



Universitätsklinikum
Hamburg-Eppendorf

Laboratory of Radiobiology &
Experimental Radiooncology
Prof. Dr. Kai Rothkamp
Head of Laboratory

Zwischenbericht zum medizinischen Doktorandenprojekt im Bereich der Krebsforschung

Auswirkungen von Mutationen in den Brustkrebsgenen PALB2, ABRAXAS,
BRCA1 und BRCA2 auf die Replikation in Brustkrebspatientinnen

Stipendiat

Jonas Willmann
Abendrothsweg 78
20251 Hamburg
Telefon: +491712725635
E-mail: jonas.willmann@me.com

AG Homologe Rekombination und Genomische Instabilität

PD Dr. Kerstin Borgmann (AG Leitung)
Labor für Strahlenbiologie & Experimentelle Radioonkologie
Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie und Radioonkologie
Onkologisches Zentrum
Campus Forschung, N27
Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
Martinistraße 52
20246 Hamburg
Telefon: 040 74105 3596
Telefax: 040 74105 5139,
E-mail: borgmann@uke.de

Aktueller Stand der Arbeit

1. Wirkt sich eine Mutation in PALB2 und ABRAXAS in vergleichbarer Weise destabilisierend auf Replikationsstrukturen aus wie eine Mutation in BRCA1 und 2?

Bisher wurde der DNA Fiber Assay an jeweils acht lymphoblastoiden Zelllinien mit Mutation im PALB2 und im ABRAXAS Gen, an je zweien mit Mutation in BRCA1 und BRCA2 sowie an vier Kontrolllinien ohne Mutation in einem Gen, welches am DNA-Reparaturmechanismus der Homologen Rekombination (HR) beteiligt ist, durchgeführt.

Beim DNA Fiber Assay werden zwei synthetische Nukleoside (Label) den replizierenden Zellen sequentiell und für einen definierten Zeitraum angeboten. Die so markierte DNA wird dann isoliert und auf Objektträgern ausgebreitet. Der Nachweis der synthetischen Nukleoside erfolgt über Immunfluoreszenz-Färbung. Anschließend können die Replikationsrate, die Frequenz der Replikationsstartpunkte und der Anteil der angehaltenen Replikationsgabeln analysiert werden. Für jede der Zelllinie wurde der DNA Fiber Assay im unbehandelten Zustand zur Kontrolle durchgeführt. Weiterhin erfolgte die Untersuchung nach vierstündiger Inkubation mit 2mM Hydroxyurea (HU) zwischen den beiden Labeln sowie nach Bestrahlung mit 6 Gy zu Beginn des zweiten Labels. Die Experimente wurden jeweils mindestens drei Mal wiederholt und pro Zelllinie und Behandlung insgesamt mindestens 600 Strukturen ausgewertet.

Die Messungen der Replikationsraten sowie der relativen Anteile von angehaltenen Replikationsgabeln und Replikationsstartpunkten ist abgeschlossen. Aktuell arbeite ich an der statistischen Auswertung der Daten.

2. Erfolgt die destabilisierende Wirkung durch eine veränderte Aktivierung der Intra-S-Phase-Signalkaskade?

Parallel zum DNA Fiber Assay wurden Zellisolate der oben erwähnten Zelllinien erstellt. Die Zellen blieben entweder unbehandelt als Kontrolle, wurden für vier Stunden mit 2mM HU behandelt oder mit einer Dosis von 6 Gy bestrahlt. Aus den gewonnenen Zellisolaten werde ich in den nächsten Monaten Proteine für die Quantifizierung im Western Blot isolieren. Hierbei werden die isolierten Proteine gelelektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Membran transferiert, mittels entsprechender Antikörper immunologisch detektiert und im LiCor Odyssey quantifiziert. Geplant ist die Überprüfung aller potentiell aktivierbaren Signalkaskaden der S-Phase, mit einer parallelen Quantifizierung von endogenem zu aktiviertem Protein für RPA/pRPA, ATR/pATR, CHK1/pCHK1, ATM/pATM und FANCD2.

