

Aus dem Institut für Humangenetik
(Direktor: Prof. Dr. med. R. Siebert)
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**Molekularzytogenetische Analyse strahleninduzierter
Chromosomenveränderungen mittels
Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
mit einer All-Human-Centromer-Probe
bei Trägerinnen einer pathogenen *BRCA1*-Mutation**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von
Katharina Elisabeth Schau
aus Hamburg

Kiel 2015

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Reiner Siebert

2. Berichterstatter: Prof. Dr. N. Arnold

Tag der mündlichen Prüfung: 13.10.2016

Zum Druck genehmigt, Kiel, den: 25.07.2016

gez.: Prof. Dr. Johann Roider (Vorsitzender des Ausschusses für Promotion)

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abkürzungsverzeichnis	IV
1. Einleitung	1
1.1. Das Mammakarzinom.....	1
1.2. Pathogenese des Mammakarzinoms	1
1.2.1. Das sporadische Mammakarzinom.....	2
1.2.1.1. Früherkennung beim sporadischen Mammakarzinom.....	2
1.2.1.2. Therapie des sporadischen Mammakarzinoms.....	2
1.2.1.3. Nachsorge beim sporadischen Mammakarzinom.....	3
1.2.2. Hereditäres Mammakarzinom	3
1.2.2.1. Genetische Ursachen des hereditären Mammakarzinoms	3
1.2.2.1.1. Bedeutung des <i>BRCA1</i> -Gens.....	4
1.2.2.1.1.1. Bedeutung von Varianten unklarer Signifikanz im <i>BRCA1</i> -Gen.....	5
1.2.2.1.1.2. Rolle des <i>BRCA1</i> -Gens in der DNA-Reparatur	5
1.2.2.2. Früherkennung und Prophylaxe beim hereditären Mammakarzinom	7
1.2.2.3. Therapeutische Besonderheiten beim hereditären Mammakarzinom.....	8
1.2.2.4. Nachsorge beim hereditären Mammakarzinom.....	9
1.3. Strahlensensibilität.....	9
1.3.1. Möglichkeiten zur Messung der Strahlensensibilität.....	10
1.3.2. Bedeutung der Strahlensensibilität für Früherkennung, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms	11
1.4. Fragestellung	12
2. Material und Methoden.....	13
2.1. Untersuchte Probanden	13
2.1.1. <i>BRCA1</i> -Mutationsträgerinnen	13
2.1.1.1. Nicht erkrankte <i>BRCA1</i> -Mutationsträgerinnen	14
2.1.1.2. Erkrankte <i>BRCA1</i> -Mutationsträgerinnen	15
2.1.2. Kontrollgruppe	15
2.2. Untersuchungsmaterial	15
2.3. Chemikalien und Verbrauchsmaterialien.....	16
2.4. Puffer und Lösungen.....	17
2.5. Geräte.....	18

2.6.	DNA-Sonden	18
2.7.	Software	19
2.8.	Methoden.....	19
2.8.1.	Ansetzen der Lymphozytenkulturen	19
2.8.2.	Bestrahlung und Mammographie	20
2.8.3.	Aufarbeiten der Lymphozytenkulturen.....	20
2.8.4.	Auftropfen der Zellsuspensionen.....	21
2.8.5.	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung	21
2.8.6.	Mikroskopie und Fotografie.....	23
2.8.7.	Zytogenetische Auswertung.....	23
2.8.8.	Statistische Auswertung.....	25
2.8.9.	Grafische Darstellung	26
3.	Ergebnisse	27
3.1.	<i>BRCA1</i> -Mutationsträgerinnen	27
3.1.1.	Befunde bei gesunden <i>BRCA1</i> -Mutationsträgerinnen	27
3.1.2.	Befunde bei erkrankten <i>BRCA1</i> -Mutationsträgerinnen	30
3.2.	Befunde in der Kontrollgruppe.....	32
3.3.	Vergleich der Ergebnisse in den Probandengruppen.....	35
3.3.1.	Vergleich der Lymphozytenkulturen gesunder <i>BRCA1</i> -Mutationsträgerinnen mit der Kontrollgruppe.....	35
3.3.2.	Vergleich der Lymphozytenkulturen erkrankter <i>BRCA1</i> -Mutationsträgerinnen mit der Kontrollgruppe.....	36
3.3.3.	Vergleich der Lymphozytenkulturen gesunder <i>BRCA1</i> -Mutationsträgerinnen mit den Lymphozytenkulturen erkrankter <i>BRCA1</i> -Mutationsträgerinnen.....	37
4.	Diskussion	40
4.1.	Methodenkritik	40
4.2.	Biologische Bedeutung der erhobenen Befunde	41
4.2.1.	Ergebnisse der Kontrollgruppe.....	41
4.2.2.	Ergebnisse bei den gesunden <i>BRCA1</i> -Mutationsträgerinnen.....	43
4.2.3.	Ergebnisse bei den erkrankten <i>BRCA1</i> -Mutationsträgerinnen.....	43
4.2.4.	Vergleich der Ergebnisse bei den Kontrollen mit denen bei den gesunden <i>BRCA1</i> -Mutationsträgerinnen	44
4.2.5.	Vergleich der Ergebnisse bei den Kontrollen mit denen bei den erkrankten <i>BRCA1</i> -Mutationsträgerinnen	45

4.2.6.	Vergleich der Ergebnisse bei den gesunden <i>BRCA1</i> -Mutationsträgerinnen mit denen bei den erkrankten <i>BRCA1</i> -Mutationsträgerinnen.....	45
4.3.	Eignung der Methode des AHC-FISH zur Messung der Strahlensensibilität und als Funktionstest zur Bestimmung von Varianten unklarer Signifikanz	46
4.4.	Methodenvergleich	47
4.5.	Bedeutung der Ergebnisse für die Anwendung von Mammographie und Strahlentherapie in der Klinik	49
4.6.	Fazit und Ausblick	50
5.	Zusammenfassung	52
6.	Literaturverzeichnis	54
7.	Anhang	68
8.	Danksagung	79
9.	Lebenslauf und Veröffentlichungen	80

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AHC	All-Human-Centromer
Aqua dest.	destilliertes Wasser
ATM	ataxia telangiectasia mutated kinase
AZ	Aktenzeichen
aze	azentrisches Fragment
BARD1	BRCA1 associated RING domain 1
BRCA1	BReast-CAnCer-Gen 1
BMI	Body Mass Index
BRIP1	BRCA1-interacting protein 1
CC	craniocaudal
CDH1	Cadherin 1
CHEK2	Checkpoint Kinase 2
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
DAPI	4,6-Diamidino-2-Phenylindoldihydrochlorid
diz	dizentrisches Chromosom
DKG	Deutsche Krebsgesellschaft
DNA	Desoxyribonukleinsäure (desoxyribonucleic acid)
DSB	Doppelstrangbrüche
dUTP	2`-Desoxyuridin 5`-triphosphat
FGFR2	Fibroblast Growths Factor Receptor
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
g	Gramm
Gy	Gray
h	Stunde
HER2	humaner epidermaler Wachstumsfaktor Rezeptor 2 (Human epidermal growth factor receptor 2)
HGVS	Human Genome Variation Society
HR	homologe Rekombination
i.d.R.	in der Regel
keV	Kiloelektronenvolt
LSP1	Lymphocyte-Specific Protein
MAP3K1	Mitogen-Activated Protein 3 Kinase 1
MeV	Megaelektronenvolt
M-FISH	Mehrfarben (Multicolor)-FISH
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
MLO	mediolateral oblique

MRT	Magnetresonanztomographie
n	Anzahl
NBN	NIBRIN
NHEJ	Nicht-homologe-End-zu-End-Verknüpfung (non-homologous end-joining)
Nr.	Nummer
num	numerische Aberration
PHA	Phytohämagglutinin
PALB2	Partner And Localizer of BRCA2
PARP	Poly-(ADP-ribose)-polymerase
PCR	Polymerase Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction)
PNM	Phosphat-Natrium-Milchpulver-Puffer
PTEN	Phosphatase and TENsin homolog
RKI	Robert Koch-Institut
rpm	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)
RR	relatives Risiko
SF2	Überlebensrate der Zellen nach einer Bestrahlung mit 2 Gy (surviving fraction 2)
SKY	spektrale Karyotypisierung
SSC	Standard Salzlösung aus Natriumchlorid und Natriumcitrat (standard saline citrat)
STK11	Serine/Threonine protein Kinase 11
TGFB1	Transformin Growth Factor, Beta-1
TP53	Tumor Protein p53
TR	Texas Red
UKSH	Universitätsklinikum Schleswig-Holstein
VUS	Varianten unklarer Signifikanz (variants of unknown significance)
vs	versus
WCP	Whole-Chromosome-Painting
WHO	Weltgesundheitsorganisation (World Health Organization)

1. Einleitung

1.1. Das Mammakarzinom

Das Mammakarzinom ist in Deutschland die häufigste maligne Tumorerkrankung der Frau (Robert Koch-Institut, 2013). Für das Jahr 2014 wird die Neuerkrankungsrate vom Robert Koch-Institut (RKI) auf rund 75.800 Erkrankungen geschätzt. Demnach hat es unter den Neuerkrankungen 75.200 Frauen und 600 Männer gegeben. Das RKI schätzt, dass etwa jede achte deutsche Frau in ihrem Leben an Brustkrebs erkrankt. Dabei ist jede vierte betroffene Frau jünger als 55 Jahre und jede zehnte Frau jünger als 45 Jahre (Robert Koch-Institut, 2013).

Brustkrebs ist eine heterogene Erkrankung, die eine Vielzahl morphologischer und molekularer Varianten zeigt (Subramaniam and Isaacs, 2005). Die histologische Klassifikation erfolgt gemäß WHO (WHO, 2003). Überwiegend handelt es sich um das duktales Mammakarzinom, welches aus dem Drüsenepithel der Brust entsteht (Böcker W, 2008). Seltener ist das lobuläre Mammakarzinom, welches aus den Drüsenlappen entsteht (Böcker W, 2008).

1.2. Pathogenese des Mammakarzinoms

Bei der Entstehung des Mammakarzinoms spielen sowohl exogene als auch endogene Faktoren eine Rolle (Gerber, 2001, Armstrong et al., 2000, Lichtenstein et al., 2000). Zu den exogenen Faktoren zählen u.a. das Alter, weibliches Geschlecht, regelmäßiger Alkoholkonsum (> 5,5 g/Tag) (Chen et al., 2011), Adipositas (BMI >30, postmenopausal) (Lahmann et al., 2004), Nulliparae, späte Erstgebärende (über 30 Jahre), frühe Menarche/späte Menopause (Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer, 2012) und hormonelle Einflüsse (insbesondere regelmäßige Östrogen-Einnahme im Rahmen einer postmenopausalen Hormonersatztherapie) (Anonymous, 1997). Bei den endogenen Faktoren wird die genomische Instabilität als eine Ursache angesehen, wodurch sich in Zellen Mutationen anhäufen (Loeb, 2001), die schließlich zu Krebs führen können. Eine erhöhte genomische Instabilität entsteht durch Funktionseinschränkungen der sogenannten Caretaker-Gene (Kinzler and Vogelstein, 1997). Caretaker-Gene sind an der Behebung von DNA-Schäden beteiligt (Shields and Harris, 2000). Beispiel dafür ist das *BRCA1*-Gen (Rosen et al., 2005), das bei der Entstehung des hereditären Mammakarzinoms eine große Rolle spielt (Miki et al., 1994) und welches vornehmlich in der vorliegenden Arbeit behandelt wird.

1.2.1. Das sporadische Mammakarzinom

Wie oben bereits erwähnt, behandelt diese Arbeit vornehmlich das hereditäre Mammakarzinom und den Zusammenhang mit einer Mutation im *BRCA1*-Gen. Im Vergleich zum sporadischen Mammakarzinom ergeben sich bei Personen mit einem genetisch bedingten erhöhten Risiko Unterschiede für Vorsorge, Therapie und Nachsorge. Um diese Unterschiede zu verdeutlichen, wird zunächst einmal zum Vergleich das sporadische Mammakarzinom und dessen Vorsorge, Therapie und Nachsorge dargestellt. Die meisten Mammakarzinome treten sporadisch auf, also zufällig und ohne Hinweis auf eine familiäre Prädisposition. Prognostische Faktoren sind neben der Histopathologie, Tumorgröße und Lymphknotenbefall der Expressionsgrad von Östrogen-, Progesteron- und HER2-Rezeptoren (Subramaniam and Isaacs, 2005). Am häufigsten tritt beim sporadischen Mammakarzinom das invasiv duktales Karzinom auf, nämlich in 40-75% der Fälle. Bei 70-80% aller invasiven Karzinome ist eine erhöhte Steroidhormonrezeptor-Expression der Tumorzellen nachweisbar und in 15-25 % eine erhöhte HER2-Expression der Tumorzellen (Subramaniam and Isaacs, 2005).

1.2.1.1. Früherkennung beim sporadischen Mammakarzinom

Eine frühzeitige Diagnosestellung ist Voraussetzung für eine optimale Behandlung und kann die Mortalitätsrate senken (Leitlinienprogramm Onkologie, 2012). Deshalb wird in Deutschland Frauen ab einem Alter von 30 Jahren jährlich eine klinische Untersuchung der Brust durch einen Gynäkologen angeboten. Diese umfasst die Palpation, Inspektion und Beurteilung des Lymphabflusses sowie die Anleitung zur Selbstuntersuchung. Frauen im Alter zwischen 50 und 70 Jahren haben Anspruch auf ein qualitätsgesichertes Mammographie-Screening in einem 2-jährigen Abstand (Leitlinienprogramm Onkologie, 2012).

1.2.1.2. Therapie des sporadischen Mammakarzinoms

Zur Therapie des sporadischen Mammakarzinoms stehen verschiedene Optionen zur Verfügung. Die Therapiewahl ist u.a. abhängig vom Tumorstadium (Größe des Primärtumors, Lymphknotenbefall, Fernmetastasen), dem Hormonrezeptorstatus, histopathologischen Befund, der Tumorlokalisation, dem Allgemeinzustand, dem Alter und dem persönlichen Wunsch der Patientin. Zur Verfügung stehen die (ablative und brusterhaltende) operative Therapie, die Strahlentherapie sowie die cytoreduktive und

endokrine medikamentöse Therapie. Häufig werden diese Therapieoptionen miteinander kombiniert (Leitlinienprogramm Onkologie, 2012).

1.2.1.3. Nachsorge beim sporadischen Mammakarzinom

Im Anschluss an eine überstandene Erkrankung erfolgt ein geregeltes Nachsorgeprogramm, bestehend aus Anamnese sowie klinischer Untersuchung, Sonographie und Mammographie beider Mammae (Khatcheressian et al., 2013). Aufgrund der Tumorbiologie sollte sich die Nachsorge über eine Zeitspanne von mindestens 10 Jahren erstrecken (Donnelly et al., 2001, Khatcheressian et al., 2006)

1.2.2. Hereditäres Mammakarzinom

Das im Rahmen einer erblichen Disposition auftretende Mammakarzinom (im Folgenden als hereditäres Mammakarzinom bezeichnet) stellt eine besondere Entität dar, die sich hinsichtlich Entstehungsmechanismus, Verlauf und Erkrankungsrisiken vom sporadischen Mammakarzinom unterscheidet. Aus diesen Unterschieden resultieren entsprechend angepasste Empfehlungen für Vor- und Nachsorge sowie die Möglichkeit prophylaktischer Maßnahmen (s.u.).

Bei bis zu 20 % der Frauen mit einem Mammakarzinom lässt sich eine Häufung in der Familie nachweisen, was auf eine erblich mitbedingte Ursache hinweisen kann (Edlich et al., 2005). Sowohl monogene Erbgänge, in denen eine Mutation in einem Gen der DNA-Reparatur mit hoher Penetranz zu einem vermehrten Auftreten des Mammakarzinoms führt, als auch polygene Erbgänge, in denen das Zusammenspiel von Mutationen in mehreren Genen mit niedriger Penetranz eine erhöhte Wahrscheinlichkeit für das Auftreten eines Mammakarzinoms prädisponieren, wurden beschrieben (Walsh et al., 2010).

