3 (1): 39-43.
- [49] Lieberman HB. Rad9, an evolutionarily conserved gene with multiple functions for preserving genomic integrity. *J Cell Biochem.* 2006 Mar 1; 97 (4): 690-7.
- [50] Guo WF, Lin RX, Huang J, Zhou Z, Yang J, Guo GZ, Wang SQ. Identification of differentially expressed genes contributing to radioresistance in lung cancer cells using microarray analysis. *Radiat Res.* 2005 Jul; 164 (1): 27-35.
- [51] Boulton SJ. Cellular functions of the BRCA tumour-suppressor proteins. *Biochem Soc Trans.* 2006 Nov; 34 (Pt 5): 633-45.
- [52] Richardson C. RAD51, genomic stability, and tumorigenesis. *Cancer Lett.* 2005 Feb 10; 218 (2): 127-39.
- [53] Schild D, Wiese C. Overexpression of RAD51 suppresses recombination defects: a possible mechanism to reverse genomic instability. *Nucleic Acids Res.* 2010 Mar; 38 (4): 1061-70.
- [54] Levine AJ, Oren M. The first 30 years of p53: growing ever more complex. *Nat Rev Cancer.* 2009 Oct; 9 (10): 749-58.
- [55] Silva FC, Valentin MD, Ferreira Fde O, Carraro DM, Rossi BM. Mismatch repair genes in Lynch syndrome: a review. *Sao Paulo Med J.* 2009 Jan; 127 (1): 46-51.
- [56] Lau PJ, Kolodner RD. Transfer of the MSH2.MSH6 complex from proliferating cell nuclear antigen to mispaired bases in DNA. *J Biol Chem.* 2003 Jan 3; 278 (1): 14-7.
- [57] Nishio J. Contributions of cytogenetics and molecular cytogenetics to the diagnosis of adipocytic tumors. *J Biomed Biotechnol.* 2011; 2011: 524067.
- [58] Wang YL, Qian J, Lin J, Yao DM, Qian Z, Zhu ZH, Li JY. Methylation status of DDIT3 gene in chronic myeloid leukemia. *J Exp Clin Cancer Res.* 2010 May 23; 29: 54.
- [59] Zhou J, Cao J, Lu Z, Liu H, Deng D. A 115-bp MethyLight assay for detection of p16 (CDKN2A) methylation as a diagnostic biomarker in human tissues. *BMC Med Genet.* 2011 May 13; 12 (1): 67.
- [60] Cheng CK, Chow LW, Loo WT, Chan TK, Chan V. The cell cycle checkpoint gene Rad9 is a novel oncogene activated by 11q13 amplification and DNA methylation in breast cancer. *Cancer Res.* 2005; 65: 8646-54.
- [61] Kuo LJ, Yang LX. Gamma-H2AX - a novel biomarker for DNA double-strand breaks. *In Vivo.* 2008 May-Jun; 22 (3): 305-9.
- [62] Rothkamm K, Krüger I, Thompson LH, Löbrich M. Pathways of DNA double-strand break repair during the mammalian cell cycle. *Mol Cell Biol.* 2003 Aug; 23 (16): 5706-15.
- [63] Han S, Lee KM, Park SK, Lee JE, Ahn HS, Shin HY, Kang HJ, Koo HH, Seo JJ, Choi JE, Ahn YO, Kang D. Genome-wide association study of childhood acute lymphoblastic leukemia in Korea. *Leuk Res.* 2010 Oct; 34 (10): 1271-4.
- [64] Hopkins KM, Auerbach W, Wang XY, Hande MP, Hang H, Wolgemuth DJ, Joyner AL, Lieberman HB. Deletion of mouse rad9 causes abnormal cellular responses to DNA damage, genomic instability, and embryonic lethality. *Mol Cell Biol.* 2004 Aug; 24 (16): 7235-48.
- [65] Dang T, Bao S, Wang XF. Human Rad9 is required for the activation of S-phase checkpoint and the maintenance of chromosomal stability. *Genes Cells.* 2005 April; 10 (4): 287-95.
- [66] Pandita RK, Sharma GG, Laszlo A, Hopkins KM, Davey S, Chakhparonian M, Gupta A, Wellinger RJ, Zhang J, Powell SN, Roti Roti JL, Lieberman HB, Pandita TK. Mammalian Rad9 plays a role in telomere stability, S- and G2-phase-specific cell survival, and homologous recombinational repair. *Mol Cell Biol.* 2006 Mar; 26 (5): 1850-64.

- [67] Hu Z, Liu Y, Zhang C, Zhao Y, He W, Han L, Yang L, Hopkins KM, Yang X, Lieberman HB, Hang H. Targeted deletion of Rad9 in mouse skin keratinocytes enhances genotoxin-induced tumor development. *Cancer Res.* 2008 Jul 15; 68 (14): 5552-61.
- [68] Maniwa Y, Yoshimura M, Bermudez VP, Yuki T, Okada K, Kanomata N, Ohbayashi C, Hayashi Y, Hurwitz J, Okita Y. Accumulation of hRad9 protein in the nuclei of nonsmall cell lung carcinoma cells. *Cancer.* 2005 Jan 1; 103 (1): 126-32.
- [69] Kebebew E, Peng M, Reiff E, Duh QY, Clark OH, McMillan A. Diagnostic and prognostic value of cell-cycle regulatory genes in malignant thyroid neoplasms. *World J Surg.* 2006 May; 30 (5): 767-74.
- [70] Zhu A, Zhang X, Lieberman HB. Rad9 has a functional role in human prostate carcinogenesis. *Cancer Res.* 2008 Mar 1; 68 (5): 1267-74.
- [71] Munshi NC, Hideshima T, Carrasco D, Shamma M, Auclair D, Davies F, Mitsiades N, Mitsiades C, Kim RS, Li C, Rajkumar SV, Fonseca R, Bergsagel L, Chauhan D, Anderson KC. Identification of genes modulated in multiple myeloma using genetically identical twin samples. *Blood.* 2004 Mar 1; 103 (5): 1799-806.
- [72] McLean WH, Rugg EL, Lunny DP, Morley SM, Lane EB, Swensson O, Dopping-Hepenstal PJ, Griffiths WA, Eady RA, Higgins C, Navsaria HA, Leigh IM, Strachan T, Kunkeler L, Munro CS. Keratin 16 and keratin 17 mutations cause pachyonychia congenita. *Nat Genet.* 1995 Mar; 9 (3): 273-8.
- [73] Depianto D, Kerns ML, Dlugosz AA, Coulombe PA. Keratin 17 promotes epithelial proliferation and tumor growth by polarizing the immune response in skin. *Nat Genet.* 2010 Oct; 42 (10): 910-4.
- [74] Kolokythas A, Schwartz JL, Pytynia KB, Panda S, Yao M, Homann B, Sroussi HY, Epstein JB, Gordon SC, Adami GR. Analysis of RNA from brush cytology detects changes in B2M, CYP1B1 and KRT17 levels with OSCC in tobacco users. *Oral Oncol.* 2011 Jun; 47 (6): 532-6.
- [75] Kazanskaya O, Ohkawara B, Herault M, Wu W, Maltry N, Augustin HG, Niehrs C. The Wnt signaling regulator R-spondin 3 promotes angioblast and vascular development. *Development.* 2008 Nov; 135 (22): 3655-64.
- [76] Theodorou V, Kimm MA, Boer M, Wessels L, Theelen W, Jonkers J, Hilkens J. MMTV insertional mutagenesis identifies genes, gene families and pathways involved in mammary cancer. *Nat Genet.* 2007 Jun; 39 (6): 759-69.
- [77] Hiratsuka M, Inoue T, Toda T, Kimura N, Shirayoshi Y, Kamitani H, Watanabe T, Ohama E, Tahimic CG, Kurimasa A, Oshimura M. Proteomics-based identification of differentially expressed genes in human gliomas: down-regulation of SIRT2 gene. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003 Sep 26; 309 (3): 558-66.
- [78] Wang L, Tsai CC. Atrophin proteins: an overview of a new class of nuclear receptor corepressors. *Nucl Recept Signal.* 2008; 6: e009.
- [79] Gossage L, Madhusudan S. Current status of excision repair cross complementing-group 1 (ERCC1) in cancer. *Cancer Treat Rev.* 2007 Oct; 33 (6): 565-77.
- [80] Planchard D, Lorient Y, Goubar A, Commo F, Soria JC. Differential expression of biomarkers in men and women. *Semin Oncol.* 2009 Dec; 36 (6): 553-65.
- [81] De Castro G Jr, Pasini FS, Siqueira SA, Ferraz AR, Villar RC, Snitcovsky IM, Federico MH. ERCC1 protein, mRNA expression and T19007C polymorphism as prognostic markers in head and neck squamous cell carcinoma patients treated with surgery and adjuvant cisplatin-based chemoradiation. *Oncol Rep.* 2011 Mar; 25 (3): 693-9.
- [82] Mullan PB, Quinn JE, Harkin DP. The role of BRCA1 in transcriptional regulation and cell cycle control. *Oncogene.* 2006 Sep 25; 25 (43): 5854-63.
- [83] Yoshikawa K, Honda K, Inamoto T, Shinohara H, Yamauchi A, Suga K, Okuyama T, Shimada T, Kodama H, Noguchi S, Gazdar AF, Yamaoka Y, Takahashi R. Reduction of BRCA1 protein expression in Japanese sporadic breast carcinomas and its frequent loss in BRCA1-associated cases. *Clin Cancer Res.* 1999 Jun; 5 (6): 1249-61.
- [84] Kurz EU, Lees-Miller SP. DNA damage-induced activation of ATM and ATM-dependent signaling pathways. *DNA Repair (Amst).* 2004 Aug-Sep; 3 (8-9): 889-900.

