



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



Abschlussbericht zum medizinischen Doktorandenprojekt im Bereich der Krebsforschung

Wieviel BRCA2 wird zur Aufrechterhaltung der DNA Reparatur durch
Homologe Rekombination benötigt?

Stipendiatin

Nina Albers
Hans Thoma Straße 42
69121 Heidelberg
Telefon: +4917692414315
E-mail: nina.albers@t-online.de

AG Homologe Rekombination und Genomische Instabilität

Prof. Dr. Kerstin Borgmann (AG Leitung)
Labor für Strahlenbiologie & Experimentelle Radiooncologie Klinik und Poliklinik für
Strahlentherapie und Radiooncologie 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

Etwa zwei Drittel aller Frauen mit einer Mutation im *BRCA2*-Gen erkranken an Brustkrebs. *BRCA2* kodiert für ein Protein, das an der DNA Reparatur mittels Homologer Rekombination beteiligt und deshalb essentiell für die genomische Stabilität der Zelle ist. Funktioniert die Homologe Rekombination in einer Zelle nicht korrekt, resultiert daraus genomische Instabilität und gesteigerter DNA-Replikationsstress. Beides kann sowohl die Tumorentstehung begünstigen, als auch das Therapieansprechen beeinflussen. Bisher konnte die Bedeutung der *BRCA2* Expression für die Entstehung von Brustkrebs und die daraus resultierenden Konsequenzen für die Therapie nicht abschließend bewertet werden. Die Expression von *BRCA2* kann in Tumoren stark variieren und es konnte für mehrere Tumorentitäten bereits beobachtet werden, dass eine reduzierte Expression von *BRCA2* einen negativ prognostischen Effekt hat. Es ist daher wichtig die Effekte von verschiedenen *BRCA2* Expressionsniveaus auf die molekularen Prozesse der Tumorzellen besser zu verstehen. Bisher ist jedoch ungeklärt, ob Homologe Rekombination (HR) und DNA-Replikation bei reduzierter *BRCA2*-Expression korrekt ablaufen können.

Um Zellen mit einer reduzierten *BRCA2*-Expression zu generieren, wurde ein CRISPR-Cas9-System und eine MCF7 Zelllinie, die vier *BRCA2* Kopien trägt, verwendet. Mithilfe dieser konnten 46 Zellklone mit einer stufenweisen reduzierten *BRCA2*-Expression gewonnen werden. Zum Nachweis einer erfolgreichen Schnittstelle, wurde ein PCR-Screen durchgeführt. Hier konnten 23 positive *BRCA2*-Klone (mit Mutation in den Allelen) identifiziert werden. Um die adäquaten Insertionen oder Deletionen darzustellen, wurden sowohl *short* (200 Basenpaare) als auch *long* (500 Basenpaare) Primer verwendet, die jeweils an die Guide-RNA im Bereich Exon 7, Exon 11 oder im Bereich Exon 11-25 binden sollten. In diesen Bereichen wurde eine Schnittstelle durch das CRISPR-Cas9-Systems erwartet. Als positiv wurden hier Doppelbanden, verstärkte und verdünnte Banden sowie fehlplatzierte Banden gewertet.

Mittels Westernblot wurden die Proteinextrakte der Klone auf ihre *BRCA2* Expressionslevel weiter untersucht. Hierbei zeigten sich erfolgreich verschiedene signifikant reduzierte *BRCA2* Expressionsstufen. Diese Expressionsstufen sind notwendig, um zu untersuchen, wie viel *BRCA2* notwendig ist, um den Ablauf der HR und damit die DNA-Doppelstrangreparatur aufrecht zu erhalten.

Die HR stellt den wichtigsten DNA-Doppelstrangbruchreparaturweg dar. Um zu untersuchen, wie gut dieser in den *BRCA2* reduzierten Klonen jeweils noch funktioniert, wurden die Klone mit einem Chemotherapeutikum (Mitomycin C) behandelt. Nach 24 Stunden Reparaturzeit, wurden RAD51 Foci gemessen. RAD51 ist essenziell für eine Reparatur von Doppelstrangbrüchen und damit einer intakten HR. Die behandelten Zellen wurden auf Objektträgern aufgebracht und mittels Immunfluoreszenz gefärbt. Hierzu wurde eine EdU Färbung verwendet, um Zellen in der S-Phase zu identifizieren. Mit einer weiteren Färbung wurden die RAD51 Foci sichtbar gemacht. Die Messungen erfolgten mithilfe des MediPans.

Nach der MMC Behandlung konnte in den *BRCA2* Klonen eine erniedrigte RAD51 Foci Formation gemessen werden. Es zeigte sich eine relative Korrelation zwischen dem *BRCA2* Expressionslevel und der Anzahl der Foci/Zelle. Darüber hinaus wurde beobachtet, dass *BRCA2* Klone häufiger EdU negativ sind. Diese Zellen können nicht mehr in die S-Phase übergehen. Die *BRCA2* Klone blieben häufiger im G1-Arrest. Eine suffiziente DNA-Doppelstrangreparatur scheint demnach bereits bei einer reduzierten *BRCA2* Expression nicht mehr möglich.

An einer Publikation mit Daten aus diesem Projekt wird zur Zeit gearbeitet.