1.2.2.1. Genetische Ursachen des hereditären Mammakarzinoms

Die beiden am längsten bekannten und bisher am besten erforschten Gene, die mit der Entstehung des hereditären Mammakarzinoms in ursächlichem Zusammenhang stehen, sind *BRCA1* und *BRCA2*. Mutationen in diesen Genen werden autosomal dominant vererbt und sind mit einem hohen Brustkrebsrisiko assoziiert (Turnbull and Rahman, 2008) (siehe 1.2.2.1.1). Im Jahr 2010 ist mit *RAD51C*, lokalisiert in 17q21, ein weiteres moderat penetrantes Gen für das hereditäre Mamma- und Ovarialkarzinom identifiziert worden (Meindl et al., 2010). Eine pathogene Mutation in einem dieser Gene ist mit einem zum Teil

stark erhöhten Risiko verbunden, an einem Mamma- und/oder Ovarialkarzinom zu erkranken (Meindl et al., 2010). Zudem wird Mutationen in den Genen *CDHI* (Kaurah et al., 2007), *NBN* (Bogdanova et al., 2008, Gao et al., 2013), *PTEN* (Guenard et al., 2007), *STK11* (Hearle et al., 2006) (RR 2-10) (Turnbull and Rahman, 2008) und *TP53* (RR>10) (Turnbull and Rahman, 2008) ein erhöhtes Brustkrebsrisiko zugeschrieben, allerdings mit einer sehr variablen Expressivität. So disponieren Mutationen in diesen Genen nicht nur für Mammakarzinome sondern für ein definiertes Spektrum weiterer Tumore.

Des Weiteren wird vermutet, dass bei einem größeren Teil der familiär gehäuft und in jungem Lebensalter auftretenden Mammakarzinome in *BRCA1/2*-negativen Familien die kombinierte Wirkung von Mutationen in mehreren niedrig- und moderat-penetranten Genen als Ursache anzusehen ist (Ripperger et al., 2009, Turnbull and Rahman, 2008).

Zu den Genen, in denen Mutationen mit einem moderaten Risiko für das Mammakarzinom verbunden sind, zählen *ATM*, *CHEK2*, *PALB2* (eventuell sogar hohes Risiko mit RR von 10) (Antoniou et al., 2014) und *RAD51D* (RR 1,5-5,0) (Walsh and King, 2007). Bei genomweiten Assoziationsanalysen zur Identifikation neuer Risikogene (Easton et al., 2007, Stacey et al., 2007), wurden auch Mutationen in Introns von Genen oder nicht-kodierenden Bereichen des Genoms entdeckt, die als sog. Niedrigrisikovarianten bezeichnet werden. Dazu gehören u.a. *FGFR2*, *TNRC9*, *MAP3K1*, *LSP1*, *TGFBI* und die Chromosomenregion 2q35 sowie 8q24 (Turnbull and Rahman, 2008, Easton et al., 2007). Für jedes dieser Gene existieren in vielen Populationen ein oder mehrere Risiko-Allele. Das mit dem jeweiligen Risiko-Allel assoziierte relative Risiko für ein Mammakarzinom ist mit 1,1 bis 1,3 für dessen heterozygote Trägerin jedoch sehr gering (Turnbull et al., 2010, Stacey et al., 2007). Allerdings können diese Niedrigrisikovarianten das Erkrankungsrisiko von *BRCA1/2*-Mutationsträgerinnen modulieren (Ripperger et al., 2009, Turnbull and Rahman, 2008).

1.2.2.1.1. Bedeutung des *BRCA1*-Gens

Die Analysen dieser Arbeit sind ausschließlich an Lymphozytenkulturen von *BRCA1*-Mutationsträgerinnen durchgeführt worden, weshalb sich dieser und der nächste Abschnitt auch nur mit dem *BRCA1*-Gen beschäftigen. *BRCA1* steht für BReast CAncer 1. Das *BRCA1*-Gen ist auf Chromosom 17 in der Chromosomenregion 17q21 lokalisiert (O'Donovan and Livingston, 2010). Mutationen in diesem Gen werden autosomal dominant vererbt. Ist eines der beiden Allele in der Keimbahn mutiert, erhöht sich das Krebsrisiko der betroffenen Person erheblich. Das Risiko, bis zum 70. Lebensjahr an Brustkrebs zu erkranken, liegt bei

Frauen mit einer Mutation im *BRCA1*-Gen in einer Population ohne Founder-Mutation bei 65-80 % und das Risiko, an einem Ovarialkarzinom zu erkranken, bei 20-39 % (Antoniou et al., 2003).

1.2.2.1.1.1. Bedeutung von Varianten unklarer Signifikanz im *BRCA1*-Gen

Neben den bisher identifizierten pathogenen Mutationen gibt es zahlreiche Sequenzvariationen im *BRCA1*-Gen, deren klinische Bedeutung noch nicht gesichert ist, sogenannte Varianten unklarer Signifikanz (VUS) (Calo et al., 2010). Wie in anderen Genen auch, hat nicht jede Mutation eine Auswirkung auf den Phänotyp. Mutationen können, müssen aber nicht zu einer Funktionseinschränkung der Proteine führen (Strachan and Read, 2005). VUS stellen in der Klinik ein großes Problem dar, da primär Ratsuchenden mit einer gesicherten pathogenen Mutation im *BRCA1*-Gen (oder einem der anderen hochpenetranten Risiko-Gene) die Teilnahme an intensivierten Vor- und Nachsorge-Programmen seitens der Kassen zugestanden wird (siehe 1.2.2.2 und 1.2.2.4) (Narod and Offit, 2005). Deshalb ist die Entwicklung von Funktionstests zur Identifikation von pathogenen Mutationen unter den unklaren Sequenzvarianten Gegenstand aktueller Forschungen (Ahlborn et al., 2015, Thompson et al., 2003, Abkevich et al., 2004, Deffenbaugh et al., 2002, Goldgar et al., 2004, Tavtigian et al., 2006).

1.2.2.1.1.2. Rolle des *BRCA1*-Gens in der DNA-Reparatur

Das *BRCA1*-Gen kodiert für ein nukleäres Phosphoprotein. Dieses Protein ist Bestandteil von mehreren Superkomplexen (O'Donovan and Livingston, 2010). Es existiert normalerweise als Heterodimer mit dem Protein BARD1. Das BRCA1-Protein ist unter anderem an der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen beteiligt, die für das Überleben der Zelle als kritische DNA-Läsion anzusehen sind (O'Donovan and Livingston, 2010). Da bei dieser Art der DNA-Schädigung beide Stränge betroffen sind, fehlt der komplementäre Strang als Vorlage, um eine fehlerfreie Reparatur zu ermöglichen. Die Zelle hat prinzipiell zwei Wege um die DNA-Schäden zu reparieren: Das (fehlererzeugende) non-homologous end-joining (NHEJ) und die (meist fehlerfreie) homologe Rekombination (HR) (Hartlerode and Scully, 2009). Die homologe Rekombination benutzt in der S- und G2-Phase des Zellzyklus ein intaktes Schwesterchromatid als Vorlage (Maser et al., 1997). In diesem Reparaturmechanismus spielt das BRCA1-Protein eine entscheidende Rolle. In der späten Phase der HR interagieren BRCA1 und BRCA2 (Chen et al., 1998) durch das Protein PALP2

(Sy et al., 2009, Zhang et al., 2009), um RAD51 zu rekrutieren (Greenberg et al., 2006, Bekker-Jensen et al., 2006) und das RAD51-Nukleoproteinfilament zu bilden, wodurch der Strangaustausch vermittelt wird (Scully, 2000).

DNA-Doppelstrangbrüche werden unter anderem durch ionisierende Strahlung induziert (Herrmann et al., 2006). Durch Zusammenstoß mit Elektronen von Atomen und Molekülen führt ionisierende Strahlung zur Anregung und Ionisation. Beispiele für ionisierende Strahlung sind Röntgenstrahlung oder radioaktive Strahlung, welche in der Medizin zur Diagnostik und auch zur Therapie von malignen Erkrankungen eingesetzt werden. Eine pathogene Sequenzveränderung im *BRCA1*-Gen trägt unter anderem zur verminderten Reparaturfähigkeit von strahleninduzierten Doppelstrangbrüchen und somit möglicherweise zu einer erhöhten Strahlensensibilität (siehe 1.3) bei (Pijpe et al., 2012, Ernestos et al., 2010).

Neben diesen direkten Funktionen bei der HR trägt BRCA1 auch durch die Übernahme von Aufgaben in der Zellzyklus-Checkpoint-Kontrolle, bei der Mitosespindel-Anordnung, bei der Trennung der Schwesterchromatiden und der Zentrosomen-Duplikation zur Erhaltung der genomischen Stabilität bei (O'Donovan and Livingston, 2010).

1.2.2.2. Früherkennung und Prophylaxe beim hereditären Mammakarzinom

Bei auffälliger Eigen- und/oder Familienanamnese wird unter bestimmten Bedingungen (s. Tabelle 1) die molekulargenetische Testung der Gene *BRCA1*, *BRCA2* und ggfs. *RAD51C*, *RAD51D*, *PALB2*, *CDH1*, *ATM*, *NBN*, *TP53* und *CHEK2* empfohlen (Meindl et al., 2015).

Tabelle 1: Einschlusskriterien für einen *BRCA*-Gentest nach Empfehlung des Deutschen Konsortiums Familiärer Brust- und Eierstockkrebs

Ein Gentest wird empfohlen wenn in einer familiären Linie:

- mindestens drei Frauen an Brustkrebs erkrankt sind.
- mindestens zwei Frauen an Brustkrebs erkrankt sind, davon eine vor dem 51. Lebensjahr erkrankt ist.
- mindestens eine Frau an Brustkrebs und eine Frau an Eierstockkrebs erkrankt sind.
- mindestens zwei Frauen an Eierstockkrebs erkrankt sind.
- mindestens eine Frau an Brust- und an Eierstockkrebs erkrankt ist.
- mindestens eine Frau mit 35 Jahren oder jünger an Brustkrebs erkrankt ist.
- mindestens eine Frau mit 50 Jahren oder jünger an bilateralem Brustkrebs erkrankt ist.
- mindestens ein Mann an Brustkrebs und eine Frau an Brust- oder Eierstockkrebs erkrankt sind.

Den betroffenen Mutationsträgerinnen wird die Teilnahme an einem intensivierten Früherkennungsprogramm empfohlen. Dieses Programm beinhaltet für *BRCA1/2*-Mutationsträgerinnen nach Empfehlung des "Deutschen Konsortiums Familiärer Brust- und Eierstockkrebs" ab dem 25. Lebensjahr (oder 5 Jahre vor dem frühesten Erkrankungsalter in der Familie) alle 6 Monate die klinische Untersuchung (Inspektion, Palpation und Beurteilung des Lymphabflusses) und Mamma-Sonographie durch den Arzt, sowie alle 12 Monate mindestens bis zur Vollendung des 55. Lebensjahr, maximal bis zur Vollendung des 70. Lebensjahres bzw. bis zur Involution des Brustdrüsengewebes eine Magnetresonanztomographie (MRT) der Brust. Hinzu kommt ab dem 40. Lebensjahr alle ein bis zwei Jahre eine Mammographie. Zusätzlich sollten die betroffenen Frauen schon frühzeitig zur Selbstuntersuchung angeleitet werden. Frauen ohne nachgewiesene *BRCA1/2*-Mutation aber mit einer nachgewiesenen Mutation in einem der moderat penetranten Gene (*RAD51C*, *RAD51D*, *PALB2*, *ATM*, *NBN* und *CHEK2*) wird erst ab dem 30. Lebensjahr zur Teilnahme an den Früherkennungsmaßnahmen geraten. Sie beinhaltet eine jährliche Vorsorge mittels Sonographie und klinischer Untersuchung sowie MRT. Eine

Mammographie sollte alle ein bis zwei Jahre ab dem 40. bis 45. Lebensjahr durchgeführt werden. Ab der Vollendung des 70. Lebensjahr endet das intensive Vorsorgeprogramm. (Bick and Fallenberg, 2013, Bick, 2015, Rhiem and Schmutzler, 2014).

Bei *BRCA*-Mutationsträgerinnen ermöglichen die präventive Mastektomie und die präventive Salpingo-Oophrektomie eine deutliche Risikoreduktion (Daly et al., 2010). Die prophylaktische Mastektomie reduziert das Risiko, an einem Mammakarzinom zu erkranken, um ca. 90 %. Die Salpingo-Oophrektomie reduziert das Erkrankungsrisiko für das Mammakarzinom um 50 % und für das Ovarialkarzinom um ca. 97% (Domchek et al., 2010, Finch et al., 2014). Zudem gibt es Daten, die vermuten lassen, dass eine Chemoprävention mit Tamoxifen zur Risikoreduktion beitragen könnte (Gronwald et al., 2006, King et al., 2001).

1.2.2.3. Therapeutische Besonderheiten beim hereditären Mammakarzinom

Nach der S3-Leitlinie der Deutschen Krebsgesellschaft (DKG) aus dem Jahr 2012 unterscheidet sich die Therapie des hereditären Mammakarzinoms nicht von der für das sporadisch auftretende Mammakarzinom. Es gibt jedoch Besonderheiten des *BRCA1*-vermittelten Mammakarzinoms, die eine spezifische Therapie für *BRCA*-Mutationsträgerinnen erfordern. *BRCA1*-assoziierte Karzinome ähneln in Histologie, Mitoserate, medullären Eigenschaften und lymphozytären Infiltraten dem „basalzellähnlichen“ Subtyp. Dieser Subtyp hat durch seine Aggressivität eine schlechte Prognose (Mavaddat et al., 2010, Gadzicki et al., 2009, Evans et al., 2009, Atchley et al., 2008). Zudem führt die fehlende Expression von Östrogen- und Progesteronrezeptoren, sowie von HER2 (Young et al., 2009) zu einem Wegfall wichtiger Ziele für Krebstherapien (Kwei et al., 2010). Außerdem wird vermutet, dass die Zellen *BRCA*-assoziiierter Karzinome gut auf DNA-interkalierende Substanzen wie Platinderivate ansprechen (Byrski et al., 2010), aber eine Resistenz gegen Vincaalkaloide und Taxane zeigen (Quinn et al., 2003, Lafarge et al., 2001). Eine neue Substanzklasse stellen die PARP-Inhibitoren dar, für die *BRCA1*-defiziente Zellen eine erhöhte Sensitivität haben (Farmer et al., 2005). Seit dem Jahr 2014 ist der PARP-Inhibitor Olaparid in den USA, seit Ende 2014 auch in Europa zugelassen. Allerdings beschränkt sich das Einsatzgebiet bisher nur auf die Erhaltungstherapie von Patientinnen mit einem Platin-sensitiven Rezidiv eines *BRCA*-mutierten high-grade serösen epithelialen Ovarialkarzinoms, Eileiterkarzinoms oder primären Peritonealkarzinoms (Frampton, 2015).

1.2.2.4. Nachsorge beim hereditären Mammakarzinom

Auch die Nachsorge bei Patientinnen mit einer *BRCA1*-Mutation erfolgt nach einem festgelegten Programm. Im ersten bis dritten Jahr soll die ärztliche Tastuntersuchung der erkrankten Brust alle drei Monate, ab dem vierten Jahr zusammen mit der gesunden Brust alle sechs Monate erfolgen. Nach brusterhaltender Operation kommt in den ersten drei Jahren eine Mammographie der erkrankten Brust hinzu. Ab dem vierten Jahr erfolgt diese Untersuchung zusammen mit der gesunden Brust alle 12 - 24 Monate. Weiterhin beinhaltet die Nachsorge ab dem ersten Jahr nach Diagnose alle sechs Monate die Ultraschalluntersuchung beider Brüste bzw. der Brustwand, eine Anamnese, die Durchführung klinischer Untersuchungen sowie ggf. eine Beratung. Dazu kommt alle 12 Monate ein MRT der Brust vom 25. bis 50. Lebensjahr bzw. bis zur Involution des Brustdrüsengewebes (maximal bis zum 70. Lebensjahr) (persönliche Kommunikation mit Prof. Dr. med. Mundhenke, Tumorrisikosprechstunde, Universitätsklinikum Schleswig Holstein, Campus Kiel).