- [85] Fernández V, Hartmann E, Ott G, Campo E, Rosenwald A. Pathogenesis of mantle-cell lymphoma: all oncogenic roads lead to dysregulation of cell cycle and DNA damage response pathways. *J Clin Oncol*. 2005 Sep 10; 23 (26): 6364-9.
- [86] Yamamoto K, Nihrane A, Aglipay J, Sironi J, Arkin S, Lipton JM, Ouchi T, Liu JM. Upregulated ATM gene expression and activated DNA crosslink-induced damage response checkpoint in Fanconi anemia: implications for carcinogenesis. *Mol Med*. 2008 Mar-Apr; 14 (3-4): 167-74.
- [87] Wong EM, Southey MC, Fox SB, Brown MA, Dowty JG, Jenkins MA, Giles GG, Hopper JL, Dobrovic A. Constitutional methylation of the BRCA1 promoter is specifically associated with BRCA1 mutation-associated pathology in early-onset breast cancer. *Cancer Prev Res (Phila)*. 2011 Jan; 4 (1): 23-33.
- [88] Snell C, Krypuy M, Wong EM; kConFab investigators, Loughrey MB, Dobrovic A. BRCA1 promoter methylation in peripheral blood DNA of mutation negative familial breast cancer patients with a BRCA1 tumour phenotype. *Breast Cancer Res*. 2008; 10 (1): R12.
- [89] 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. Reduced BRCA1 expression due to promoter hypermethylation in therapy-related acute myeloid leukaemia. *Br J Cancer*. 2006 Oct 23; 95 (8): 1108-13.
- [90] Staszewski O, Nikolova T, Kaina B. Kinetics of gamma-H2AX focus formation upon treatment of cells with UV light and alkylating agents. *Environ Mol Mutagen*. 2008 Dec; 49 (9): 734-40.
- [91] Tan J, Peng X, Luo G, Ma B, Cao C, He W, Yuan S, Li S, Wilkins JA, Wu J. Investigating the role of P311 in the hypertrophic scar. *PLoS One*. 2010 Apr 9; 5 (4): e9995.
- [92] Tang CL, Yuan SZ, Yang HP, Wang QL, Zhang R. Expression and significance of P311 and ITGB4BP in non-small cell lung cancer. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi*. 2010 Jul; 32 (7): 526-8.

7. Anhang

7.1. Detaillierte Tabelle der KKR-Patienten:

Probanden mit Krebs im Kindesalter und einem Zweittumor (2N) sind mit **A** bezeichnet, und die dazu passenden Probanden (matched pairs) ohne Zweittumorerkrankung (1N) sind mit **B oder D** bezeichnet. Aufgeführt ist Geburtsjahr, Geschlecht, Jahr der Erst- und Zweittumordiagnose und Art des Erst- und Zweittumors der Patienten. Das Paar A5 und B5 konnte nicht verglichen werden, da die Fibroblasten von B5 kontaminiert waren, und das Paar A20 und B20 wurde ausgeschlossen, da beim Patient B20 eine Mutation im *RB*-Gen nachgewiesen wurde. Der Patient A17 verstarb 2006.

KKR Patienten ID	matched pair	Geburts-jahr	Ge-schlecht	Jahr der Ersttumor-diagnose	Jahr der Zweittumor-diagnose	Art des Ersttumors	Art des Zweittumors
A1	1	1982	w	1984	1993	CLL Non-Hodgkin-Lymphom	Mucoepidermoides Karzinom
B1	1	1980	w	1984		CLL Non-Hodgkin-Lymphom	
A2	2	1982	m	1990	1998	Burkitt Lymphom	Papilläres Schilddrüsenkarzinom
B2	2	1983	m	1991		Burkitt Lymphom	
A3	3	1978	w	1981	1993	CLL Non-Hodgkin-Lymphom	Papilläres Schilddrüsenkarzinom
B3	3	1978	w	1981		CLL Non-Hodgkin-Lymphom	
A4	4	1984	w	1997	1999	Hodgkin-Lymphom	Non-Hodgkin-Lymphom
B4	4	1984	w	1997		Hodgkin-Lymphom	
A5		1975	w	1981	1988	Akute myeloische Leukämie	Mucoepidermoides Karzinom
B5		1981	w	1982		Akute myeloische Leukämie	
A6	5	1978	m	1981	1996	CLL Non-Hodgkin-Lymphom	Meningotheliomatöses Meningeom
D6	5	1980	m	1983		CLL Non-Hodgkin-Lymphom	
A7	6	1979	w	1987	1994	Akute lymphatische Leukämie	Non-Hodgkin-Lymphom
B7	6	1979	w	1987		Akute lymphatische Leukämie	
A8	7	1979	m	1983	1989	CLL Non-Hodgkin-Lymphom	Pilozytische Astrozytom
B8	7	1978	m	1984		CLL Non-Hodgkin-Lymphom	
D8	7	1977	m	1982		CLL Non-Hodgkin-Lymphom	
A9	8	1969	m	1983	2000	Akute myeloische Leukämie	Papilläres Schilddrüsenkarzinom
B9	8	1965	m	1980		Akute myeloische Leukämie	