Die entsprechende Methodik konnte ich bereits während des zweiwöchigen CELOD Kurses (cellular effects of low doses and low dose rates with focus on molecular radiation carcinogenesis) der Strahlenbiologischen Abteilung der Universität Stockholm, Schweden, den ich im April besucht habe, erlernen.

3. Wirkt sich der beobachtete Phänotyp auf die Sensitivität nach PARP1-Inhibition bzw. nach Bestrahlung aus?

Zur Bestimmung der zellulären Sensitivität auf PARP-Inhibition und Bestrahlung wurde von mir der WST-1 Assay etabliert im Labor, der eine sensitivere und sicherer durchführbare Weiterentwicklung des ursprünglich geplanten MTT-Assays darstellt.

Beim WST-1 Assay wird zu den Zellen ein wasserlösliches Tetrazoliumsalz gegeben. Dieses wird an extrazellulären Elektronentransportern unter Oxidation der pyridinhaltigen Reduktionsäquivalente NADPH und NADH reduziert. Das dabei entstehende Formazan ist bei

einer definierten Wellenlänge kolorimetrisch quantifizierbar. Die messbare Intensität spiegelt somit die Glykolyserate der Zellen wider. Dieses Maß für die metabolische Aktivität der Zellen korreliert stark mit der Zellviabilität.

Für je eine lymphoblastoide Zelllinie mit Mutationen im BRCA1, BRCA2, PALB2 und im ABRAXAS Gen sowie für zwei Kontrolllinien ohne Mutation wurden zunächst Standardkurven der Intensitäten bei verschiedenen ausgesäten Zellkonzentrationen nach sieben Tagen Wachstum in 96-Well-Platten erstellt. Der Zeitraum von einer Woche wurde gewählt, da sich innerhalb dieser Zeit die zytotoxische Wirkung eines PARP-Inhibitors, wie er später im Versuch verwendet werden soll, vollständig entfalten kann. So wurde die Zellkonzentration ermittelt, bei der eine lineare Korrelation zwischen gemessener Intensität und der Anzahl der Zellen besteht. In diesem Bereich lässt sich anschließend, über den Vergleich der Intensitäten bei unbehandelten und behandelten Zellen, die Reduktion des zellulären Überlebens und somit die Sensitivität gegenüber der durchgeführten Behandlung bestimmen.

In den nächsten Wochen sollen für die oben erwähnten Zelllinien die Sensitivität auf den PARP-Inhibitor Olaparib und Bestrahlung bestimmt werden. Dafür werden die Zellen mit sechs verschiedenen Konzentrationen Olaparib, von 10µM bis 0,01µM, sowie als Kontrolle ohne Olaparib behandelt. Für jede Olaparib-Konzentration werden vier Ansätze mit unterschiedlichen Bestrahlungsdosen (0, 2, 4 und 6 Gy) erstellt. Zur vollständigen Inhibition des Proteins PARP wird Olaparib zwei Stunden vor der Bestrahlung hinzugegeben. Im Anschluss werden die Zellen für sieben Tage bei 5% CO₂ inkubiert, bevor über den WST-1 Assay die Zellviabilität gemessen werden kann.

Der Versuchsaufbau mit einer Kombination verschiedener Olaparib-Konzentrationen und Bestrahlungsdosen ermöglicht es nicht nur die Sensitivität auf eine der beiden Behandlungen alleine zu bestimmen, sondern auch eine eventuell durch PARP-Inhibition erreichbare Verstärkung der Radiosensitivität nachzuweisen und ab welcher Konzentration eine solche eintritt. Hier erwarten wir für die Mutationsträger verschiedener HR-Gene, entsprechend einer differentiellen Destabilisierung der DNA-Replikation, unterschiedliche Grade der Radiosensitivierung.