1.3. Strahlensensibilität

Wie bereits in 1.2.2.1.1.2 erwähnt, haben *BRCA1*-Mutationsträgerinnen eine verminderte Reparaturkapazität von strahleninduzierten Doppelstrangbrüchen, und damit möglicherweise eine erhöhte Strahlensensibilität. Strahlensensibilität oder auch intrinsische Strahlenempfindlichkeit ist definiert als „die genetisch determinierte Empfindlichkeit von Zellen gegenüber ionisierender Bestrahlung“ (Herrmann et al., 2006). Die surviving fraction 2 (SF2) ist „die Überlebensrate der Zellen nach einer Bestrahlung mit 2 Gy“ (Herrmann et al., 2006) und kann für verschiedene Zellarten sehr unterschiedlich sein. Ionisierende Strahlung schädigt die DNA. Unter anderem entstehen DNA-Doppelstrangbrüche (DSB) (Powell and McMillan, 1990), was Zelltod oder Mutationen zur Folge haben kann (Steel et al., 1989, Iliakis, 1991). Im Verlauf kann eine Kumulation dieser Schäden zu chromosomalen Aberrationen führen (Obe et al., 1992), die Grund für frühe (Zelltod) (Obe et al., 1992) oder späte Folgen (Krebsentstehung) sind (Hagmar et al., 1998). Die zu beobachtenden Aberrationen können für die Zelle letal oder nicht letal sein. Azentrische Fragmente gelten als Folge nicht reparierter Chromosomenbrüche und können aufgrund des fehlenden Zentromers in der Metaphase nicht auf die Tochterzellen verteilt werden. Sie werden deshalb aus der Zelle geschleust (Cornforth and Goodwin, 1991). Dizentrische Chromosomen führen durch Entstehung von Anaphasenbrücken zum Verlust der Teilungsfähigkeit der Zelle. Eher nicht letal sind dagegen Translokationen, Inversionen, Deletionen und komplexere

Chromosomenaberrationen. Sie entstehen aufgrund von fehlerhafter DNA-Reparatur (Obe et al., 2002). Bei Erhalt der Teilungsfähigkeit können diese Chromosomenaberrationen zu einem Tumorklon auswachsen (Bonassi et al., 2000). Unter normalen Umständen werden DNA-Schäden jedoch durch verschiedene Mechanismen aufgedeckt und repariert (Iliakis et al., 2004). Hoch dosierte Strahlung kann DNA-Schäden in einem Ausmaß verursachen, das von den Reparatursystemen nicht repariert werden kann (Selzer and Hebar, 2012).

1.3.1. Möglichkeiten zur Messung der Strahlensensibilität

Für die Bestimmung der Strahlensensibilität gibt es keine einheitliche Standardmethode. Es sind verschiedene Assays bekannt, die sich in verschiedenen Punkten unterscheiden (Muller and Streffer, 1991). Der Comet-Assay (Nieuwenhuis et al., 2002), der Kolonietest (Pomp et al., 1996), der Mikronukleustest (Pajic et al., 2015) und die γ -H2A-Foci-Färbung (Kuo and Yang, 2008) werden unter anderem für den Nachweis genetischer Schäden an Interphasezellen verwendet. Für den Nachweis von Chromosomenschäden werden die Chromosomenanalyse (Ernestos et al., 2010), sowie verschiedene Anwendungsformen der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung, wie die spektrale Karyotypisierung (SKY) (Szeles et al., 2006), Multicolor-FISH (M-FISH) und verschiedene Whole-Chromosome-Paintings (WCP) (Cornforth, 2001, Gray et al., 1994) verwendet. In der vorliegenden Arbeit soll die Strahlensensibilität mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) mit einer All-Human-Centromer (AHC)-Sonde untersucht werden. Diese Sonde bindet an alle 24 Zentromere, so dass diese unter dem Mikroskop sichtbar werden. Dadurch können numerische Aberrationen, (= abweichende Zahl der Zentromere), azentrische Fragmente und dizentrische Chromosomen dargestellt werden. Dies erschien vielversprechend, da die Bestimmung von azentrischen Fragmenten und dizentrischen Chromosomen schon lange zur Bestimmung von Strahlensensibilität an Lymphozyten genutzt wird (Kakati et al., 1986) und mittels All-Human-Centromer-FISH möglich ist.

Nach Borgmann et al. (2002) scheinen Lymphozyten für die Bestimmung der humanen Strahlensensibilität als Untersuchungsmaterial geeigneter zu sein als Fibroblasten. Die Strahlensensibilität der Lymphozyten korreliert besser mit der Anzahl letaler Chromosomenstörungen als die von Fibroblasten (Borgmann et al., 2002). Üblicherweise werden die Zellen in der G0/G1-Phase des Zellzyklus bestrahlt und nach Abschluss des Zellzyklus untersucht, damit genug Zeit für die DNA-Reparatur bleibt, um im Anschluss

deren Effizienz bewerten zu können (Kote-Jarai et al., 2006). Dieses Bestrahlungsschema wurde hier übernommen.

1.3.2. Bedeutung der Strahlensensibilität für Früherkennung, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms

Ionisierende Strahlung wird in der Früherkennung/Nachsorge in Form von Mammographie und in der Therapie bei der Bestrahlung eingesetzt. Bei der Mammographie handelt es sich um weiche Röntgenstrahlung. Dabei kommen geringe Strahlungsenergien (ca. 30 keV) zur Verwendung, um einen hohen Weichteilkontrast zu ermöglichen und z.B. Mikrokalk als morphologisches Korrelat für maligne Veränderungen zu identifizieren. Pro Aufnahme beträgt die Parenchyndosis ca. 0,002 bis 0,0025 Gy. Um die gesamte Brust mittels Mammographie zu beurteilen, werden standardmäßig zwei Aufnahmen durchgeführt. Dabei handelt es sich zum einen um die mediolateral oblique-Aufnahme (MLO) und zum anderen um die craniocaudale Aufnahme (CC) (Reiser et al., 2011). Da in-situ Karzinome und Vorläuferstufen im Frühstadium so entdeckt werden konnten, wurde seit Einführung des Mammographie Screenings für Frauen mit einem durchschnittlichen Brustkrebsrisiko eine Reduktion der Mortalität um 0,1% erreicht (Gibis et al., 1998). Es gibt epidemiologische Studien, die Anlass zu der Befürchtung geben, dass bei einem jährlichen Mammographie-Screening vor dem 40. Lebensjahr der Schaden durch strahleninduzierte Tumore größer sein könnte, als der Nutzen eines frühen Tumornachweises (Berrington de Gonzalez and Reeves, 2005). Diese Studien betreffen Patienten mit normaler Strahlensensibilität. Im Hinblick auf den frühen Beginn und die höhere Frequenz von Mammographien bei *BRCA1*-Mutationsträgerinnen könnte die intensivierete Vor-/Nachsorge aber möglicherweise auch zur Entstehung von strahleninduzierten Tumoren beitragen (Berrington de Gonzalez et al., 2009, Pijpe et al., 2012).

Die Strahlentherapie hat im Behandlungskonzept des Mammakarzinoms nach operativer Therapie zur Prophylaxe eines Lokalrezidivs einen festen Platz (Sautter-Bihl et al., 2007). Es handelt sich dabei heutzutage um ultraharte (bis 30 MeV) Röntgenbremsstrahlung, die in einem Linearbeschleuniger erzeugt wird (Kauffmann et al., 2011). Dabei wird die definierte Zielregion mit insgesamt 50 Gy, fraktioniert in fünf mal 2,0 Gy Einzeldosen pro Woche mit Photonen des Linearbeschleunigers bestrahlt (Clarke, 2006, Darby et al., 2011). Anschließend folgt eine sog. "Boost-Bestrahlung" des Tumorbettes mit insgesamt 10-16 Gy in 5 Einzeldosen a 2,0 Gy pro Woche (Antonini et al., 2007, Bartelink et al., 2007,

Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft). Bis vor einigen Jahren wurde zur Strahlentherapie eine Kobalt 60-Kanone verwendet. Die entstandene Gamma-Strahlung erzeugt eine Leistung von ca. 1 MeV (Reiser et al., 2011). In der hier vorliegenden Arbeit wurde eine Kobalt 60-Kanone zur Bestrahlung der Lymphozyten eingesetzt. Auch die therapeutische Bestrahlung bei brusterhaltender Therapie oder die Bestrahlung der Thoraxwand und der Lymphknoten könnte im Falle einer erhöhten Strahlensensibilität der *BRCA1*-Mutationsträgerinnen mit einem erhöhten Risiko für die Entstehung strahleninduzierter Tumore verbunden sein (Turnbull et al., 2006, Kirova et al., 2008).

1.4. Fragestellung

Das übergeordnete Ziel der vorliegenden Arbeit war es zu ermitteln, ob Frauen mit einer *BRCA1*-Mutation gegenüber Frauen aus der Normalbevölkerung eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber ionisierenden Strahlen haben. Dazu sollte zunächst die AHC-FISH-Methode etabliert werden. Im Einzelnen sollten folgende Aspekte untersucht werden:

- Wie verhalten sich die Häufigkeiten von Aberration in Lymphozytenkulturen nach Mammographie und nach Bestrahlung mit 4 Gy Kobalt 60 zu unbestrahlten Lymphozytenkulturen von jeweils gesunden und erkrankten *BRCA1*-Mutationsträgerinnen sowie Normalkontrollen?
- Zeigen sich signifikante Unterschiede in der Häufigkeit von Aberrationen in Lymphozytenkulturen von gesunden *BRCA1*-Mutationsträgerinnen und Kontrollen jeweils unbestrahlt, nach Mammographie und nach Bestrahlung mit 4 Gy Kobalt?
- Zeigen sich signifikante Differenzen in der Häufigkeit von Aberrationen in Lymphozytenkulturen von erkrankten *BRCA1*-Mutationsträgerinnen und Kontrollen jeweils unbestrahlt, mammographiert und nach Bestrahlung mit 4 Gy Kobalt?
- Gibt es Unterschiede in der Häufigkeit von Aberrationen in Lymphozytenkulturen von erkrankten und gesunden *BRCA1*-Mutationsträgerinnen jeweils unbestrahlt, nach Mammographie und nach Bestrahlung mit 4 Gy Kobalt?

Mit den durchgeführten Untersuchungen sollte beurteilt werden, welche Bedeutung die erhobenen Ergebnisse für die Durchführung von Mammographie und Strahlentherapie haben. Zusätzlich sollte beurteilt werden, ob die Methode die Möglichkeit der Nutzung zur Identifizierung von bisher VUS als pathogene Mutation bietet.

2. Material und Methoden

2.1. Untersuchte Probanden

Zur Klärung der Frage, ob sich eine erhöhte Strahlensensibilität von *BRCA1*-Mutationsträgerinnen mittels AHC-Sonde gegenüber einer Kontrollgruppe ohne nachgewiesene Mutation im *BRCA1*-Gen nachweisen lässt, wurden Lymphozytenkulturen von Frauen aus der Normalbevölkerung (= Kontrollpersonen), sowie von *BRCA1*-Mutationsträgerinnen nach 2-Schicht-Mammographie, nach Bestrahlung mit 4 Gy Kobalt 60 sowie unbestrahlte Lymphozyten auf azentrische Fragmente, dizentrische Chromosomen sowie numerische Aberrationen untersucht und die Ergebnisse miteinander verglichen. Um zu klären, ob eine Erkrankung bzw. bisherige Therapie einen Einfluss auf die Strahlensensibilität der Lymphozyten hat, wurden die Ergebnisse von noch nicht erkrankten *BRCA1*-Mutationsträgerinnen mit den Ergebnissen von *BRCA1*-Mutationsträgerinnen verglichen, die bereits an einem Mamma- und/oder Ovarialkarzinom erkrankt waren.

2.1.1. *BRCA1*-Mutationsträgerinnen

Insgesamt wurden 21 Frauen untersucht, die eine konstitutionelle Sequenzveränderung im *BRCA1*-Gen tragen. Die Mutationen wurden im Rahmen der genetischen Diagnostik zur Abklärung einer möglichen genetischen Prädisposition für das hereditäre Mamma-/Ovarialkarzinom aufgrund einer auffälligen Eigen- und/oder Familienanamnese nach ausführlicher genetischer Beratung in der Sprechstunde zum hereditären Brust-/Eierstockkrebs Kiel in der Zeit von 2007 bis 2010 diagnostiziert. Die Einstufung als pathogene Mutation erfolgte durch den Leiter des onkologischen Labors, Prof. Dr. N. Arnold, nach dem damaligen Stand von Wissenschaft und Technik. Die Sequenzveränderungen sind in Tabelle 2 dargestellt.

Tabelle 2: Sequenzveränderungen im BRCA1-Gen der untersuchten Probandinnen nach HGVS-Nomenklatur sowie die Auswirkung auf das Protein

Probandennr.	Refseq.	HGVS-Nomenklatur	Proteinbez.	Protein
1	NM_007294.3	c.5266dupC	NP_009225.1	p.Gln1756Profs*74
2	NM_007294.3	c.2411_2412delAG	NP_009225.1	p.Gln804Leufs*5
3	NM_007294.3	c.5333-36_5406+400del510	NP_009225.1	p.?
4	NM_007294.3	c.5266dupC	NP_009225.1	p.Gln1756Profs*74
5	NM_007294.3	c.4185G>A	NP_009225.1	p.(=)
6	NM_007294.3	c.5266dupC	NP_009225.1	p.Gln1756Profs*74
7	NM_007294.3	c.5266dupC	NP_009225.1	p.Gln1756Profs*74
8	NM_007294.3	c.763G>T	NP_009225.1	p.Glu255*
9	NM_007294.3	c.5109T>G	NP_009225.1	p.Tyr1703*
10	NM_007294.3	c.5266dupC	NP_009225.1	p.Gln1756Profs*74
11	NM_007294.3	c.5266dupC	NP_009225.1	p.Gln1756Profs*74
12	NM_007294.3	mlpaBRCA1 exon8-13 (P002-C2)x1	NP_009225.1	p.?
13	NM_007294.3	c.5266dupC	NP_009225.1	p.Gln1756Profs*74
14	NM_007294.3	c.5503C>T	NP_009225.1	p.Arg1835*
15	NM_007294.3	c.2475delC	NP_009225.1	p.Asp825Glufs*21
16	NM_007294.3	c.181T>G	NP_009225.1	p.Cys61Gly
17	NM_007294.3	c.4986+4a>g	NP_009225.1	p.?
18	NM_007294.3	c.181T>G	NP_009225.1	p.Cys61Gly
19	NM_007294.3	c.5109T>G	NP_009225.1	p.Tyr1703*
20	NM_007294.3	c.3481 del GAAGATACTAG	NP_009225.1	p.Glu1161Phefs*3
21	NM_007294.3	mlpaBRCA1 exon8-13 (P002-C2)x1	NP_009225.1	p.?

Probandennr.: Probandennummer, Refseq: Referenzsequenz, Proteinbez.: Proteinbezeichnung

2.1.1.1. Nicht erkrankte *BRCA1*-Mutationsträgerinnen

Von den 21 untersuchten *BRCA1*-Mutationsträgerinnen waren zehn Mutationsträgerinnen nicht onkologisch erkrankt. Der Einfachheit halber werden diese Personen im Folgenden als „gesunde *BRCA1*-Mutationsträgerinnen“ bezeichnet.

2.1.1.2. Erkrankte *BRCA1*-Mutationsträgerinnen

Von den 21 untersuchten *BRCA1*-Mutationsträgerinnen waren neun an einem Mammakarzinom und zwei an einem Mamma- und Ovarialkarzinom erkrankt. Die Patientinnen befanden sich zum Zeitpunkt der Blutentnahme in sehr unterschiedlichen Stadien der bisher durchgeführten Behandlung. Ein Teil der Patientinnen befand sich zum Untersuchungszeitpunkt mitten in der Chemo- oder Radiotherapie. Bei dem anderen Teil lag die Behandlung drei Monate bis 11 Jahre zurück.