KKR Patienten ID	matched pair	Geburts-jahr	Ge-schlecht	Jahr der Ersttumor-diagnose	Jahr der Zweittumor-diagnose	Art des Ersttumors	Art des Zweittumors
A10	9	1979	m	1985	1992	Medulloblastom	Meningotheliomatöses Meningeom
B10 (B6)	9	1981	m	1987		Medulloblastom	
A11	10	1972	w	1980	1996	Akute lymphatische Leukämie	Mucoepidermoides Karzinom
B11	10	1973	w	1982		Akute lymphatische Leukämie	
A12	11	1976	m	1980	1986	Rhabdomyosarkom	Lebertumor
B12	11	1979	m	1985		Rhabdomyosarkom	
D12	11	1982	m	1987		Rhabdomyosarkom	
A14	12	1980	m	1994	1999	Hodgkin-Lymphom	Papilläres Schilddrüsenkarzinom
B14	12	1981	m	1994		Hodgkin-Lymphom	
A15	13	1980	m	1992	2000	T-CLL Non-Hodgkin-Lymphom	Hodgkin-Lymphom
B15	13	1978	m	1989		T-CLL Non-Hodgkin-Lymphom	
A16	14	1980	m	1991	1997	Hodgkin-Lymphom	Non-Hodgkin-Lymphom
B16	14	1980	m	1991		Hodgkin-Lymphom	
A17	15	1980	w	1981	2002	Neuroblastom	Sarkom
B17	15	1980	w	1980		Neuroblastom	
A19	16	1983	m	1995	2001	Hodgkin-Lymphom	Non-Hodgkin-Lymphom
B19	16	1984	m	1996		Hodgkin-Lymphom	
A20		1986	m	1988	1992	Retinoblastom	T-CLL
B20		1984	m	1986		Retinoblastom	
A21	17	1984	w	1996	2003	CLL Non-Hodgkin-Lymphom	Refraktorisches Anämie
B21	17	1985	w	1998		CLL Non-Hodgkin-Lymphom	
A22	18	1984	w	1987	1995	Nephroblastom	Ependymom
B22	18	1983	w	1985		Nephroblastom	

KKR Patienten ID	matched pair	Geburts-jahr	Ge-schlecht	Jahr der Ersttumor-diagnose	Jahr der Zweittumor-diagnose	Art des Ersttumors	Art des Zweittumors
A23	19	1981	m	1985	1997	CLL Non-Hodgkin-Lymphom	Papilläres Schilddrüsenkarzinom
B23	19	1981	m	1986		CLL Non-Hodgkin-Lymphom	
A24	20	1977	w	1982	2002	B-CLL Non-Hodgkin-Lymphom	Papilläres Schilddrüsenkarzinom
B24	20	1977	w	1980		B-CLL Non-Hodgkin-Lymphom	

Reduced mRNA and Protein Expression of the Genomic Caretaker RAD9A in Primary Fibroblasts of Individuals with Childhood and Independent Second Cancer

Eva Weis¹, Holger Schoen¹, Anja Victor², Claudia Spix², Marco Ludwig¹, Brigitte Schneider-Raetzke¹, Nicolai Kohlschmidt¹, Oliver Bartsch¹, Aslihan Gerhold-Ay², Nils Boehm³, Franz Grus³, Thomas Haaf^{4*}, Danuta Galetzka¹

1 Institute of Human Genetics, University Medical Center, Mainz, Germany, **2** Institute of Medical Biometry, Epidemiology and Informatics, University Medical Center, Mainz, Germany, **3** Experimental Ophthalmology, Ocular Proteomics and Immunology Center, University Medical Center, Mainz, Germany, **4** Institute of Human Genetics, Julius Maximilians University, Würzburg, Germany

Abstract

Background: The etiology of secondary cancer in childhood cancer survivors is largely unclear. Exposure of normal somatic cells to radiation and/or chemotherapy can damage DNA and if not all DNA lesions are properly fixed, the mis-repair may lead to pathological consequences. It is plausible to assume that genetic differences, i.e. in the pathways responsible for cell cycle control and DNA repair, play a critical role in the development of secondary cancer.

Methodology/Findings: To identify factors that may influence the susceptibility for second cancer formation, we recruited 20 individuals who survived a childhood malignancy and then developed a second cancer as well as 20 carefully matched control individuals with childhood malignancy but without a second cancer. By antibody microarrays, we screened primary fibroblasts of matched patients for differences in the amount of representative DNA repair-associated proteins. We found constitutively decreased levels of RAD9A and several other DNA repair proteins in two-cancer patients, compared to one-cancer patients. The RAD9A protein level increased in response to DNA damage, however to a lesser extent in the two-cancer patients. Quantification of mRNA expression by real-time RT-PCR revealed lower RAD9A mRNA levels in both untreated and 1 Gy γ -irradiated cells of two-cancer patients.

Conclusions/Significance: Collectively, our results support the idea that modulation of RAD9A and other cell cycle arrest and DNA repair proteins contribute to the risk of developing a second malignancy in childhood cancer patients.

Citation: Weis E, Schoen H, Victor A, Spix C, Ludwig M, et al. (2011) Reduced mRNA and Protein Expression of the Genomic Caretaker RAD9A in Primary Fibroblasts of Individuals with Childhood and Independent Second Cancer. PLoS ONE 6(10): e25750. doi:10.1371/journal.pone.0025750

Editor: Reiner Albert Veitia, Institut Jacques Monod, France

Received: July 1, 2011; **Accepted:** September 9, 2011; **Published:** October 3, 2011

Copyright: © 2011 Weis et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This study was supported by the Stiftung Rheinland-Pfalz für Innovation (project no. 698) and the FAZIT-Stiftung. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: thomas.haaf@uni-wuerzburg.de

Introduction

In most cases, cancer is a multifactorial disease caused by environmental hazards, unhealthy lifestyle and/or genetic factors [1]. Because children are usually less exposed to an unfavourable environment or lifestyle than adults, genetic factors are likely to be a more important [2]. However, only a small proportion (1–10%) of childhood cancers has a known genetic etiology [3]. It is well known that irradiation and other DNA damaging agents used for cancer treatment are able to trigger the formation of leukemia and other cancers [4,5]. Radiation and/or chemotherapy constitute risk factors for development of a second malignancy, which cannot be classified as remission of the primary tumor. Because relatively few childhood cancer survivors develop a second malignancy [6], genetic predisposition may be involved.

Cells are constantly exposed to endogenous and exogenous DNA damaging agents. There are several pathways that monitor and maintain genome integrity. Cells have multiple checkpoints

that transiently delay cell cycle progression to allow extra time for DNA repair or induce apoptosis [7,8]. Mutations or aberrant regulation of genes that control cell cycle checkpoints and DNA repair play important roles in tumorigenesis [9,10] and are prime candidates when searching for genes modulating the risk for secondary cancer. If therapy-induced DNA damage is misrepaired, this can initiate second tumor development. Genetic predisposition may lead to increased chromosomal instability after radiation or chemotherapy [5,11,12]. Only in very rare cases of second childhood malignancy a genetic instability syndrome such as Fanconi anaemia, ataxia teleangiectasia or xeroderma pigmentosum has been diagnosed [10]. In most cases, the causes underlying development of a second cancer remain unknown.

To test the hypothesis that modulations in the expression of cell cycle control and DNA repair genes are associated with secondary cancer, we analyzed primary fibroblasts of childhood cancer patients with a second cancer (2C patients) and carefully matched controls without a second cancer (1C patients). Skin fibroblasts

represent a normal somatic cell type. In contrast to blood and EBV-transformed lymphoblasts, which can be more easily obtained, primary fibroblasts constitute a homogenous cell population with intact cell cycle and DNA repair checkpoints. So far there have been only few studies on primary fibroblasts of cancer patients. Fibroblasts of breast and thyroid cancer patients were found to have defective repair and/or cell cycle regulation [13]. Abnormal gene expression in somatic cells of the unaffected parents of retinoblastoma patients are also consistent with an inherited predisposition to cancer development [14].

To identify susceptibility factors for second cancer formation, we screened various DNA-repair associated genes for constitutive protein expression differences in 2C versus 1C patients. The DNA damage checkpoint protein RAD9A was downregulated in both untreated and irradiated somatic cells of two-cancer patients, compared to one-cancer patients. Increased constitutive and DNA damage-induced levels of RAD9A protein and other genomic caretakers may help to maintain genome stability and prevent second tumor development after radiation and chemotherapy. RAD9A, which in some papers is called hRAD9 or simply RAD9, is an interesting candidate, because it functions in multiple pathways, including DNA repair, cell cycle checkpoint control and apoptosis and its abnormal expression has been linked to tumorigenesis [15,16].

Results

Recruitment of patients

Twenty individuals who survived a childhood cancer and then developed a second cancer were recruited from the German Childhood Cancer Registry. At least one year must have passed since diagnosis of the second cancer. Twenty matched cases who survived a childhood cancer and did not develop a second cancer were randomly chosen from the Registry. The matching criteria were same sex, equal primary cancer diagnosis, equal age at first diagnosis, and same time under observation. Because the primary tumors of matched one- and two-cancer patients were diagnosed in the same year, the treatment modalities were largely identical. All patients were followed up from primary cancer diagnosis to the time when they were recruited.

The patients had to be alive and at least 18 years of age (legal age in Germany) to give their informed consent to skin biopsy. Less than 50% of the contacted two-cancer patients decided to participate in the study. Because of these inclusion criteria, we could only recruit a limited number of two-cancer patients throughout Germany. There is a certain bias in the distribution of primary and secondary cancers. For example, the most frequent combination of acute myeloid leukemia after acute lymphoid leukemia has a very unfavourable prognosis and, therefore, is not represented. On the other hand, secondary thyroid carcinomas are overrepresented, because the patients have a good prognosis and reach adulthood.

Reduced levels of DNA repair-associated proteins in cells of two-cancer patients

Customized antibody microarrays (for example, see Figure 1) were used to compare the constitutive expression levels (without induction of DNA damage) of different DNA repair-associated proteins in exponentially growing primary fibroblasts of childhood cancer patients with and without second tumor, respectively. The 19 studied genes (Table 1) were selected, because they are key players in different DNA repair pathways (i.e. DNA double-strand break repair, nucleotide excision repair, base excision repair, and mismatch repair), participating either in signaling of DNA damage, checkpoint control and/or DNA repair. Mutations in many of these genes are known to predispose to the development of cancer.

For each matched (2C vs. 1C) patient pair we determined the z ratio of triplicate measurements of protein levels (normalized with log10 transformation and z scores). Six of the 19 tested proteins, representing different DNA repair pathways, displayed lower levels in two-cancer patients (Table 1). The box plots in Figure 2 present the distribution of z ratios for BRCA1 (-1.36x; $p=0.017$), DDIT3 (-1.27x; $p=0.011$), MSH6 (-1.16x; $p=0.021$), TP53 (-1.18x; $p=0.003$), RAD9A (-1.38x; $p=0.040$), and RAD51 (-1.37x; $p=0.009$). The p values were not corrected for multiple testing and should be considered as explorative. In order to demonstrate the reliability of our

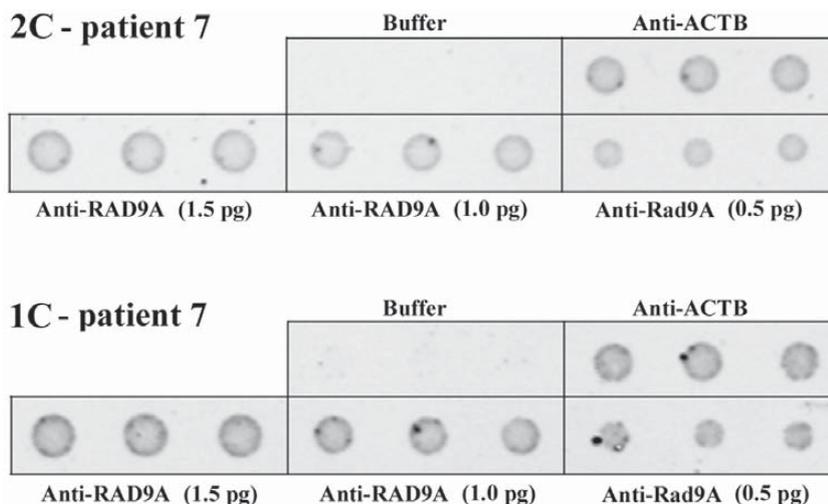


Figure 1. Representative antibody microarray. Different amounts (approximately 1.5, 1.0 and 0.5 pg) of anti-RAD9A antibody (2 ng/ μ l) are spotted in triplicates onto nitrocellulose-coated slides and incubated with fluorescent-labeled nuclear protein extract of untreated fibroblasts from two-cancer patient 2C-7 and the matched one-cancer patient 1C-7, respectively. Anti-ACTB serves as positive and spotting buffer as negative control. The measured 2C/1C RAD9A protein ratio is 0.5. doi:10.1371/journal.pone.0025750.g001

Table 1. Constitutive expression differences of DNA repair-associated proteins in fibroblasts of 2C vs. 1C patients, measured by antibody microarrays.

Protein	Antibody	2C/1C ratio	p value	Fold change
ACTB (control)	Sigma #A5441	0.99	0.575	-1.01
ATM	Santa Cruz #sc-7230	1.38	0.117	1.38
APEX	Novus Biol. #NB100-116	1.08	0.627	1.08
BRCA1	Santa Cruz #sc-1553	0.74	0.017	-1.36
BRCA2	Santa Cruz #sc-1817	0.90	0.263	-1.11
DDIT3	Santa Cruz #sc-793	0.79	0.011	-1.27
ERCC1	Santa Cruz #sc-71072	1.60	0.247	1.60
GADD45	Santa Cruz #sc-793	0.82	0.153	-1.23
H2AX	Upstate #05-636	1.47	0.100	1.47
Ku86	Santa Cruz #sc-5280	1.23	0.502	1.23
MLH1	Santa Cruz, #sc-582	1.07	0.247	1.07
MSH6	Santa Cruz #sc-1242	0.86	0.021	-1.16
PCNA	Santa Cruz, #sc-56	0.96	0.232	-1.04
PMS1	Santa Cruz #sc-615	0.92	0.709	-1.08
PMS2	Santa Cruz #sc-617	0.99	0.737	-1.01
RAD9A	Abcam #ab13600	0.73	0.040	-1.38
RAD51	Abcam #ab63801	0.73	0.009	-1.37
RCC1	Santa Cruz sc-1162	0.78	0.263	-1.28
TP53	Santa Cruz #sc-100	0.85	0.003	-1.18
XPA	Santa Cruz #sc-853	0.89	0.115	-1.12

doi:10.1371/journal.pone.0025750.t001

antibody microarrays, Western blot analysis of RAD9A was performed on a representative matched pair. The anti-RAD9A antibody stained the expected 45 kDa band in nuclear protein extracts, whereas no or only a faint band was seen in cytoplasmic extracts (Fig. 3). Consistent with the antibody microarray (Fig. 1), the Western blot showed a lower amount (60%) of RAD9A protein in the 2C patient, compared to the matched 1C patient.

The six proteins showing constitutive expression differences were also quantified in cells at 1 h and 4 h after 1 Gy γ -irradiation. For each patient, we compared the protein levels measured by antibody microarrays in treated vs. untreated samples. Two proteins, RAD9A and DDIT3, differed in their cellular response to DNA damage between 2C and 1C patients. The box plots in Figure 4 show the z ratios for RAD9A (after normalization with log10 transformation and z scores) in the 2C and the 1C group. In both groups the RAD9A protein levels were elevated after DNA damage. In the one-cancer group, RAD9A was overexpressed more than twofold at 1 h and 4 h after irradiation, compared to the constitutive protein level. In the 2C group, the amount of RAD9A protein increased 1.76- and 1.63-fold at 1 h and 4 h, respectively, implying a lower induction (-1.44x, $p=0.012$ at 4 h) by DNA damage in childhood cancer patients with a second tumor. Similar to RAD9A, the protein encoded by the DNA damage inducible transcript *DDIT3* was also found to be increased in irradiated cells (Fig. 3). In 1C patients, the protein level was elevated 1.40- and 1.96-fold at 1 h and 4 h after DNA damage, compared to 1.26- and 1.95-fold in the 2C group. At 1 h after irradiation there was a lower induction (-1.13x, $p=0.019$) in the two-cancer group.