2.1.2. Kontrollgruppe

Als Kontrollen dienten ausschließlich weibliche Personen: neun Frauen, bei denen und in deren Familien keine Mamma- und/oder Ovarialkarzinome aufgetreten sind. Die Kontrollpersonen wurden nicht auf eine Mutationen in den Genen *BRCA1/-2* untersucht. Die Wahrscheinlichkeit einer pathogenen Mutation in den Genen *BRCA1/-2* oder einem anderen hochpenetranten „Brustkrebsgen“ bei gesunden Frauen mit unauffälliger Familienanamnese bei einer Inzidenz von ca. 1:100 bis 1:200 wurde dabei in Kauf genommen.

2.2. Untersuchungsmaterial

Bei allen untersuchten Proben handelte es sich um frisches oder per Post versandtes heparinisiertes Venenblut. Die Blutentnahmen fanden nach ausführlicher Information über das Projekt und nach Einholung des schriftlichen Einverständnisses der Probanden statt. Für das Projekt wurde das Votum der Ethikkommission der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel eingeholt (AZ.: 151/08). Alle Blutproben wurden im Zeitraum von 2007 bis 2010 entnommen und im Institut für Humangenetik am Universitätsklinikum Schleswig-Holstein (UKSH), Campus Kiel, entsprechend der dort etablierten Techniken pseudonymisiert, prozessiert und analysiert.

2.3. Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Die folgende Tabelle stellt die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien und Verbrauchsmaterialien sowie deren Hersteller mit Herstellungsort an.

Tabelle 3: Übersicht über die verwendeten Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller
Atto550-dUTP-PCR	Jena Bioscience
Colcemid	Gibco, Darmstadt, Deutschland
DAPI (4,6-Diamidino-2-Phenylindoldihydrochlorid)	Serva, Heidelberg, Deutschland
Eisessig	J.T.Baker, Deventer, Niederlande
Ethanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Fixogum-Kleber	Marabu, Tamm, Deutschland
Igepal	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Methanol	J.T.Baker, Deventer, Niederlande
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Paraformaldehyd	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
PB-MAX TM Karyotyping Medium	Invitrogen, GIBCO
Protease	Abbott, Wiesbaden, Deutschland
Proteaselösung	Abbott, Wiesbaden, Deutschland
S-Monovette Lithium-Heparin	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Spectrum green	Enzo Life Science, Lörrach, Deutschland
SSC (20x)	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Texas Red	Molecular Probes, Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
VectaShield	Vector Laboratories, Burlingame, USA

2.4. Puffer und Lösungen

In der folgenden Tabelle sind die verwendeten Puffer und Lösungen in ihrer Zusammensetzung und Konzentration aufgeführt.

Tabelle 4: Übersicht über die verwendeten Puffer und Lösungen

Bezeichnung	Zusammensetzung	Konzentration
Fixativ	Methanol und Eisessig	3:1
DAPI-Gebrauchslösung	DAPI-Stammlösung in 2×SSC-Lösung	500 µl in 500 ml
DAPI-Stammlösung	DAPI in Aqua dest.	10 mg in 50 ml
Hypotonie	NaCl und KCl in Aqua dest.	0,4g und KCl in 1000 ml
Paraformaldehyd (1%)	Paraformaldehyd in Aqua dest.	10g in 1000 ml
Proteaselösung	Protease in Proteasepuffer	250mg in 500 ml
2×SSC-Lösung	20 × SSC (standard saline citrat: 0,3 M NaCl + 0,03 M Na-Zitrat) mit Aqua dest. verdünnt.	1:10
Waschpuffer I	Igepal und 20 x SSC mit Aqua dest. aufgefüllt	3 ml und 20 ml auf 1000 ml gefüllt
Waschpuffer II	Igepal und 20 x SSC mit Aqua dest. aufgefüllt	1 ml und 100 ml auf 1000 ml gefüllt

2.5. Geräte

Die nachfolgende Tabelle gibt die verwendeten Geräte sowie deren Hersteller an.

Tabelle 5: Übersicht über die verwendeten Geräte und die Hersteller

Bezeichnung	Hersteller
Brutschrank	Heraeus, Hanau, Deutschland
Filtersätze für Fluoreszenzmikroskop: „Blaufilter“ (HC – mFISH filter set Spectrum Aqua) „Goldfilter“ (HC - mFISH filter set Spectrum Gold) „Grünfilter“ (HC - mFISH filter set Spectrum Green) „Rotfilter“ (HC – mFISH filter set Spectrum Orange) „Breitbandfilter“ (HC - Multiband Filterset DAPI / SpGreen / SpOrange with tripleband exciter)	AHF, Tübingen, Deutschland
Fluoreszenzmikroskop Axioskop	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Lichtmikroskop	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Mammograph. medical Mammomat 3000	Siemens Healthcare, Erlangen, Deutschland
Sterilbench Antair BSK	Sterilbench Antair BSK
Theratron 780 (Cobalt 60)	Theratronics ICS AECL, Siemens
Vortex Genie 2	Scientific Industries, Bohemia, USA
VP 2000 Processor	Abbott, Molecular Inc., Des Plaines, USA
Wasserbad	Labortechnik Köttermann, Hänigsen, Deutschland
Zentrifugen: Pico Fuge	Stragogene, La Jolla, USA
Universal 16	Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland

2.6. DNA-Sonden

Die DNA-Sonden für die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung wurden im onkologischen Labor der Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe am UKSH, Campus Kiel, hergestellt und freundlicherweise für dieses Projekt zur Verfügung gestellt. Dabei handelte es sich um ein Gemisch, bestehend aus whole chromosome-paint (WCP)-Sonden für die Chromosomen 1, 2 und 4 sowie einer 121 nt langen alpha-Satelliten-DNA-Sonde, die die Zentromere aller menschlichen Chromosomen detektiert (AHC-probe), da sich diese Sequenzen repetitiv in den Zentromeren wiederfinden. Die Sonde für Chromosom 1 wurde mit dem Fluoreszenz-Farbstoff Texas Red (Molecular Probes), die Sonde für Chromosom 2 mit Spectrum Green (Enzo Life Science) und die Sonde für Chromosom 4 mit Texas Red plus Spectrum Green

markiert. Die Chromosomen 1, 2 und 4 wurden gewählt, da sie drei der größten Chromosomen des menschlichen Genoms sind und zusammen etwa ein Fünftel des gesamten Genoms detektieren. Chromosom 3 wurde ausgeschlossen, da es viele fragile Stellen enthält. Die AHC-Sonde wurde mit Atto550-dUTP-PCR in rot (Jena Bioscience) markiert.

2.7. Software

Die Mikrofotografie und Auswertung der hybridisierten Metaphasen erfolgte mit der Software ISIS V 5.2.11 der Firma MetaSystems, Altlußheim, Deutschland. Die statistische Analyse wurde mit dem Softwareprogramm SPSS 15.0, IBM, Ehningen, Deutschland, durchgeführt.

2.8. Methoden

Von allen Probanden wurden aus dem Venenblut Lymphozytenkulturen angesetzt. An allen Lymphozytenkulturen wurden eine konventionelle Chromosomenbänderungsanalyse sowie Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierungen zum einen mit einem WCP-Assay und zum anderen mit dem AHC-Assay durchgeführt. Die Ergebnisse der Chromosomenanalyse sind Gegenstand einer anderen medizinischen Dissertation (Frau Saskia Sieprat). Die Auswertung des WCP-Assays erfolgte im Rahmen eines durch die Deutsche Krebshilfe geförderten Projektes am Institut für Humangenetik der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel überwiegend durch Frau Christine Wilhelms. Da die WCP-Sonden und die All-Human-Centromere-Sonde Bestandteil eines Sondengemisches waren, wurden die Präparate zwar zusammen hybridisiert, die Methoden wurden jedoch getrennt ausgewertet. Sowohl das Ansetzen als auch das Aufarbeiten der Lymphozytenkulturen erfolgte durch Frau Sieprat und Frau Wilhelms. Auch die Hybridisierung der unbestrahlten und mit 4 Gy Kobalt 60 bestrahlten Lymphozytenkulturen wurde von Frau Wilhelms durchgeführt. Die Hybridisierung und die Fotografie der mammographierten Proben erfolgte hingegen durch die Autorin dieser Arbeit.

2.8.1. Ansetzen der Lymphozytenkulturen

Für alle drei Methoden wurden die Lymphozytenkulturen zusammen angesetzt, kultiviert, aufgearbeitet und aufgetropft. Wenn nicht anders angegeben, wurden die folgenden Arbeitsschritte bei Raumtemperatur durchgeführt.

Pro Fall wurden zehn Lymphozytenkulturen angesetzt. Pro Lymphozytenkultur wurden 5 ml Zellkulturmedium (PB-MAXTM) mit je 500 µl Blut versetzt. Danach wurden die Lymphozytenkulturen im Brutschrank für zwei Tage bei 37 °C ohne CO₂ inkubiert.

2.8.2. Bestrahlung und Mammographie

Nach 48 Stunden wurden die Lymphozytenkulturen unterschiedlichen Bestrahlungen ausgesetzt: Je zwei Lymphozytenkulturen wurden mit 2, 4 bzw. 6 Gy Kobalt 60 bestrahlt, je zwei weitere Lymphozytenkulturen wurden mammographiert und je zwei Lymphozytenkulturen jeder Probandin blieben als interne Kontrolle unbestrahlt. Die Bestrahlung erfolgte mit der Kobalt 60-Kanone (γ -Strahlung) mit freundlicher Unterstützung der Klinik für Strahlentherapie am UKSH, Campus Kiel (PD Dr. Siebert, Prof. Dr. Niehoff). Bei der Mammographie handelte es sich um eine 2-Schicht-Mammographie. Die Strahlendosis entsprach ungefähr 0,005 Gy (2 x 0,0025 Gy). Allerdings handelte es sich hier um Röntgenstrahlung. Die Mammographie erfolgte mit freundlicher Unterstützung des Mammazentrums am UKSH, Campus Kiel (Frau Prof. Dr. Schreer). Nach der Bestrahlung wurden die Lymphozytenkulturen für weitere 24 Stunden bei 37 °C inkubiert. In dieser Zeit erfolgte die Reparatur der DNA-Schäden, die durch die Bestrahlung ausgelöst wurden. Der Erfolg dieser DNA-Reparatur ist abhängig von der individuellen Leistungsfähigkeit der endogenen DNA-Reparaturfähigkeit. Die nicht reparierten DNA-Schäden können mittels Chromosomenanalyse oder Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung als Chromosomenaberrationen wie z.B. azentrische Fragmente, dizentrische Chromosomen, Translokationen, Aneuploidien u.a. visualisiert und quantifiziert werden.

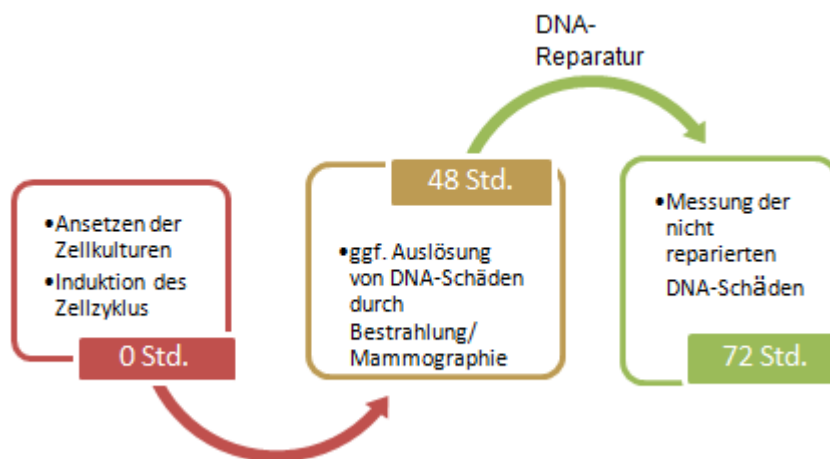


Abbildung 1: Zeitlicher Ablauf des Versuchsaufbaus

2.8.3. Aufarbeiten der Lymphozytenkulturen

Für die Chromosomenpräparation wurde nach insgesamt 72 Stunden Kultivierungsdauer je 100 μ l Colcemid zu den Lymphozytenkulturen gegeben. Danach wurden die Kulturen noch

einmal für 45 Minuten bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Lymphozytenkulturen für zehn Minuten bei 1000 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in auf 37 °C vorgewärmter hypotoner Lösung resuspendiert. Nach 15-minütiger Inkubation bei 37 °C wurden die Suspensionen für zehn Minuten bei 1000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen mit eiskaltem Methanol-Eisessig-Gemisch (Fixativ) fixiert und die Suspensionen bei 1000 rpm zehn Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet ein- bis zweimal in Fixativ gewaschen und bis zum Auftropfen auf die Objektträger bei -20°C gelagert.

2.8.4. Auftropfen der Zellsuspensionen

Für alle drei Methoden wurde Lymphozytensuspension auf Objektträger getropft. Auf den Objektträgern wurde mittig ein deckgläschengroßes Areal (10 x 10 mm) mit einem Glasschreiber markiert. Aus ca. 10 cm Höhe wurde mit einer Glaspipette ein Tropfen des Lymphozytensediments in die Mitte des markierten Areals getropft. Danach wurde unter dem Mikroskop überprüft, ob sich auf dem Objektträger genügend gespreitete Metaphasen befanden. Falls dies nicht der Fall war, wurde nachgetropft und erneut kontrolliert.

2.8.5. Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung

Die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung dient dem Nachweis von numerischen und strukturellen Chromosomenveränderungen. Das Grundprinzip ist die spezifische Basenpaarung zwischen der Sequenz der zu untersuchenden DNA und einer dazu komplementären Sonde. Durch Erhitzen werden die DNA des Untersuchungsmaterials und die DNA der Sonde vorübergehend in Einzelstränge überführt. Beim langsamen Abkühlen lagert sich die Sonde an den komplementären Bereich der zu untersuchenden DNA an. Diesen Vorgang bezeichnet man als Hybridisierung. Die Darstellung der fluoreszierenden DNA-Abschnitte kann sowohl an Metaphase- als auch an Interphasekernen erfolgen (Cremer, 1995).

Beim WCP-Assay hybridisieren die aus vielen kleinen DNA-Fragmenten eines Chromosoms bestehenden Sonden an das jeweilige Zielchromosom und färben somit das gesamte Metaphasechromosom an. Die AHC-Sonde bindet spezifisch an alle Zentromere der 46 menschlichen Chromosomen.

Für den WCP-Assay wurden nur unbestrahlte, mammographierte sowie mit 4 Gy bestrahlte Lymphozytenkulturen hybridisiert und ausgewertet. Auf die Analyse der mit 2 Gy und 6 Gy bestrahlten Lymphozytenkulturen wurde verzichtet, da in einem Vorversuch bei 2 Gy zu wenig und bei 6 Gy zu viele Chromosomenaberrationen für eine Auswertung mittels WCP auftraten. Die Analyse der Lymphozytenkulturen nach Mammographie erfolgte trotz der geringen Strahlenbelastung aus wissenschaftlichem Interesse.

Um das Zytoplasma zu entfernen, wurden die Präparate einem 20 minütigen Verdau mit einer Proteaselösung unterzogen. So wurde zum einen die Permeabilität für die Sonde in den Zellkern erhöht, zum anderen wurden Zytoplasmabestandteile entfernt, die zu störendem Fluoreszenzhintergrund führen könnten.

Die Proteasebehandlung erfolgte automatisiert im VP 2000 nach folgendem Protokoll:

- 5 Min. Protease 37 °C
- 1 Min. H₂O Raumtemperatur
- 2 Min. 1 % Paraformaldehyd Raumtemperatur
- 1 Min. H₂O Raumtemperatur
- 2 Min. 70 % Ethanol Raumtemperatur
- 2 Min. 80 % Ethanol Raumtemperatur
- 2 Min. Ethanol absolut Raumtemperatur
- 5 Min. Trocknen Raumtemperatur

Nach dem Verdau wurde auf den markierten Bereich des Objektträgers jeweils 5 µl Sondengemisch gegeben. Die Hybridisierungsfelder wurden mit einem Deckgläschen abgedeckt und mit Fixogum versiegelt, um das Verdunsten der Sonde zu unterbinden. Anschließend wurden die Präparate in einer feuchten Kammer für sieben Minuten in einem 70 °C heißen Wasserbad inkubiert und über Nacht bei 37 °C hybridisiert. Am folgenden Tag wurden Fixogum und Deckgläschen entfernt und die Präparate zur Entfernung überschüssiger DNA-Sonde nach folgendem Protokoll im VP 2000 gewaschen:

- 2 Min. Waschpuffer 1 72 °C

- 1 Min. Waschpuffer 2 Raumtemperatur
- 1 Min. 2x SSC Raumtemperatur
- 5 Min. DAPI Raumtemperatur
- 240 Min. 2x SSC Raumtemperatur

Nach dem Waschvorgang wurden die Präparate zum Schutz vor Ausbleichen mit VectaShield eingedeckelt und lichtgeschützt aufbewahrt.