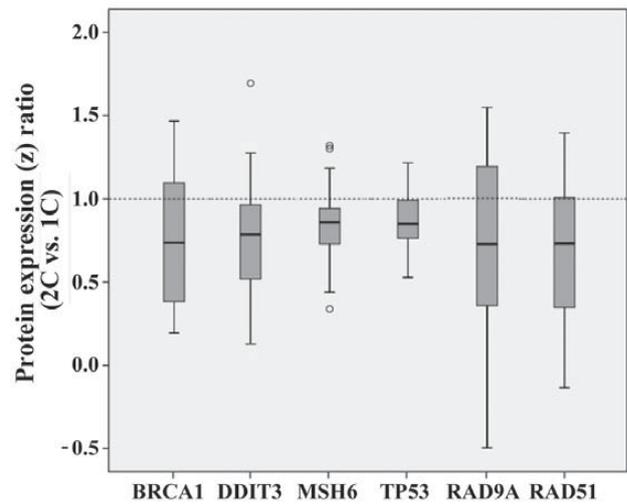


Figure 2. Reduced expression of DNA repair-associated proteins in two-cancer patients. The relative expression levels in fibroblasts of 2C versus 1C patients are -1.36x ($p=0.017$) for BRCA1, -1.27x ($p=0.011$) for DDIT3, -1.16x ($p=0.021$) for MSH6, -1.18x ($p=0.003$) for TP53, -1.38x ($p=0.040$) for RAD9A, and -1.37 ($p=0.009$) for RAD51. Protein expression was measured by antibody microarrays (normalized by log10 transformation and z scores). Box plots show the distribution of z ratios in matched 2C vs. 1C patients. The median is represented by horizontal lines. The bottom of the box indicates the 25th percentile, the top the 75th percentile. The T bars extend from the boxes to at most 1.5 times the height of the box. Outliers are shown as open circles.

doi:10.1371/journal.pone.0025750.g002

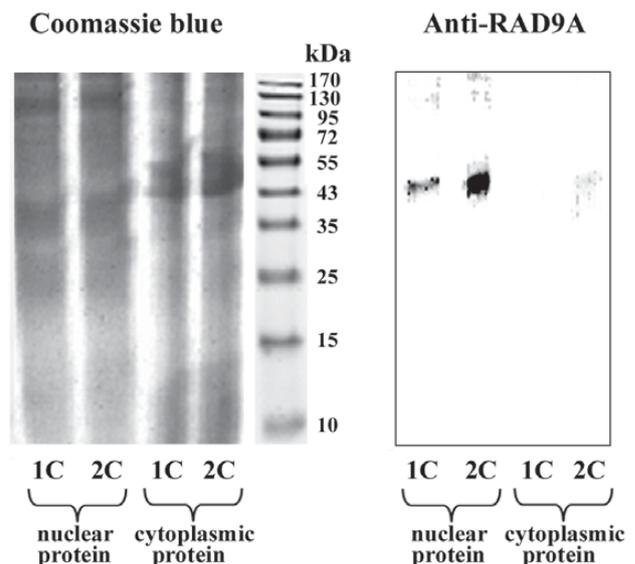


Figure 3. Western blot showing reduced RAD9A protein levels in a two-cancer patient. The gel on the left side shows Coomassie blue staining of nuclear and cytoplasmic protein extracts (30 μ g each) from untreated fibroblasts of two-cancer patient 2C-7 and the matched one-cancer patient 1C-7. The corresponding gel on the right side is stained with anti-RAD9A antibody, which recognizes a 45 kDa nuclear protein. The calculated 2C/1C RAD9A protein ratio is 0.6.

doi:10.1371/journal.pone.0025750.g003

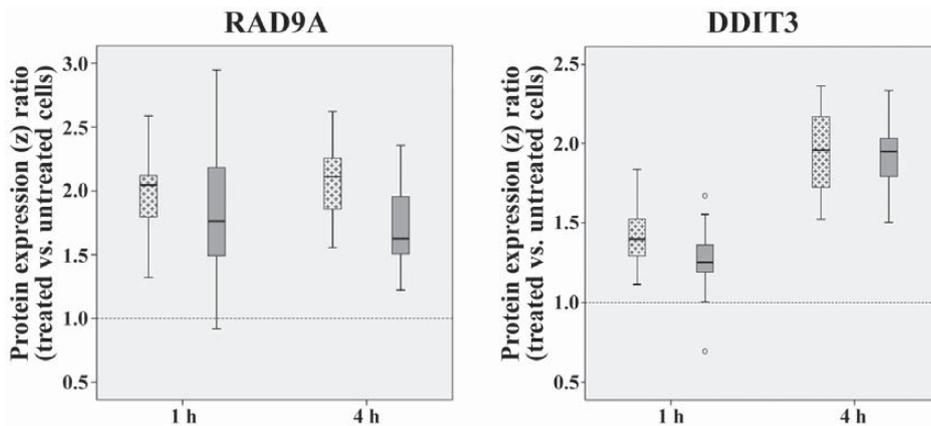


Figure 4. Reduced DNA damage response of two-cancer patients. Differential induction of RAD9A (left side) and DDIT (right side) at 1 h and 4 h after 1 Gy γ -irradiation in fibroblasts of two-cancer patients (gray boxes) and one-cancer patients (dotted boxes). Protein expression was measured by antibody microarrays (normalized by log10 transformation and z scores). Box plots show the distribution of z ratios of treated vs. untreated cells of the same patients. The median is represented by horizontal lines. The bottom of the box indicates the 25th percentile, the top the 75th percentile. The T bars extend from the boxes to at most 1.5 times the height of the box. Outliers are shown as open circles. The DNA-damage induced increase in the 2C group is lower than that in the 1C group for RAD9A at 4 h after irradiation ($-1.44x$, $p=0.012$) and for DDIT3 at 1 h after irradiation ($-1.13x$, $p=0.019$). doi:10.1371/journal.pone.0025750.g004

Reduced RAD9A mRNA expression levels in two-cancer patients

Because RAD9A protein was most dramatically downregulated in two-cancer patients, we focussed our further study on this cell cycle checkpoint and DNA repair protein. We performed quantitative mRNA expression analyses by real-time RT PCR in both untreated and irradiated cells. The box plots in Figure 5 present the distribution of expression ratios in 20 matched pairs of patients. The constitutive RAD9A mRNA levels (without induction

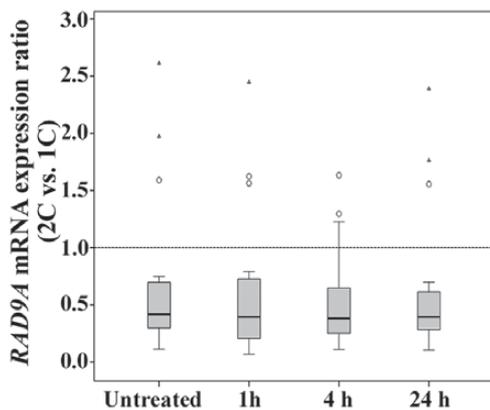


Figure 5. Reduced mRNA expression of RAD9A in two-cancer patients. RAD9A mRNA levels in untreated and irradiated (1 h, 4 h and 24 h after 1 Gy) fibroblasts of two-cancer patients, compared to matched one-cancer patients. mRNA was quantified by real-time RT PCR (normalized with the $\Delta\Delta CT$ method and two endogenous control genes). Box plots show the distribution of expression ratios in matched 2C vs. 1C patients. The median is represented by horizontal lines. The bottom of the box indicates the 25th percentile, the top the 75th percentile. The T bars extend from the boxes to at most 1.5 times the height of the box. Outliers are shown as open circles, extreme outliers as triangles. Two-cancer patients show reduced RAD9A mRNA levels without induction of DNA damage ($-2.40x$, $p=0.004$) as well as at 1 h ($-2.54x$, $p=0.003$), 4 h ($-2.62x$, $p=0.003$), and 24 h ($-2.54x$, $p=0.003$) after irradiation. doi:10.1371/journal.pone.0025750.g005

of DNA damage) were significantly lower in two-cancer patients ($-2.40x$, $p=0.004$), compared to one-cancer patients. Between-group differences were also observed at 1 h ($-2.54x$, $p=0.003$), 4 h ($-2.62x$, $p=0.003$), and 24 h ($-2.54x$, $p=0.003$) after irradiation. Three matched pairs represent outliers or extreme outliers in the box plot diagrams, indicating that relative RAD9A expression levels can considerably vary between patients and are not always reduced in two-cancer patients. The (extreme) outliers represent different combinations of primary and secondary cancer.

Because it has been reported that RAD9A expression is dependent on DNA methylation [17], we determined the methylation status of the presumed cis-regulatory region by bisulfite pyrosequencing. Compared to classic bisulfite plasmid sequencing, bisulfite pyrosequencing can only analyze a limited number of CpG sites located at the most 30–50 bp 3' from the sequencing primer, however on the other hand it can much more exactly ($\pm 2\%$) quantify the CpG methylation level. The analyzed DNA segment, which contains three adjacent CpG sites, was found to be unmethylated in untreated cells of both 2C and 1C patients. The range of methylation values was 4–10%, as expected for a transcriptionally active gene. There was no significant between-group methylation difference, which could explain the observed expression difference. Because the density of methylated CpGs rather than individual sites in a CpG island turn a gene on or off [18,19], the average methylation of a few CpGs can usually serve as a representative epigenetic marker for a given cis-regulatory region.

Chromosome 11q13.1 containing the RAD9A gene is frequently amplified in a variety of human tumors [17]. To exclude RAD9A copy number variations between 2C and 1C patients, we performed high-resolution karyotype analyses with the Affymetrix GeneChip Genome Wide Human SNP array 6.0 as well as quantitative real-time PCR. Both methods revealed two copies of the RAD9A gene in all studied patients.

Discussion

Compared to the enormous efforts to characterize the transcriptomes and proteomes of tumor cells, there are relatively

few studies searching for gene expression differences in normal somatic cells of tumor patients [13,14]. To test the hypothesis that differences in DNA repair pathways may influence the risk for developing a second tumor following treatment of childhood cancer, we compared the constitutive levels of DNA repair-associated proteins in primary fibroblasts of matched two-cancer and one-cancer patients. Because we did not expect dramatic differences but rather subtle modulations in the DNA repair capacity in two-cancer patients, we did not perform a genome-wide screen but tested only a limited number of well-known DNA repair-associated genes using highly sensitive antibody microarrays. The observation that 6 of 19 tested DNA repair-associated proteins were constitutively downregulated in normal cells of two-cancer patients promotes the idea that the DNA repair pathways of two-cancer patients are less capable to handle DNA damage than those of one-cancer patients. For two proteins we also showed a lower induction after DNA damage. One gene, *RAD9A* was analyzed in more detail. Both constitutive mRNA expression in exponentially growing fibroblasts as well as DNA-damage induced expression at different time points after irradiation was lower in two-cancer patients than in one-cancer patients. In this light, *RAD9A* is a good candidate for a factor predisposing to second cancer. The differential *RAD9A* expression was not mediated by DNA methylation or copy number variation.

The *RAD9A* gene is evolutionarily highly conserved from yeast to man, which is generally considered a good indicator for functional significance. It acts in multiple pathways including base excision, homologous recombination and mismatch repair as well as cell cycle checkpoint control and apoptosis. Many of its functions appear to be mediated by the nuclear RAD9A-HUS1-Rad1 protein complex that resembles PCNA [15,16]. Mouse *Rad9*^{-/-} and to a lesser extent *Rad9*^{+/-} knockout cells [20] and human RNAi knockdown cells with reduced *RAD9A* levels [21] are sensitive to different types of DNA damage, displaying genome instability, DNA repair deficiency and altered cell cycle checkpoints. Embryonic lethality of the mouse *Rad9*^{-/-} mutation indicates that the multiple functions of Rad9A are essential for embryogenesis and normal development. Mice with targeted *Rad9*^{-/-} deletion in keratinocytes are highly susceptible to genotoxin-induced skin tumor formation [22,23]. *Rad9*^{-/-} keratinocytes display a higher number of spontaneous and genotoxin-induced DNA breaks, aberrant cell cycle distribution and an increased rate of apoptosis. This is consistent with the view that *RAD9A* functions as a tumor suppressor in skin and other tissues by promoting DNA repair in damaged cells and stabilizing the genome before tumorigenesis occurs. It is interesting to note that both downregulation and upregulation of *RAD9A* have been associated with tumorigenesis. *RAD9A* overexpression has been observed in a variety of tumors, including breast [17], lung [24], thyroid [25], and prostate cancer [26]. This suggests that *RAD9A* can also function as an oncogene, most likely by aberrant transactivation of downstream target genes. In general, the *RAD9A* level correlated with tumor size and/or stage. *RAD9A* belongs to a growing group of genes with dual roles in cancer. Depending on the cell type and tissue environment, it can demonstrate either tumor-promoting or tumor-suppressing activity [15]. The mechanisms by which the multifunctional *RAD9A* protein acts as an oncogene and a tumor suppressor, respectively are largely unknown.

Because the number of two-cancer patients being 18 years or older is relatively small, we could not limit our studied patients to a specific tumor entity or treatment protocol. The largest subgroup of primary tumors were lymphoid leukemias (10 cases). Due to their good prognosis, thyroid carcinomas (6 cases) were

overrepresented as second cancers. Radiation therapy is an important risk factor for thyroid carcinoma [27]. In this light, it tempting to speculate that the abundance of *RAD9A* protein may modulate the risk for radiation-induced tumors. Future more comprehensive studies should consider the effects of different treatment modalities of childhood cancer. However, as outlined above, recruiting homogenous groups of patients is extremely challenging. We obtained skin biopsies and blood samples from all our studied patients. Because many patients were bone-marrow transplanted, the blood cells were not analyzed. Fibroblast cultures were established one or more years after second cancer diagnosis/treatment, which makes it unlikely that the expression differences between two-cancer versus one-cancer patients are directly or indirectly influenced by radiation or chemotherapy. Although it is plausible to assume that cultured fibroblasts represent the situation in normal body cells, it would be desirable to also study uncultured cells and/or other tissues.

The number of analyzed patients is relatively small. Nevertheless, our results suggest that the constitutive *RAD9A* protein levels as well as the extent of induction after DNA damage vary between two-cancer and one-childhood cancer patients. We propose that *RAD9A* functions as tumor suppressor in skin fibroblasts and other normal cells of the body and, thus, helps to prevent second cancer. Analysis of various normal cell types in larger patient populations, for example adult cancer survivors are necessary to support a role for *RAD9A* in DNA damage-induced carcinogenesis.

Materials and Methods

Patient samples

The German Childhood Cancer Registry has collected almost completely all childhood cancers in Germany since 1980, conducting an open-end follow-up with an emphasis on second neoplasms. With the help of the Registry, we recruited 20 persons who survived a childhood malignancy and then, unrelated to the first event, developed a second cancer (2C patients) as well as 20 carefully matched persons [same sex, same primary cancer (ICCC classification), equal age (± 1 year) at first diagnosis] who did not develop a second malignancy (1C patients). Genetic counselling was offered and informed written content was obtained from all patients participating in the study, which was approved by the Ethics Committee of the Medical Association of Rhineland-Palatinate (No. 837.440.03[4102]).