2.8.6. Mikroskopie und Fotografie

Die Chromosomenpräparate wurden mit dem Fluoreszenzmikroskop (Axioskop, Zeiss) unter Verwendung des Softwareprogrammes Isis 5.2.11 der Firma MetaSystems analysiert. Die Metaphasen wurden fotografiert und gespeichert. Von jeder Metaphase wurde je ein Einzelfoto der Sonden (jeweils mit dem entsprechenden Filter) und jeweils eins in DAPI und DEAC gemacht, wobei das Softwareprogramm diese fünf Fotos zu einem mehrfarbigen Bild zusammensetzte. Insgesamt wurden pro Präparat möglichst 25 Metaphasen fotografiert. Nur bei wenigen Lymphozytenkulturen war der Mitoseindex zu gering, um die angestrebte Zahl von 25 Metaphasen zu erreichen, so dass diese Fälle nicht ausgewertet werden konnten.

2.8.7. Zytogenetische Auswertung

Für die Auswertung des All-Human-Centromer-Assays wurden die ersten auswertbaren 25 Metaphasen pro Fall verwendet, welche mindestens 44 morphologisch gut voneinander abgrenzbare Chromosomen enthielten. In einigen Experimenten war die angestrebte Analyse von 25 Metaphasen auf Grund mangelnder Zellproliferation nicht möglich. Dies betraf insbesondere Zellkulturen nach Bestrahlung mittels 4 Gy. Um eine ausreichende Zahl an Experimenten auswerten zu können, wurden auch Experimente mit einer Abweichung der Metaphasenzahl von weniger als zwei Standardabweichungen vom Mittelwert in die Auswertung mit eingeschlossen. Die Auswertung erfolgte unverblindet, d.h. bei der Auswertung war durch die Fallnummer bekannt, ob es sich um eine unbestrahlte, eine mammographierte oder eine mit 4 Gy Kobalt 60 bestrahlte Kultur handelte. Auch ob es sich um eine Probe einer Mutationsträgerin oder einer Kontrolle bei der ausgewerteten Probe handelt, war durch die Beschriftung der Proben ersichtlich. Lediglich die Unterscheidung zwischen gesunden und erkrankten Mutationsträgerinnen konnte anhand der Fallbeschriftung

nicht erfolgen. Zur Kontrolle wurden die Präparate ein zweites Mal durch die MTA Frau Wilhelms sowie durch die wissenschaftliche Mitarbeiterin Frau Dr. rer. nat. Jana Gutwein begutachtet. Bei diskrepanten Ergebnissen erfolgte zusätzlich eine Begutachtung durch Frau Dr. rer. nat. Simone Heidemann.

Zur genaueren Beurteilung wurden die Chromosomen in Einzelfarben analysiert. Als erstes wurde die Chromosomenzahl im DAPI-Filter bestimmt, da in dieser Darstellung die Struktur und Morphologie der einzelnen Chromosomen gut zu erkennen ist. Im Anschluss wurden die Zentromere gezählt. Dazu wurde zusätzlich zum DAPI-Filter der Texas Red-Filter verwendet. Für die Auswertung wurden azentrische Fragmente (Chromosomen ohne Zentromer), dizentrische Chromosomen (Chromosomen mit zwei Zentromeren) sowie numerische Aberrationen (zusätzliche Chromosomen) gezählt und dokumentiert. Dabei galten als zusätzliche Chromosomen nur diejenigen, welche auch ein Zentromer, bzw. die Morphologie eines Zentromers aufwiesen. Zusätzliche azentrische Fragmente wurden nicht als numerische Aberrationen gezählt. Metaphasen mit einer Chromosomenzahl von 44 und 45 wurden nicht als aberrant gewertet, da fehlende Chromosomen präparationsbedingt vorkommen können. Schwierig war die Auswertung von sich überlagernden Chromosomen in der Zentromerregion. Im Zweifelsfall wurde hier jedem Chromosom ein Zentromer zugeordnet. Zusätzlich kam es aus technischen Gründen bei einigen Chromosomen zu einer fehlenden Hybridisierung der AHC-Sonde in der Zentromerregion. Falls in diesen Fällen im DAPI-Filter die Morphologie eines Zentromers zu erkennen war, wurde trotz fehlender Hybridisierung ein Zentromer für dieses Chromosom gezählt. Für jede Probe wurden folgende Parameter bestimmt:

- Anteil aberranter Metaphasen,
- durchschnittliche Anzahl von Aberrationen pro aberranter Metaphase,
- durchschnittliche Anzahl azentrischer Fragmente pro aberranter Metaphase,
- durchschnittliche Anzahl dizentrischer Chromosomen pro aberranter Metaphase und
- durchschnittliche Anzahl numerischer Aberrationen pro aberranter Metaphase

Aus der Gesamtzahl der Proben einer Untersuchungsgruppe wurde der Median aller oben genannten Parameter für die jeweilige Gruppe (Kontrollgruppe, gesunde Mutationsträgerinnen, erkrankte Mutationsträgerinnen) berechnet.

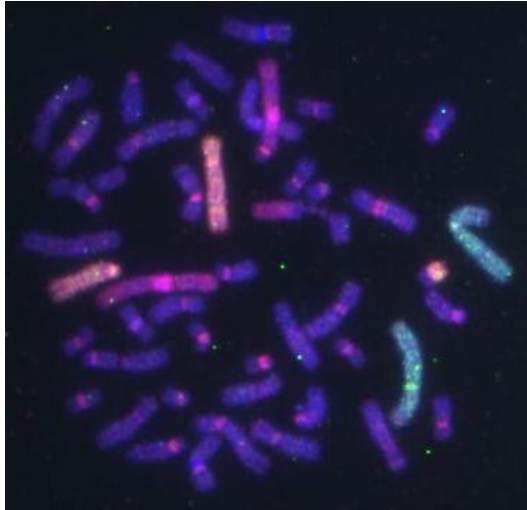


Abbildung 2: Fallnr. 20.4G Originalfoto WCP plus AHC-FISH. Rot1: Chromosom 1, Grün: Chromosom 2, Orange: Chromosom 4, Rot2: Zentromere

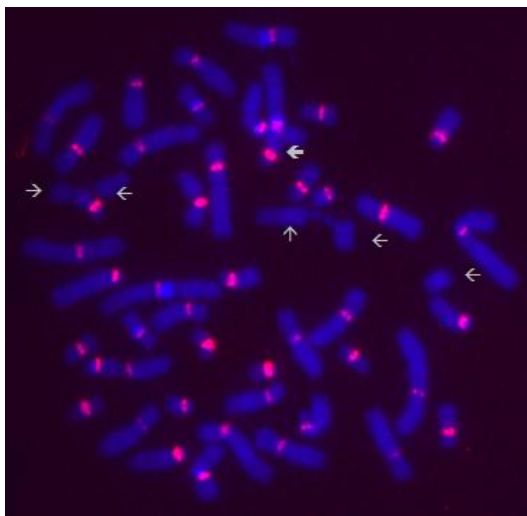


Abbildung 3: Fallnr. 20.G nach technischer Bearbeitung mit dem Programm ISIS: Durch Entfernen der übrigen Farben sind nur die Chromosomen und Zentromere sichtbar. Dünne Pfeile: azentrische Fragmente, dicker Pfeil: dizentrische Chromosomen

2.8.8. Statistische Auswertung

Die statistischen Analysen erfolgten unter Supervision von Dipl. Mathematiker O. Vollrath, Institut für Medizinische Informatik und Statistik, UKSH Campus Kiel, mit dem Softwareprogramm SPSS 15.0. Der Dosisvergleich zwischen den unbestrahlten und den mammographierten Proben sowie zwischen den unbestrahlten und den mit 4 Gy bestrahlten Proben wurde mit dem Wilcoxon-Rangtest geführt. Für den Vergleich der Ergebnisse zwischen der Kontrollgruppe und den gesunden *BRCA1*-Mutationsträgerinnen einerseits und der Kontrollgruppe und den erkrankten *BRCA1*-Mutationsträgerinnen andererseits sowie zwischen den gesunden und den erkrankten Mutationsträgerinnen wurde der Mann-Whitney-U-Test verwendet. Bei beiden statistischen Tests wurde eine Signifikanzniveau von 0,05 gewählt. Ein p-Wert kleiner als 0,05 galt damit als statistisch signifikant, ein p-Wert kleiner oder gleich 0,01 als sehr signifikant und ein p-Wert unter oder gleich 0,001 als hoch signifikant.

2.8.9. Grafische Darstellung

Als Form zur grafischen Darstellung wurden Box-Whisker-Plots gewählt. Sie wurden aus den erhobenen Daten mittels SPSS erstellt. Die Boxen selbst umfassen den Interquartilsabstand. Das untere Ende der Box entspricht dem ersten Quartil, das obere Ende dem dritten Quartil. Die dicke horizontale Linie in jeder Box markiert das zweite Quartil, welches dem Median entspricht. Die vertikalen Linien sind die sogenannten Whisker. Sie erstrecken sich bis zum jeweils größten und kleinsten Wert innerhalb des „inneren Zauns“ (Intervall zwischen 1. Quartil minus 1,5-fachem Interquartilsabstand und 3. Quartil plus 1,5-fachem Interquartilsabstand). Als „äußerer Zaun“ gilt das Intervall zwischen 1. Quartil minus 3-fachem Interquartilsabstand und 3. Quartil plus 3-fachem Interquartilsabstand. Bei den grauen Kreisen handelt es sich um möglicher Ausreißer. Sie liegen außerhalb des inneren, aber innerhalb des äußeren Zauns. Echte Ausreißer, also Datenpunkte außerhalb des äußeren Zauns werden durch graue Sterne markiert (Tukey, 1977).

3. Ergebnisse

Ziel dieser Arbeit war es der Frage nachzugehen, ob die Messung der Strahlensensibilität mittels AHC-FISH-Probe möglich ist, und ob mit der untersuchten Methode eine erhöhte Strahlensensibilität von *BRCA1*-Mutationsträgerinnen gegenüber Normalkontrollen festzustellen ist. Die Ergebnisse der Vergleiche sind im folgenden Abschnitt beschrieben.

3.1. *BRCA1*-Mutationsträgerinnen

3.1.1. Befunde bei gesunden *BRCA1*-Mutationsträgerinnen

Für die Auswertung der gesunden *BRCA1*-Mutationsträgerinnen wurden nach den unter 2.8.7 beschriebenen Auswahlkriterien Lymphozytenkulturen von zehn Frauen eingeschlossen, die nicht an einem Karzinom erkrankt waren. Eine mammographierte Kultur (5.M) wurde wegen zu geringer Metaphasenzahl ($n = 8$ Metaphasen) ausgeschlossen. Somit waren für die Auswertung zehn unbestrahlte, neun mammographierte und zehn mit 4 Gy bestrahlte Lymphozytenkulturen verfügbar.

Tabelle 6: Ergebnisse bei gesunden *BRCA1*-Mutationsträgerinnen für unbestrahlte Lymphozytenkulturen sowie für Lymphozytenkulturen nach Mammographie und nach Bestrahlung mit 4 Gy Kobalt 60.

Strahlendosis in Gy		% aberrante Metaphasen	Durchschnittliche Anzahl pro aberranter Metaphase			
			Aberrationen insgesamt	azentrische Fragmente	dizentrische Chromosomen	numerische Aberrationen
0 Gy (n=10)	Median	16,0	1,1	0,4	0,0	0,3 ^a
	1st Qu.:	11,0	1,0	0,0	0,0	0,2
	3rd Qu.:	20,0	1,3	1,0	0,5	0,6
Mammographie (n=9)	Median	24,0	1,3	0,5	0,5	0,3
	1st Qu.:	8,0	1,0	0,5	0,0	0,1
	3rd Qu.:	32,0	1,5	0,7	0,5	0,3
4 Gy (n=10)	Median	74,0	3,6	2,7	0,5	0,4
	1st Qu.:	63,0	3,2	2,6	0,3	0,1
	3rd Qu.:	88,0	4,1	3,0	0,8	0,7
p-Wert	0 Gy vs mammo	<i>0,602</i>	<i>0,766</i>	<i>0,375</i>	<i>0,6</i>	<i>0,469</i>
p-Wert	0 Gy vs 4 Gy	0,002	0,002	0,002	0,02	<i>0,973</i>

Gy: Gray, n: Anzahl der ausgewerteten Probanden, 0 Gy: unbestrahlt, mammo: nach 2-Schicht-Mammographie, p: p-Wert, 1st. Qu.: erstes Quartil, 3rd Qu.: drittes Quartil, kursiv: nicht signifikant; fett: signifikant

Für die gesunden *BRCA1*-Mutationsträgerinnen zeigte die Analyse der Chromosomenaberrationen mittels All-Human-Centromer-Sonde, dass der mediane Anteil

^a Da es sich jeweils um den Median in den einzelnen Gruppen handelt, ergibt die Summe der Mediane der einzelnen Aberrationen nicht zwangsläufig den Median der Gesamtzahl der Aberrationen.

aberranter Metaphasen nach der Mammographie um 8,0 % stieg. Auch die qualitative Auswertung ergab, dass die aberranten Metaphasen nach Mammographie im Median mehr Aberrationen aufwiesen als die aberranten Metaphasen in den unbestrahlten Lymphozytenkulturen. Diese Unterschiede zwischen den Lymphozytenkulturen nach 2-Schicht-Mammographie und den nicht bestrahlten Kulturen waren jedoch statistisch nicht signifikant (p-Werte siehe Tabelle 6).

Nach Bestrahlung mit 4 Gy Kobalt 60 ergab die Analyse der Chromosomenaberrationen mit der All-Human-Centromer-Sonde für die gesunden *BRCA1*-Mutationsträgerinnen einen signifikanten Anstieg des Anteils aberranter Metaphasen im Median von 16,0 % auf 74,0 % ($p = 0,002$). Auch die durchschnittliche Anzahl von Aberrationen pro aberranter Metaphase stieg im Median von 1,1 auf 3,6 signifikant an ($p = 0,008$). Im Gegensatz zur Mammographie stieg nach Bestrahlung mit 4 Gy Kobalt 60 nicht nur der Median der durchschnittlichen Anzahl azentrischer Fragmente in den aberranten Metaphasen signifikant von 0,4 auf 2,7 ($p = 0,002$), sondern auch die durchschnittliche Anzahl dizentrischer Chromosomen pro aberranter Metaphase stieg signifikant von 0,0 auf 0,5 an ($p = 0,04$). Auch die durchschnittliche Anzahl der numerischen Chromosomenaberrationen stieg im Median in den aberranten Metaphasen um 0,2 auf 0,4 leicht an, allerdings nicht signifikant. In den Abbildungen 2-4 sind die signifikanten Ergebnisse in Form von Box-Whisker-Plots graphisch dargestellt. Im Anhang (Tabelle 15 bis Tabelle 17) sind die Rohdaten, aus denen die Mittelwerte errechnet wurden, ausführlich aufgelistet.

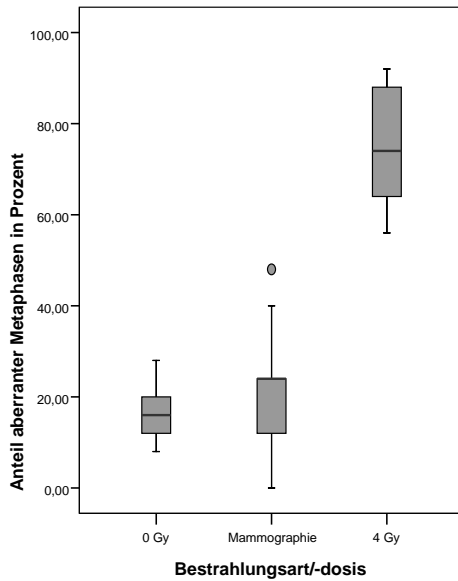


Abbildung 4: Anteil aberranter Metaphasen bei den gesunden *BRCA1*-Mutationsträgerinnen (Box-Whisker-Plots)
 - x-Achse: Bestrahlungsart/dosis, 0 Gy: unbestrahlt, Mammographie: ca. 0,005 Gy, 4 Gy: Bestrahlung mit 4 Gy Kobalt 60
 - y-Achse: Anteil aberranter Metaphasen
 - grauer Kreis: möglicher Ausreißer

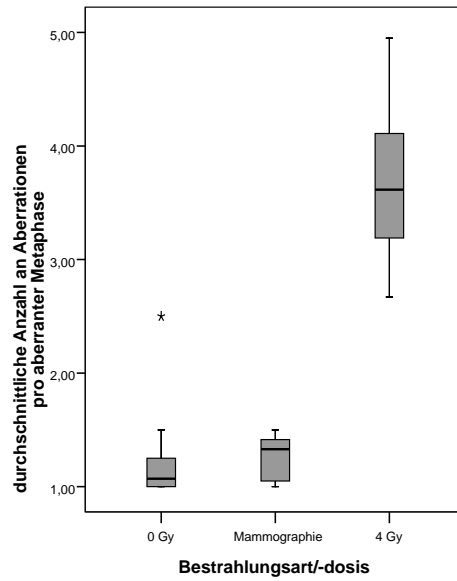


Abbildung 5: Durchschnittliche Anzahl von Aberrationen pro aberranter Metaphasen bei den gesunden *BRCA1*-Mutationsträgerinnen (Box-Whisker-Plots)
 - x-Achse: Bestrahlungsart/dosis, 0 Gy: unbestrahlt, Mammographie: ca. 0,005 Gy, 4 Gy: Bestrahlung mit 4 Gy Kobalt 60
 - y-Achse: durchschnittliche Anzahl Aberrationen pro aberranter Metaphase
 - grauer Stern: echter Ausreißer

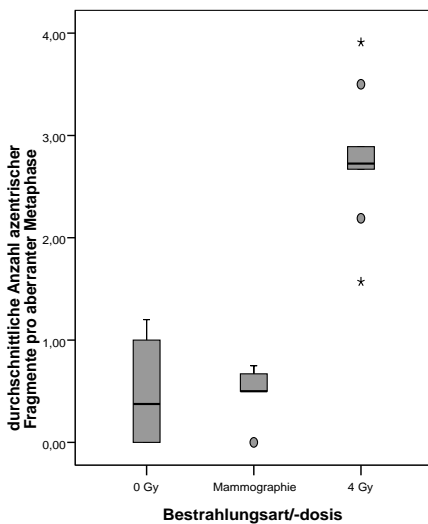


Abbildung 6: Durchschnittliche Anzahl von azentrischen Fragmenten pro aberranter Metaphasen bei den gesunden *BRCA1*-Mutationsträgerinnen (Box-Whisker-Plots)
 - x-Achse: Bestrahlungsart/dosis, 0 Gy: unbestrahlt, Mammographie: ca. 0,005 Gy, 4 Gy: Bestrahlung mit 4 Gy Kobalt 60
 - y-Achse: durchschnittliche Anzahl azentrischer Fragmente pro aberranter Metaphase
 - graue Kreise: mögliche Ausreißer
 - graue Sterne: echte Ausreißer

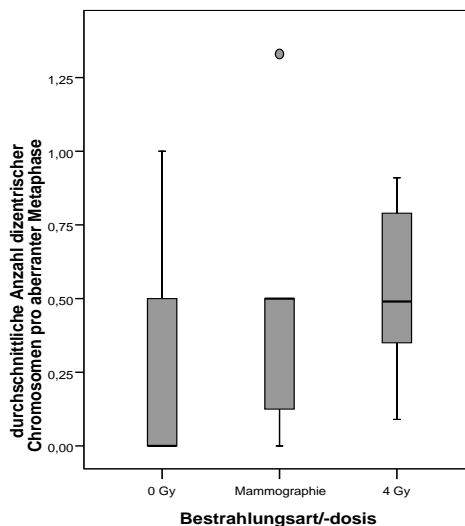


Abbildung 7: Durchschnittliche Anzahl dizentrischer Chromosomen pro aberranter Metaphasen bei den gesunden *BRCA1*-Mutationsträgerinnen (Box-Whisker-Plots)
 - x-Achse: Bestrahlungsart/dosis, 0 Gy: unbestrahlt, Mammographie: ca. 0,005 Gy, 4 Gy: Bestrahlung mit 4 Gy Kobalt 60;
 - y-Achse: durchschnittliche Anzahl dizentrischer Chromosomen pro aberranter Metaphase

3.1.2. Befunde bei erkrankten *BRCA1*-Mutationsträgerinnen

Für die Auswertung der an einem Mamma- und/oder Ovarialkarzinom erkrankten *BRCA1*-Mutationsträgerinnen wurden nach den unter 2.8.7 beschriebenen Auswahlkriterien Lymphozytenkulturen von elf Personen eingeschlossen. Zwei mit 4 Gy bestrahlte Lymphozytenkulturen (12.4G; 19.4G) wurden wegen zu geringer Metaphasenzahl (n = 23 bzw. n = 22 Metaphasen) ausgeschlossen. Somit waren für die Auswertung in dieser Gruppe elf unbestrahlte, elf mammographierte und neun mit 4 Gy bestrahlte Lymphozytenkulturen verfügbar.

Tabelle 7: Ergebnisse bei erkrankten *BRCA1*-Mutationsträgerinnen für unbestrahlte Lymphozytenkulturen sowie für Lymphozytenkulturen nach Mammographie und nach Bestrahlung mit 4 Gy Kobalt 60.

Strahlendosis in Gy		% aberrante Metaphasen	Durchschnittliche Anzahl pro aberranter Metaphase			
			Aberrationen insgesamt	azentrische Fragmente	dizentrische Chromosomen	numerische Aberrationen
0 Gy (n=11)	Median	12,0	1,0	0,3	0,1	0,5 ^b
	1st Qu.:	8,0	1,0	0,0	0,0	0,0
	3rd Qu.:	16,0	1,7	0,8	0,6	1,1
Mammographie (n=11)	Median	20,0	1,3	0,7	0,3	0,2
	1st Qu.:	12,0	1,0	0,5	0,2	0,0
	3rd Qu.:	32,0	1,3	1,0	0,5	0,3
4 Gy (n=9)	Median	76,0	4,1	3,3	0,6	0,1
	1st Qu.:	66,0	3,1	2,5	0,4	0,0
	3rd Qu.:	82,0	4,8	3,6	1,0	0,2
p-Wert	0 Gy vs mammo	0,016	<i>0,891</i>	<i>0,105</i>	<i>0,441</i>	<i>0,074</i>
p-Wert	0 Gy vs 4 Gy	0,004	0,008	0,008	<i>0,313</i>	0,016

Gy: Gray, n: Anzahl der ausgewerteten Probanden, 0 Gy: unbestrahlt, mammo: nach 2-Schicht-Mammographie, p: p-Wert, 1st. Qu.: erstes Quartil, 3rd Quartil: drittes Quartil, %: Prozent, kursiv: nicht signifikant; fett: signifikant

Bei den erkrankten *BRCA1*-Mutationsträgerinnen war der Anteil aberranter Metaphasen nach der Mammographie mittels All-Human-Centromer-Sonde signifikant höher als in den unbestrahlten Lymphozyten (20,0 % versus 16,0 %, p = 0,016). Bei der Analyse der aberranten Zellen zeigten sich zwar etwas mehr Aberrationen pro aberranter Metaphase nach 2-Schicht-Mammographie gegenüber den nicht bestrahlten Lymphozytenkulturen, jedoch waren die Unterschiede nicht signifikant (p-Werte und siehe Tabelle 7).

^b Da es sich jeweils um den Median in den einzelnen Gruppen handelt, ergibt die Summe der Mediane der einzelnen Aberrationen nicht zwangsläufig den Median der Gesamtzahl der Aberrationen.

Die Analyse der Chromosomenaberrationen mittels All-Human-Centromer-Sonde nach Bestrahlung mit 4 Gy Kobalt 60 zeigte ebenfalls einen signifikanten Anstieg des Anteils aberranter Metaphasen ($p = 0,004$). Der Median stieg von 12,0 % um 64,0 % auf 76,0 %. Auch der Median der durchschnittlichen Anzahl von Aberrationen in den aberranten Metaphasen stieg von 1,0 auf 4,1 an. Der Unterschied war signifikant ($p = 0,008$). Die Anzahl der verschiedenen Aberrationstypen änderte sich ähnlich wie nach Mammographie: Der Median der durchschnittlichen Anzahl azentrischer Fragmente stieg in den aberranten Metaphasen von 0,3 auf 3,3 ($p = 0,008$) und der Median der durchschnittlichen Anzahl dizentrischer Chromosomen von 0,1 auf 0,6 pro aberranter Metaphase. Allerdings war diese Differenz nicht signifikant. Interessant war, dass die durchschnittliche Anzahl numerischer Aberrationen in den aberranten Metaphasen im Median von 0,5 auf 0,1 signifikant sank ($p = 0,016$). Zur graphischen Darstellung der signifikanten Ergebnisse dienen die Abbildungen 6-9. Im Anhang (Tabelle 18 bis Tabelle 20) sind die Rohdaten, aus denen die Mittelwerte errechnet wurden, ausführlich dargestellt.

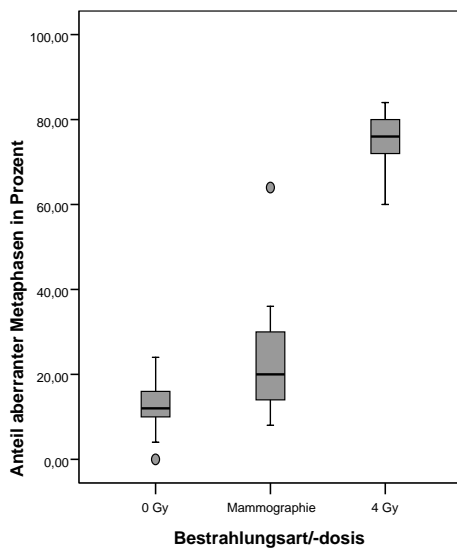


Abbildung 8: Anteil aberranter Metaphasen bei den erkrankten *BRCA1*-Mutationsträgerinnen (Box-Whisker-Plots)

- x-Achse: Bestrahlungsart/dosis, 0 Gy: unbestrahlt, Mammographie: ca. 0,005 Gy 4 Gy: Bestrahlung mit 4 Gy Kobalt 60;
- y-Achse: Anteil aberranter Metaphasen
- graue Kreise: mögliche Ausreißer

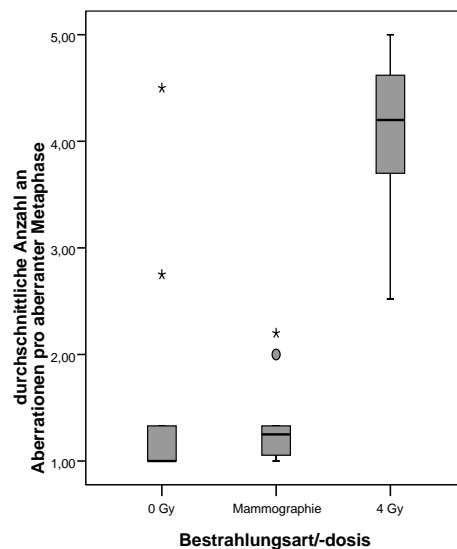


Abbildung 9: Durchschnittliche Anzahl von Aberrationen pro aberranter Metaphase bei den erkrankten *BRCA1*-Mutationsträgerinnen (Box-Whisker-Plots)

- x-Achse: Bestrahlungsart/dosis, 0 Gy: unbestrahlt, Mammographie: ca. 0,005 Gy, 4 Gy: Bestrahlung mit 4 Gy Kobalt 60,
- y-Achse: durchschnittliche Anzahl Aberrationen pro aberranter Metaphase
- grauer Kreis: möglicher Ausreißer
- graue Sterne: echte Ausreißer

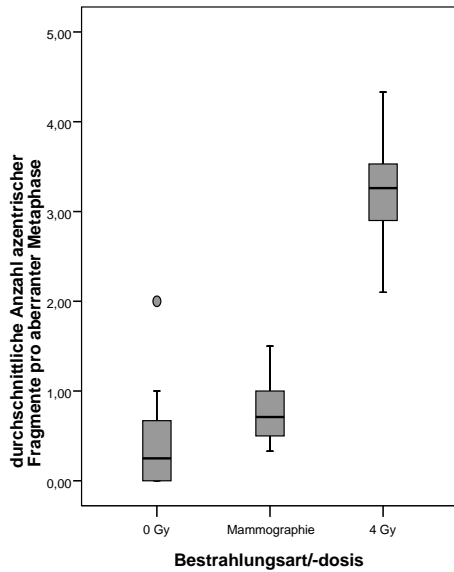


Abbildung 10: Durchschnittliche Anzahl von azentrischen Fragmenten pro aberranter Metaphasen bei den erkrankten *BRCA1*-Mutationsträgerinnen (Box-Whisker-Plots)
 - x-Achse: Bestrahlungsart/dosis, 0 Gy: unbestrahlt, Mammographie: ca. 0,005 Gy, 4 Gy: Bestrahlung mit 4 Gy Kobalt 60
 - y-Achse: durchschnittliche Anzahl azentrischer Fragmente pro aberranter Metaphase
 - grauer Kreis: mögliche Ausreißer

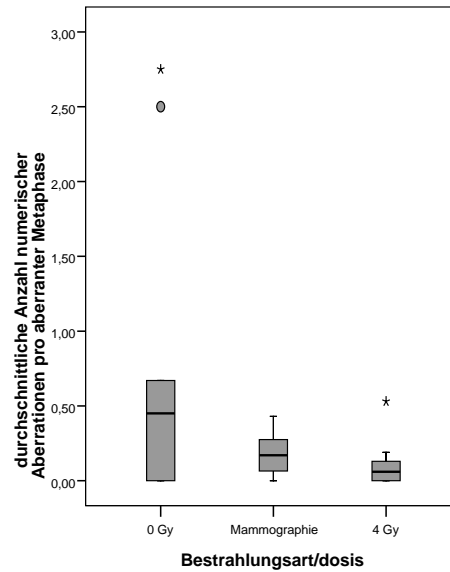


Abbildung 11: Durchschnittliche Anzahl numerischer Aberrationen pro aberranter Metaphasen bei den erkrankten *BRCA1*-Mutationsträgerinnen (Box-Whisker-Plots)
 - x-Achse: Bestrahlungsart/dosis, 0 Gy: unbestrahlt, Mammographie: ca. 0,005 Gy, 4 Gy: Bestrahlung mit 4 Gy Kobalt 60
 - y-Achse: durchschnittliche Anzahl numerischer Aberrationen pro aberranter Metaphase
 - graue Kreise: mögliche Ausreißer
 - grauer Stern: echter Ausreißer

3.2. Befunde in der Kontrollgruppe

In die Kontrollgruppe wurden nach den unter 2.8.7 beschriebenen Auswahlkriterien Lymphozytenkulturen von neun Personen eingeschlossen. Je eine unbestrahlte (22.U) und eine mit 4 Gy (22.4G) bestrahlte Lymphozytenkultur wurden wegen fehlender Metaphasen bzw. zu geringer Metaphasenzahl ($n < 23$ Metaphasen) ausgeschlossen. Somit waren für die Auswertung der Kontrollgruppe acht unbestrahlte Lymphozytenkulturen, acht mit 4 Gy bestrahlte Kulturen sowie neun mammographierte Lymphozytenkulturen verfügbar. Als Bezugswert für die Bewertung der Chromosomenaberrationen nach Mammographie bzw. nach Bestrahlung mit 4 Gy diente der Median der unbestrahlten Lymphozytenkultur.