The mean age at diagnosis of the first tumor was 6.8 years (range 0–14) in both groups. The primary tumors were acute myeloid or lymphoid leukemia (11 cases), Hodgkin or Burkitt lymphoma (5 cases) and other solid tumors (4 cases). The mean age at second diagnosis in the 2C group was 16.7 years (range 9–30). The second tumors were myelodysplastic syndrome or lymphoma (7 cases), thyroid carcinoma (6 cases) and other solid tumors (7 cases). Second neoplasms were confirmed by experienced clinical oncologists to be no relapses or alternative manifestations of the primary neoplasm.

Skin biopsies were taken at the earliest one year, usually several years after second cancer therapy. Primary fibroblast cell cultures were established from skin biopsies and cultured in minimal essential medium with Earle's salts (Invitrogen, Karlsruhe, Germany), supplemented with 10% fetal bovine serum, vitamins and antibiotics. Cells (without DNA damage) were harvested from exponentially growing subconfluent cultures. To induce DNA repair, subconfluent cultures were exposed to 1 Gy ionizing radiation using a GammaCell 2000 (Cs137) irradiator. Samples

were taken 1 h, 4 h and 24 h after irradiation. Cells were washed twice with PBS and stored at -80°C until further use.

Western blot and antibody microarray

For nuclear protein extraction cells were resuspended two times in 500 μl of 10 mM HEPES, 1.5 mM MgCl_2 , 10 mM KCl, pH 7.9 and incubated on ice for 10 min. After 10 s centrifugation at maximum speed the supernatant was discarded. Then the pellet was resuspended in 100 μl of 20 mM HEPES, 0.42 M NaCl, 1.5 mM MgCl_2 , 0.2 mM EDTA, 25% glycerol, pH 7.9 and homogenized using a syringe with gauge needle. After incubation on ice for 30 min and centrifugation for 30 min at maximum speed at 4°C , the supernatant containing the nuclear extract was separated from the cytoplasmic pellet and stored at -80°C . The protein concentration was measured according to Bradford, using Roti Quant (Roth, Karlsruhe, Germany).

For Western blot analysis, 30 μg nuclear protein extract were separated on a 8% SDS-PAGE gel and then transferred to a Hybond-P membrane (Amersham, Arlington Heights, IL, USA). The membrane was first blocked with 5% non-fat dry milk (NFD) dissolved in Tris-buffered saline (50 mM Tris-Cl, pH 7.5, 150 mM NaCl), 0.1% Tween 20 (TBST). The blots were then incubated overnight at 4°C with mouse monoclonal anti-RAD9A antibody, diluted 1:250 (2 $\mu\text{g}/\text{ml}$) in TBS with 5% NFD. After washing the blot three times for 5 min with TBST, proteins were detected with peroxidase-labeled secondary rabbit anti-mouse antibodies using the BM Chemiluminescence Western Blotting Kit (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). Band intensities were quantified with a LAS-3000 (Fujifilm, Düsseldorf, Germany) luminescent image analyzer. Coomassie blue staining was used to adjust the signal intensities to the amount of protein.

Customized antibody microarrays for quantification of 19 different DNA repair-associated proteins (Table 1) were prepared by spotting one drop, two drops and/or three drops, each drop containing approximately 0.5 μg antibody in triplicates onto nitrocellulose-coated slides (Oncyte, nitrocellulose 16 multi-pad slides, Grace Bio-Labs, Bend, OR, USA), using a non-contact array spotter (sciFLEXARRAYER 3, Scienion, Berlin, Germany). Antibodies against beta-actin (ACTB) served as positive, spotting buffer as negative control. Slides were stored at 4°C in dry condition. Nuclear proteins were labeled with an amine reactive fluorine dye, which forms a covalent amide bond between the primary amines of proteins. Two micrograms of protein and 0.12 μl fluorescent dye (Dylight 649 NHS Ester, Pierce, Rockford, USA) were incubated for 1 h at room temperature in the dark. Then excess fluorescent dye was inactivated by adding 100 mM glycine to the reaction. Prior to use, antibody microarrays were covered with 16-pad FAST frame hybridization chambers (Whatman, Maidstone, UK). Unspecific binding sites were blocked for 1 h at 4°C with 120 μl PBS containing 4% NFD per subarray, followed by three washes with 120 μl PBS each for 10 min. Labelled protein samples were incubated on sub-arrays overnight at 4°C . Afterwards, the slides were washed two times for 15 min with PBS, 5% Tween 20 and two times for 15 min with HPLC-grade water. Finally, the slides were dried in a SpeedVac and scanned with a high-resolution confocal scanner (Affymetrix array scanner 428 TM, High Wycombe, UK). Slide images were analyzed using the Spotfinder 3.1.1 software (TM4, Dana Faber Cancer Institute, Boston, USA). Background subtraction was performed according to the formula: spot intensity = mean intensity SP - (sum bkg - sum top25 bkg)/(number of pixelSP - number of pixel top25 bkg), where SP represents any spot, bkg the corresponding background and top25 bkg the top 25% of background pixel.

For statistical analysis of microarray data we performed log₁₀ transformation, z score and z ratio calculations [28]. For between-group comparisons we used the sign test and, if possible, the Wilcoxon test (skewness [-1,+1]) and box plots as graphics (PASW statistics 18.0). No adjustment for multiple testing was performed. The analyses were regarded as explorative, and the p values of the corresponding tests are presented for descriptive reasons. The results of these tests can therefore not be considered as significant at any level.

Quantitative real-time RT PCR

Total RNAs were prepared from treated and untreated fibroblast cultures using the TRIzol method (Invitrogen). One microgram of the RNA samples was reversely transcribed into cDNA using the SuperScript III First-Strand Synthesis System (Invitrogen). Quantitative real-time RT PCR of *RAD9A* was performed with a QuantiTect Primer Assay (Qiagen, Hilden, Germany) and an Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR system (Life Technologies, Karlsruhe, Germany). Exon-spanning forward (5'-GAGAAGACGGTGGAAAAATG-3') and reverse (5'-GGAAGGACAGGTTGTGAGTC-3') primers were designed with the Primer3, version 0.4.0 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>) program. Linearity of amplification was verified by qPCR standard curve and sequence analysis. *RRN18S* (Qiagen, #QT00199367) and *TBP* (#QT00000721) were used as endogenous control genes. All reactions were performed in triplicates. Each 25 μl reaction volume contained 25 ng cDNA template in 10 μl RNase-free PCR graded water, 2.5 μl 10x QuantiTect Primer Assay and 12.5 μl 2x QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix (Qiagen). PCR was performed in two stages with one cycle of 95°C for 15 min (first stage) and 40 cycles of 94°C for 15 s, 55°C for 30 s, and 72°C for 40 s (second stage). Relative quantification was carried out with the $\Delta\Delta\text{CT}$ method using the two endogenous control genes and the one-tumor group as calibrator (2C vs. 1C comparison). To quantify protein induction after DNA damage, the untreated cells of each patient were used as calibrator. Group comparisons were performed with the sign test and box plots. No adjustment for multiple testing was performed.

Methylation analysis

The methylation status of a 900 bp long CpG island ranging from the promoter into intron 2 of the *RAD9A* gene was determined by bisulfite pyrosequencing. The assays targets three representative CpG sites in the second intron of this putative cis-regulatory region [17]. Genomic DNA was isolated with the QIAamp Mini DNA Kit (Qiagen). Bisulfite conversion of 1 μg DNA was performed with the EpiTect Bisulfite Kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. *RAD9A* was amplified from bisulfite-converted DNA using forward primer 5'-GGTTTTTATGGGGAAAGGAGG-3' and biotinylated reverse primer 5'-CCACAAACCCAACCCTCTAAC-3'. Primers were designed with the Pyrosequencing Assay Design Software (Biotage, Uppsala, Sweden). Pyrosequencing was performed with the sequencing primer 5'-TTTTTATGGGGAAAGGA-3' and the PyroGold SQA reagent kit (Qiagen) on a PSQ96MA system (Biotage). Data were analyzed with the Pyro Q-CpG software (Biotage).