Tabelle 8: Ergebnisse der Kontrollgruppe für unbestrahlte Lymphozytenkulturen sowie für Lymphozytenkulturen nach Mammographie und nach Bestrahlung mit 4 Gy Kobalt 60

Strahlendosis in Gy		% aberrante Metaphasen	Durchschnittliche Anzahl pro aberranter Metaphase			
			Aberrationen insgesamt	azentrische Fragmente	dizentrische Chromosomen	numerische Aberrationen
0 Gy (n=8)	Median	16,0	1,0	0,4	0,2	0,5 ^c
	1st Qu.:	9,0	1,0	0,1	0,0	0,3
	3rd Qu.:	29,0	1,1	0,7	0,3	0,8
Mammographie (n=9)	Median	16,0	1,1	0,6	0,2	0,4
	1st Qu.:	12,0	1,0	0,3	0,0	0,0
	3rd Qu.:	24,0	1,3	0,7	0,6	0,7
4 Gy (n=8)	Median	59,2	2,4	1,9	0,2	0,3
	1st Qu.:	49,0	1,8	1,4	0,1	0,2
	3rd Qu.:	63,5	3,5	2,6	0,4	0,6
p-Wert	0 Gy vs mammo	<i>0,686</i>	<i>0,094</i>	<i>0,359</i>	<i>0,625</i>	<i>0,922</i>
p-Wert	0 Gy vs 4 Gy	0,008	0,008	0,008	<i>0,742</i>	<i>0,203</i>

Gy: Gray, n: Anzahl der ausgewerteten Probanden, 0 Gy: unbestrahlt, mammo: nach 2-Schicht-Mammographie, p: p-Wert, 1st. Qu.: erstes Quartil, 3rd Quartil: drittes Quartil, %: Prozent, kursiv: nicht signifikant; fett: signifikant

Die Analyse der Chromosomenaberrationen mittels All-Human-Centromer-Sonde zeigte keinen signifikanten Anstieg der Chromosomenaberrationen durch die 2-Schicht-Mammographie gegenüber den nicht bestrahlten Lymphozytenkulturen (p-Werte siehe Tabelle 3.1).

Die Analyse der Chromosomenaberrationen mittels All-Human-Centromer-Sonde nach Bestrahlung mit 4 Gy Kobalt 60 zeigte hingegen einen signifikanten Anstieg des Anteils aberranter Metaphasen von 16,0 % auf 59,2 % ($p = 0,008$). Auch der Median der durchschnittlichen Anzahl von Aberrationen war in den aberranten Metaphasen von 1,0 auf 2,4 angestiegen. Die durchschnittliche Anzahl Aberrationen pro aberranter Metaphase war signifikant erhöht ($p = 0,008$). Der Median der durchschnittlichen Anzahl azentrischer Fragmente war in den aberranten Metaphasen signifikant von 0,4 auf 1,8 angestiegen ($p = 0,008$). Die übrigen Vergleiche ergaben keine statistisch signifikanten Unterschiede. Die signifikanten Ergebnisse der Kontrollgruppe sind in den Abbildungen 10-12 graphisch dargestellt. Die Rohdaten der Kontrollgruppe sind im Anhang ausführlich aufgelistet (Tabelle 12 bis Tabelle 14).

^c Da es sich jeweils um den Median in den einzelnen Gruppen handelt, ergibt die Summe der Mediane der einzelnen Aberrationen nicht zwangsläufig den Median der Gesamtzahl der Aberrationen.

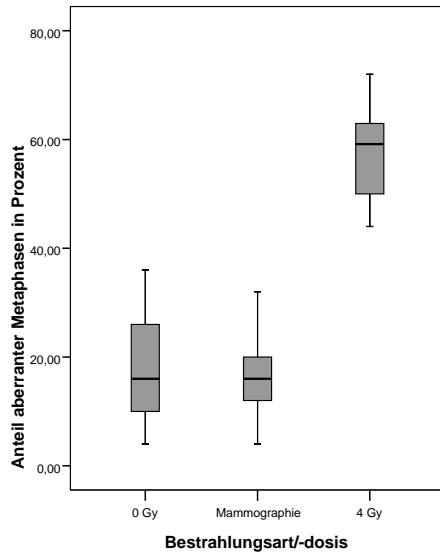


Abbildung 12: Anteil aberranter Metaphasen in der Kontrollgruppe (Box-Whisker-Plots)
 - x-Achse: Bestrahlungsart/dosis, 0 Gy: unbestrahlt, Mammographie: ca. 0,005 Gy, 4 Gy: Bestrahlung mit 4 Gy Kobalt 60
 - y-Achse: Anteil aberranter Metaphasen in %

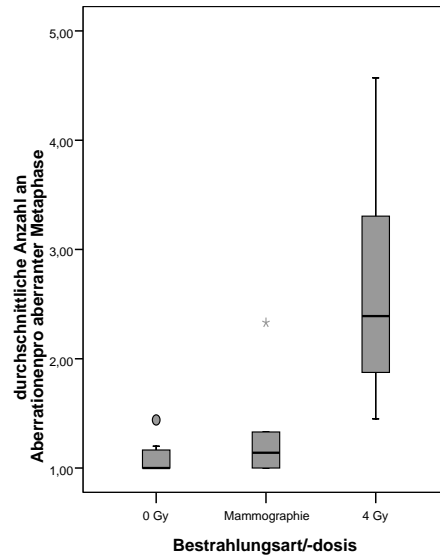


Abbildung 13: Durchschnittliche Anzahl von Aberrationen pro aberranter Metaphase in der Kontrollgruppe (Box-Whisker-Plots)
 - x-Achse: Bestrahlungsart/dosis, 0 Gy: unbestrahlt, Mammographie: ca. 0,005 Gy, 4 Gy: Bestrahlung mit 4 Gy Kobalt 60
 - y-Achse: durchschnittliche Anzahl Aberrationen pro aberranter Metaphase

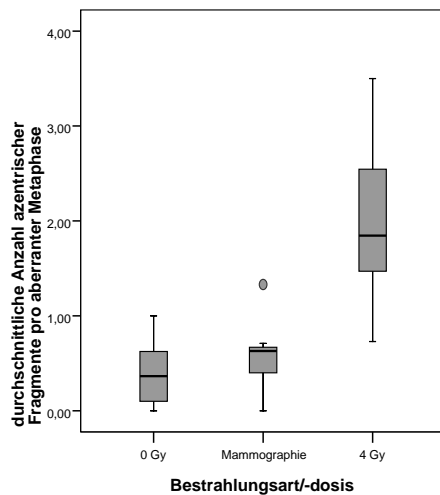


Abbildung 14: Durchschnittliche Anzahl von azentrischen Fragmenten pro aberranter Metaphase in der Kontrollgruppe (Box-Whisker-Plots)
 - x-Achse: Bestrahlungsart/dosis, 0 Gy: unbestrahlt, Mammographie: ca. 0,005 Gy; 4 Gy: Bestrahlung mit 4 Gy Kobalt 60;
 - y-Achse: durchschnittliche Anzahl azentrischer Fragmente pro aberranter Metaphase
 - grauer Kreis: möglicher Ausreißer

3.3. Vergleich der Ergebnisse in den Probandengruppen

Die Ergebnisse des All-Human-Centromer-Assays der verschiedenen Gruppen wurden wie folgt verglichen: Zunächst wurden die jeweils unbestrahlten Lymphozytenkulturen, die mammographierten und die mit 4 Gy bestrahlten Lymphozytenkulturen von gesunden *BRCA1*-Mutationsträgerinnen mit den jeweils gleich behandelten Lymphozytenkulturen der Kontrollgruppe verglichen. Analog dazu wurden die Ergebnisse zwischen den erkrankten *BRCA1*-Mutationsträgerinnen und der Kontrollgruppe verglichen. Abschließend erfolgte nach dem oben beschriebenen Vorgehen der Vergleich der Ergebnisse zwischen den gesunden und den erkrankten *BRCA1*-Mutationsträgerinnen.

3.3.1. Vergleich der Lymphozytenkulturen gesunder *BRCA1*-Mutationsträgerinnen mit der Kontrollgruppe

Im folgenden Abschnitt werden die Ergebnisse der gesunden *BRCA1*-Mutationsträgerinnen mit den Ergebnissen der Kontrollgruppe verglichen. Die Ergebnisse der einzelnen Gruppen finden sich in Tabelle 6 und Tabelle 8. Aus Gründen der Übersichtlichkeit sind in den folgenden Tabellen lediglich die Signifikanzen der Vergleiche gegeben.

Tabelle 9: Vergleich der Lymphozytenkulturen gesunder *BRCA1*-Mutationsträgerinnen mit Lymphozytenkulturen der Kontrollgruppe jeweils unbestrahlt, nach 2-Schicht-Mammographie und nach Bestrahlung mit 4 Gy Kobalt 60.

		Durchschnittliche Anzahl pro aberranter Metaphase				
Strahlungsart/-dosis		% aberranter Metaphasen	Aberrationen insgesamt	acentrische Fragmente	dizentrische Chromosomen	numerische Aberrationen
0 Gy	p-Wert	<i>0,884</i>	<i>0,461</i>	<i>0,776</i>	<i>0,824</i>	<i>0,394</i>
2-Schicht-Mammographie	p-Wert	<i>0,617</i>	<i>0,651</i>	<i>0,99</i>	<i>0,534</i>	<i>0,820</i>
4 Gy	p-Wert	0,011	0,027	0,028	0,017	<i>0,81</i>

Gy: Gray, n: Anzahl der ausgewerteten Probanden, 0 Gy: unbestrahlt, p: p-Wert, 1st. Qu.: erstes Quartil, 3rd Quartil: drittes Quartil, %: Prozent, kursiv: nicht signifikant; fett: signifikant

Für alle Analyseparameter waren die Unterschiede zwischen den unbestrahlten Lymphozytenkulturen der gesunden *BRCA1*-Mutationsträgerinnen und den Kontrollen nicht signifikant. Auch zwischen den mammographierten Lymphozytenkulturen der gesunden *BRCA1*-Mutationsträgerinnen und der Kontrollen zeigten sich keine statistisch signifikanten Differenzen.

Die Analyse nach Bestrahlung mit 4 Gy ergab jedoch, dass der mediane Anteil der aberranten Metaphasen in den Lymphozytenkulturen der gesunden *BRCA1*-Mutationsträgerinnen um

14,8 % höher war als in den Lymphozytenkulturen der Kontrollen (59,2%). Hier zeigte sich ein statistisch signifikanter Unterschied ($p = 0,011$). Auch der Median der durchschnittlichen Anzahl der Aberrationen in den aberranten Metaphasen war bei den gesunden *BRCA1*-Mutationsträgerinnen nach Bestrahlung mit 4 Gy mit 3,6 signifikant höher als in der Kontrollgruppe mit 2,4 ($p = 0,027$). Der Median der mittleren Anzahl der azentrischen Fragmente betrug in den Lymphozytenkulturen der gesunden *BRCA1*-Mutationsträgerinnen 2,7 pro aberranter Metaphase und war damit signifikant höher als in den Lymphozytenkulturen der Kontrollen (1,9) ($p = 0,028$). Auch die mittlere Anzahl der dizentrischen Chromosomen pro aberranter Metaphase war in den Lymphozytenkulturen der gesunden *BRCA1*-Mutationsträgerinnen im Median um 0,3 und damit signifikant höher als in denen der Kontrollen (0,5 versus 0,2) ($p = 0,017$). Die Differenz der numerischen Aberrationen pro aberranter Metaphase war nicht signifikant.

Somit zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen den gesunden *BRCA1*-Mutationsträgerinnen und den Kontrollen nur nach Bestrahlung mit 4 Gy. Diese weisen auf ein Zeichen der erhöhten Strahlensensibilität bei *BRCA1*-Mutationsträgerinnen hin.

3.3.2. Vergleich der Lymphozytenkulturen erkrankter *BRCA1*-Mutationsträgerinnen mit der Kontrollgruppe

Im folgenden Abschnitt werden die Ergebnisse der erkrankten *BRCA1*-Mutationsträgerinnen mit den Ergebnissen der Kontrollgruppe verglichen. Die Ergebnisse der einzelnen Gruppen finden sich in Tabelle 7 und Tabelle 8. Aus Gründen der Übersichtlichkeit sind in den folgenden Tabellen lediglich die Signifikanzen der Vergleiche gegeben.

Tabelle 10: Vergleich der Lymphozytenkulturen erkrankter *BRCA1*-Mutationsträgerinnen mit Lymphozytenkulturen der Kontrollgruppe jeweils unbestrahlt, nach 2-Schicht-Mammographie und nach Bestrahlung mit 4 Gy Kobalt 60.

		Durchschnittliche Anzahl pro aberranter Metaphase				
Strahlungsart/-dosis		% aberranter Metaphasen	Aberrationen insgesamt	azentrische Fragmente	dizentrische Chromosomen	numerische Aberrationen
0 Gy	p-Wert	0,375	1	0,781	1	0,911
nach 2-Schicht-Mammographie	p-Wert	0,248	0,66	0,221	0,398	0,315
4 Gy	p-Wert	0,004	0,02	0,011	0,001	0,016

Gy: Gray, n: Anzahl der ausgewerteten Probanden, 0 Gy: unbestrahlt, p: p-Wert, 1st. Qu.: erstes Quartil, 3rd Quartil: drittes Quartil, %: Prozent, kursiv: nicht signifikant; fett: signifikant

Auch in diesem Vergleich waren die Unterschiede zwischen den unbestrahlten Lymphozytenkulturen der erkrankten Mutationsträgerinnen und den unbestrahlten

Lymphozytenkulturen der Kontrollgruppe ebenso wenig signifikant, wie die Differenzen zwischen den mammographierten Lymphozytenkulturen der erkrankten *BRCA1*-Mutationsträgerinnen und der der Kontrollen.

Nach Bestrahlung der Lymphozytenkulturen mit 4 Gy Kobalt 60 betrug der mediane Anteil aberranter Metaphasen bei den erkrankten *BRCA1*-Mutationsträgerinnen 76,0 % und war damit statistisch signifikant höher als in den Kulturen der Kontrollgruppe (59,2 %; $p=0,004$). Auch die mittlere Anzahl der Aberrationen pro aberranter Metaphase war in den Lymphozytenkulturen der erkrankten *BRCA1*-Mutationsträgerinnen (4,1) im Median höher als in den Lymphozytenkulturen der Kontrollen (2,4). Der Unterschied war statistisch signifikant ($p=0,02$). Dabei war sowohl der Median der mittleren Anzahl der azentrischen Fragemente pro aberranter Metaphase (3,3 versus 1,9; $p=0,011$) als auch der Median der mittleren Anzahl der dizentrischen Chromosomen pro aberranter Metaphase (0,6 versus 0,2; $p=0,001$) in den Lymphozytenkulturen der erkrankten *BRCA1*-Mutationsträgerinnen stärker angestiegen als bei den Kontrollen. Dagegen war interessanterweise der Median der mittleren Anzahl der numerischen Aberrationen in den Lymphozytenkulturen der erkrankten *BRCA1*-Mutationsträgerinnen mit 0,1 pro aberranter Metaphase um 0,2 niedriger als der Median der mittleren Anzahl der numerischen Aberrationen in den Lymphozytenkulturen der Kontrollen (0,3), der Unterschied war signifikant ($p = 0,016$).

Auch hier zeigten sich erst nach Bestrahlung mit 4 Gy Kobalt 60 signifikante Unterschiede zwischen den erkrankten *BRCA1*-Mutationsträgerinnen und der Kontrollgruppe. Dies weist auf eine reduzierte Reparaturkapazität bei *BRCA1*-Mutationsträgerinnen hin.

3.3.3. Vergleich der Lymphozytenkulturen gesunder *BRCA1*-Mutationsträgerinnen mit den Lymphozytenkulturen erkrankter *BRCA1*-Mutationsträgerinnen

Im folgenden Abschnitt werden die Ergebnisse der gesunden und erkrankten *BRCA1*-Mutationsträgerinnen miteinander verglichen. Die Ergebnisse der einzelnen Gruppen finden sich in Tabelle 6 und Tabelle 7. Aus Gründen der Übersichtlichkeit sind in der folgenden Tabellen lediglich die Signifikanzen der Vergleiche gegeben.

Tabelle 11: Vergleich der Lymphozytenkulturen gesunder *BRCA1*-Mutationsträgerinnen mit den Lymphozytenkulturen erkrankter *BRCA1*-Mutationsträgerinnen jeweils unbestrahlt, nach 2-Schicht-Mammographie und nach Bestrahlung mit 4 Gy Kobalt 60.