Molecular karyotype analysis

High-resolution screening for microdeletions and duplications was performed with the Affymetrix GeneChip Genome Wide Human SNP array 6.0 and the GeneChip Genome Wide SNP Sty Assay Kit 5.0/6.0, following the protocol developed by the

manufacturer (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA). Data calculation was performed with Affymetrix Genotyping Console 4.0 and Chromosome Analysis Suite 1.0.1.

Quantitative real-time PCR with QuantiTect SYBR Green-based chemistry was used to validate *RAD9A* copy numbers. PCR was performed with *RAD9A* forward primer 5'-AGGCT-GTTCTGCCCTTCTC-3' and reverse primer 5'-TGCCT-CCTCCTCGTGGTA-3' on an ABI 7500 Fast Real-Time PCR system with one cycle of 95°C for 15 min and 45 cycles of 95°C for 30 s, 60°C for 60 s and 72°C for 40 s. Copy number calculation was performed with the $\Delta\Delta CT$ method, using the *RFC3* gene (forward primer 5'-AGTAGGTGCTTGGCGGTTTC-3', reverse primer 5'-AGTGTAACCTGACCTACATCTT-CAATG-3') as a reference. All experiments were performed in triplicates.

References

- Anand P, Kunnumakkara AB, Sundaram C, Harikumar KB, Tharakan ST, et al. (2008) Cancer is a preventable disease that requires major lifestyle changes. *Pharm Res* 9: 2097–2116.
- Plon SE, Nathanson K (2005) Inherited susceptibility for pediatric cancer. *Cancer J* 11: 255–267.
- Strahm B, Malkin D (2006) Hereditary cancer predisposition in children: genetic basis and clinical implications. *Int J Cancer* 119: 2001–2006.
- Infante-Rivard C, Mathonnet G, Sinnett D (2000) Risk of childhood leukemia associated with diagnostic irradiation and polymorphisms in DNA repair genes. *Environ Health Perspect* 108: 495–498.
- Boulton E, Cleary H, Papworth D, Plumb M (2001) Susceptibility to radiation-induced leukaemia/lymphoma is genetically separable from sensitivity to radiation-induced genomic instability. *Int J Radiat Biol* 77: 21–29.
- Kaatsch P, Reinisch I, Spix C, Berthold F, Janka-Schaub G, et al. (2009) Case-control study on the therapy of childhood cancer and the occurrence of second malignant neoplasms in Germany. *Cancer Cause Control* 20: 965–980.
- Kastan MB, Bartek J (2004) Cell-cycle checkpoints and cancer. *Nature* 432: 316–323.
- Niida H, Nakanishi M (2006) DNA damage checkpoints in mammals. *Mutagenesis* 21: 3–9.
- Vogelstein B, Kinzler KW (2004) Cancer genes and the pathways they control. *Nat Med* 10: 789–799.
- Rahman N, Scott RH (2007) Cancer genes associated with phenotypes in monoallelic and biallelic mutation carriers: new lessons from old players. *Hum Mol Genet* 16: R60–66.
- MacDonald D, Boulton E, Pocock D, Goodhead D, Kadhim M, et al. (2001) Evidence of genetic instability in 3 Gy X-ray-induced mouse leukaemias and 3 Gy X-irradiated haemopoietic stem cells. *Int J Radiat Biol* 77: 1023–1031.
- Nomura T, Nakajima H, Ryo H, Li LY, Fukudome Y, et al. (2004) Transgenerational transmission of radiation- and chemically induced tumors and congenital anomalies in mice: studies of their possible relationship to induced chromosomal and molecular changes. *Cytogenet Genome Res* 104: 252–260.
- Al-Khodairy FM, Kunhi M, Siddiqui YM, Arif JM, Al-Ahdal MN, et al. (2004) Defective repair of UV-induced DNA damage in cultured primary skin fibroblasts from Saudi thyroid cancer patients. *Asian Pac J Cancer Prev* 5: 139–143.
- Chuang EY, Chen X, Tsai MH, Yan H, Li CY, et al. (2006) Abnormal gene expression profiles in unaffected parents of patients with hereditary-type retinoblastoma. *Cancer Res* 66: 3428–3433.
- Lieberman HB, Bernstock JD, Broustas CG, Hopkins KM, Leloup C, et al. (2011) The role of RAD9 in tumorigenesis. *J Mol Cell Biol* 3: 39–43.
- Lieberman HB (2006) Rad9, an evolutionarily conserved gene with multiple functions for preserving genomic integrity. *J Cell Biochem* 97: 690–697.
- Cheng CK, Chow LW, Loo WT, Chan TK, Chan V (2005) The cell cycle checkpoint gene Rad9 is a novel oncogene activated by 11q13 amplification and DNA methylation in breast cancer. *Cancer Res* 65: 8646–8654.
- Sontag LB, Lorincz MC, Georg Luebeck E (2006) Dynamics, stability and inheritance of somatic DNA methylation imprints. *J Theor Biol* 242: 890–899.
- Weber M, Hellmann I, Stadler MB, Ramos L, Paabo S, et al. (2007) Distribution, silencing potential and evolutionary impact of promoter DNA methylation in the human genome. *Nat Genet* 39: 457–466.
- Hopkins KM, Auerbach W, Wang XY, Hande MP, Hang H, et al. (2004) Deletion of mouse rad9 causes abnormal cellular responses to DNA damage, genomic instability, and embryonic lethality. *Mol Cell Biol* 24: 7235–7248.
- Dang T, Bao S, Wang XF (2005) Human Rad9 is required for the activation of S-phase checkpoint and the maintenance of chromosomal stability. *Genes Cells* 10: 287–295.
- Pandita RK, Sharma GG, Laszlo A, Hopkins KM, Davey S, et al. (2006) Mammalian Rad9 plays a role in telomere stability, S- and G2-phase-specific cell survival, and homologous recombinational repair. *Mol Cell Biol* 26: 1850–1864.
- Hu Z, Liu Y, Zhang C, Zhao Y, He W, et al. (2008) Targeted deletion of Rad9 in mouse skin keratinocytes enhances genotoxin-induced tumor development. *Cancer Res* 68: 1–10.
- Maniwa Y, Yoshimura M, Bermudez VP, Yuki T, Okada K, et al. (2005) Accumulation of hRad9 protein in the nuclei of non-small cell lung carcinoma cells. *Cancer* 103: 1261–1232.
- Kebebew E, Peng M, Reiff E, Duh QY, Clark OH, et al. (2006) Diagnostic and prognostic value of cell-cycle regulatory genes in malignant thyroid neoplasms. *World J Surg* 30: 767–774.
- Zhu A, Zhang X, Lieberman HB (2008) Rad9 has a functional role in human prostate carcinogenesis. *Cancer Res* 68: 1267–1274.
- Klein G, Michaelis J, Spix C, Wibbing R, Eggers G, et al. (2003) Second malignant neoplasms after treatment of childhood cancer. *Eur J Cancer* 39: 808–817.
- Cheadle C, Vawter MP, Freed WJ, Becker KG (2003) Analysis of microarray data using Z score transformation. *J Mol Diagn* 5: 73–81.

Acknowledgments

We thank Vera Beyer for establishing the primary fibroblast cultures, Tanja Zeller for performing the array CGH experiments, and Nady El Hajj for help with the methylation analysis.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: EW CS TH DG. Performed the experiments: EW HS ML NB. Analyzed the data: AV AG-A. Contributed reagents/materials/analysis tools: FG. Wrote the paper: EW TH. Genetic counseling of patients: BS-R NK OB. Performed skin biopsies: BS-R NK OB.