		Durchschnittliche Anzahl pro aberranter Metaphase				
Strahlungsart/-dosis		% aberranter Metaphasen	Aberrationen insgesamt	azentrische Fragmente	dizentrische Chromosomen	numerische Aberrationen
0 Gy	p-Wert	0,236	0,703	0,692	0,740	0,489
nach 2-Schicht-Mammographie	p-Wert	0,75	0,919	0,197	1	0,553
4 Gy	p-Wert	0,916	0,286	0,182	0,182	0,003

Gy: Gray, n: Anzahl der ausgewerteten Probanden, 0 Gy: unbestrahlt, p: p-Wert, 1st. Qu.: erstes Quartil, 3rd Quartil: drittes Quartil, %: Prozent, kursiv: nicht signifikant; fett: signifikant

Tabelle 11 stellt dar, dass sich sowohl bei dem Vergleich zwischen den unbestrahlten Lymphozytenkulturen der gesunden und der erkrankten Mutationsträgerinnen als auch bei dem Vergleich der mammographierten Lymphozytenkulturen zwischen beiden Gruppen kein signifikanter Unterschied zeigen ließ. Bei dem Vergleich zwischen den mit 4 Gy bestrahlten Lymphozytenkulturen war der Median der mittleren Anzahl der numerischen Aberrationen pro aberranter Metaphase der gesunden *BRCA1*-Mutationsträgerinnen höher als bei den Erkrankten (0,4 versus 0,1). Diese Differenz war die einzige statistisch signifikante zwischen den gesunden und erkrankten *BRCA1*-Mutationsträgerinnen ($p = 0,003$).

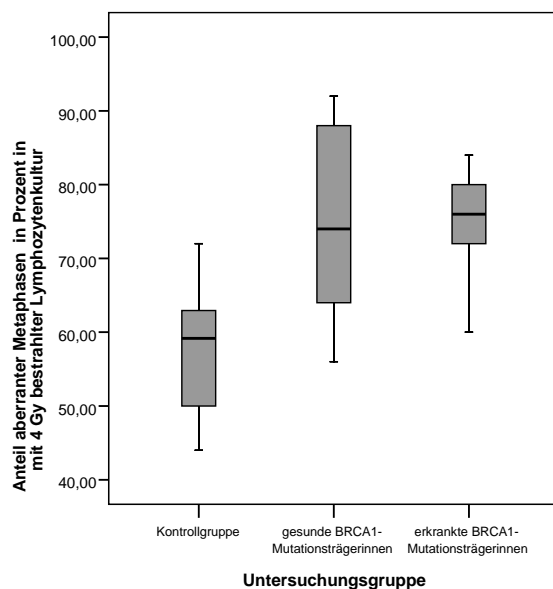


Abbildung 15 Anteil aberranter Metaphasen in Prozent in den mit 4 Gy bestrahlten Lymphozytenkulturen (Box-Whisker-Plots)
 - x-Achse: Untersuchungsgruppe
 - y-Achse: Anteil aberranter Metaphasen in Prozent

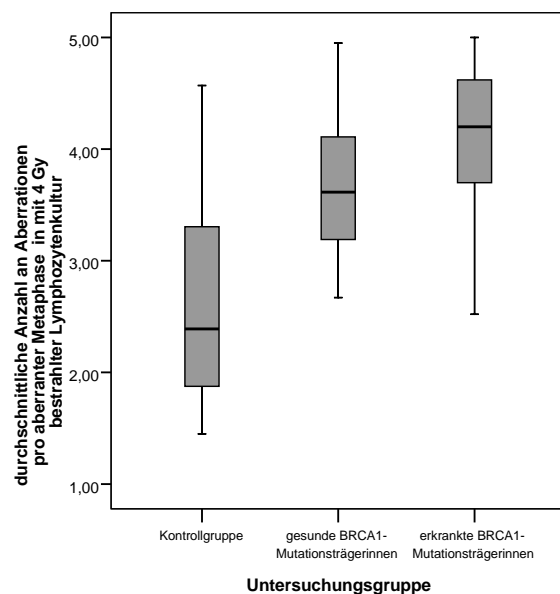


Abbildung 16: Durchschnittliche Anzahl von Aberrationen pro aberranter Metaphase in den mit 4 Gy bestrahlten Lymphozytenkulturen (Box-Whisker-Plots)
 - x-Achse: Untersuchungsgruppe
 - y-Achse: durchschnittliche Anzahl Aberrationen pro aberranter Metaphase

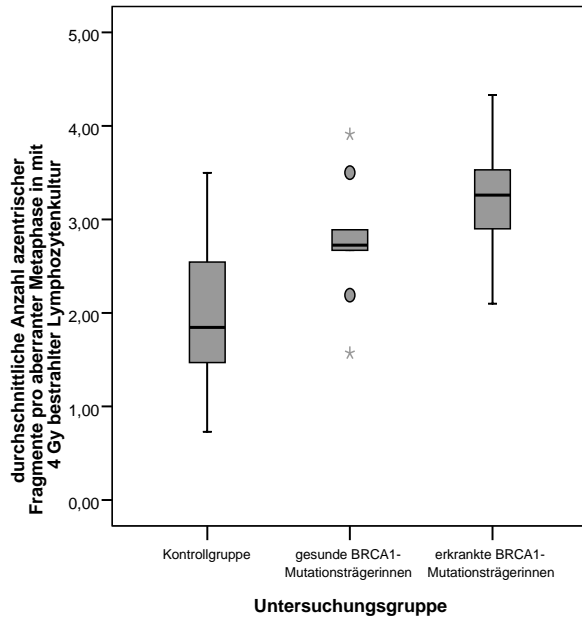


Abbildung 17: Durchschnittliche Anzahl von azentrischen Fragmenten pro aberranter Metaphase in den mit 4 Gy bestrahlten Lymphozytenkulturen (Box-Whisker-Plots)
 - x-Achse: Untersuchungsgruppe
 - y-Achse: durchschnittliche Anzahl azentrischer Fragmente pro aberranter Metaphase
 - graue Kreise: mögliche Ausreißer
 - graue Sterne: echte Ausreißer

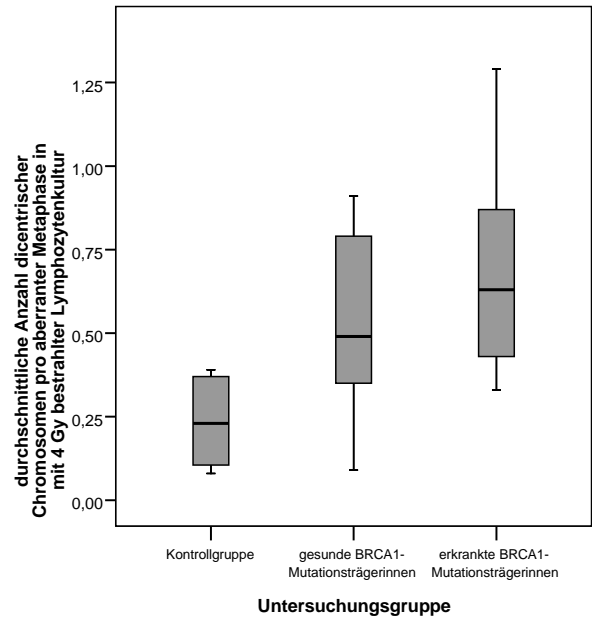


Abbildung 18: Durchschnittliche Anzahl von dizentrischen Chromosomen pro aberranter Metaphase in den mit 4 Gy bestrahlten Lymphozytenkulturen (Box-Whisker-Plots)
 - x-Achse: Untersuchungsgruppe
 - y-Achse: durchschnittliche Anzahl dizentrischer Chromosomen pro aberranter Metaphase

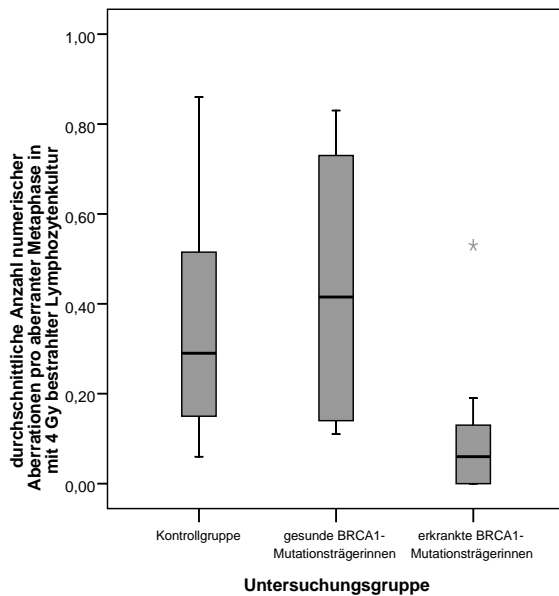


Abbildung 19: Durchschnittliche Anzahl von numerischen Aberrationen pro aberranter Metaphase in den mit 4 Gy bestrahlten Lymphozytenkulturen (Box-Whisker-Plots)
 - x-Achse: Untersuchungsgruppe
 - y-Achse: durchschnittliche Anzahl numerischer Aberrationen pro aberranter Metaphase
 - grauer Stern: echter Ausreißer

4. Diskussion

Im vorangegangenen Abschnitt sind die Ergebnisse der Analysen ausführlich dargestellt. Die Vergleiche innerhalb der Probandengruppen zeigten zum größten Teil nur signifikante Unterschiede zwischen den unbestrahlten und den mit 4 Gy bestrahlten Lymphozytenkulturen. Ein signifikanter Unterschied zwischen den mammographierten und den unbestrahlten Kulturen ergab sich nur bei den erkrankten *BRCA1*-Mutationsträgerinnen. Die höhere Zahl an Aberrationen pro aberranter Metaphase beruhte hauptsächlich auf der erhöhten Anzahl der azentrischen Fragmente. Auch im Vergleich zwischen der Kontrollgruppe und den *BRCA1*-Mutationsträgerinnen waren erst nach Bestrahlung mit 4 Gy signifikant mehr Aberrationen pro aberranter Metaphase und ein höherer Anteil aberranter Metaphasen bei den *BRCA1*-Mutationsträgerinn zu sehen. Dies war sowohl durch die erhöhte Anzahl an azentrischen Fragmenten als auch dizentrischen Chromosomen bedingt. Zusätzlich zeigten sich nach Mammographie bei den erkrankten *BRCA1*-Mutationsträgerinnen signifikant mehr aberrante Metaphasen als bei den Kontrollen.

4.1. Methodenkritik

Die Blutproben der Probandinnen wurden im Rahmen der Tumorrisikosprechstunde im UKSH, Campus Kiel gewonnen. Es wurden ausschließlich weibliche Probandinnen mit einer als gesichert pathogen geltenden *BRCA1*-Mutation aufgenommen. Insgesamt konnten 21 *BRCA1*-Mutationsträgerinnen (10 gesunde, 11 erkrankte) sowie 9 Kontrollen rekrutiert werden. Im Rahmen der Auswertung mussten aufgrund von mangelnden Metaphasezahlen, fehlender Lyse des Zytoplasmas oder mangelnder Qualität der Metaphasen (Überlagerungen durch schlechte Spreitung der Chromosomen, zu große Schädigung der Chromosomenstruktur nach Bestrahlung u.a.) einige Proben nachträglich aus der Auswertung genommen werden. Dadurch wurde die ohnehin schon geringe Probandenzahl weiter reduziert. Allerdings wurden pro untersuchtem Probanden insgesamt mindestens 75 Metaphasen ausgezählt, insgesamt somit weit mehr als 2.200 Metaphasen ausgewertet. Des Weiteren waren die Ergebnisse innerhalb der jeweiligen Gruppe heterogen. Um bei dieser kleinen Probenanzahl den Einfluss der Ausreißer möglichst gering zu halten, wurde als Vergleichsmaß der Ergebnisse zwischen den Gruppen jeweils der Median für alle Parameter anstelle des Mittelwertes sowie die Quartile anstatt der Standardabweichung zur Darstellung der Verteilung gewählt.

Ein weiterer Kritikpunkt an der Durchführung des Experiments ist die fehlende Verblindung. Um diesen Einfluss auszugleichen, wurden die Proben von mindestens drei verschiedenen unabhängigen Untersuchern ausgewertet. Diskrepante Ergebnisse wurden zusätzlich von einer erfahrenen Zytogenetikerin bewertet. Diskrepante Ergebnisse lagen nur in 1 % der ausgewerteten Metaphasen vor. Auch bei der Verwendung der AHC-Sonde gab es gelegentlich technische Schwierigkeiten: Die Signale für einige Chromosomen konnten teilweise nur digital sichtbar gemacht werden, obwohl morphologisch ein Zentromer deutlich sichtbar war. Auch bei Chromosomen, die sich in der Zentromerregion überlagerten war es nicht immer eindeutig möglich, zwei Zentromere zu differenzieren. Diese Fälle wurden vereinbarungsgemäß einheitlich nicht als Aberration gewertet. Es gibt allerdings keinen Hinweis auf eine ungleichmäßige Verteilung dieser nicht eindeutigen Fälle zwischen den Probanden und Probandengruppen. Ein weiteres Problem stellt die Übertragung der experimentellen Ergebnisse auf die reale Situation der Probandinnen dar: Unterschiedliche Strahlensensibilitäten können zwar anhand der quantitativen Auswertung verschiedener Aberrationen dargestellt werden, Rückschlüsse auf die Folgen der Bestrahlung auf die Zellen *in vivo* und den Gesamtorganismus können daraus jedoch nur mit allergrößter Vorsicht gezogen werden. Positiv zu erwähnen ist, dass insbesondere azentrische Fragmente induziert wurden, die infolge von nicht reparierten DNA-Doppelstrangbrüchen entstehen. Da in der vorliegenden Arbeit die Strahlensensibilität von Frauen untersucht wurde, die aufgrund einer *BRCA1*-Mutation vermutlich über eine eingeschränkte Reparaturkapazität für DNA-Doppelstrangbrüche verfügen, erscheint dadurch sowohl das gewählte Bestrahlungsschema als auch die Auswertung mittels AHC-FISH für die Beantwortung der Fragestellung trotz der o.g. Einschränkungen prinzipiell geeignet.

4.2. Biologische Bedeutung der erhobenen Befunde

4.2.1. Ergebnisse der Kontrollgruppe

Beim Vergleich der unbestrahlten Lymphozytenkulturen mit den mammographierten Lymphozytenkulturen war bereits in der Kontrollgruppe zu erkennen, dass mittels AHC-FISH weder ein signifikant erhöhter Anteil an aberranten Metaphasen noch eine höhere Anzahl an Aberrationen auftritt. Ein ähnliches Bild ergab sich auch bei der Auswertung der einzelnen Aberrationstypen. Die Anzahl der dizentrischen Chromosomen blieb gleich, während die Zahl der numerischen Aberrationen sogar sank. Lediglich die Anzahl der azentrischen Fragmente stieg nach Mammographie geringfügig an. Somit scheinen sich chromosomale

Veränderungen in Folge der Mammographie nur sehr geringfügig und im Rahmen der statistischen Streuung zu ereignen. Auch ist es denkbar, dass gesunde Zellen i.d.R. in der Lage, die durch eine Mammographie möglicherweise hervor gerufene DNA-Schäden zu reparieren. Berücksichtigt man die geringe Strahlendosis, die bei einer Zwei-Schicht-Mammographie verwendet wird, so überraschen die marginalen bzw. nicht vorhandenen Unterschiede zwischen unbestrahlten und mammographierten Lymphozytenkulturen zunächst nicht. Bereits die Vorversuche hatten gezeigt, dass bei einer Bestrahlung mit 2 Gy Kobalt 60 die damit provozierten Chromosomenaberrationen für eine quantitative Auswertung zu wenige waren, um mittels FISH mit einer AHC-Probe ausreichend Chromosomenaberrationen für eine Auswertung zu induzieren. Trotzdem wurden die Untersuchungen nach Mammographie durchgeführt, da insbesondere bei Frauen mit einem erhöhten Brustkrebsrisiko eine große Verunsicherung hinsichtlich möglicher Nebenwirkungen der Mammographie bestehen könnte, da ihnen aufgrund der nachgewiesenen erblichen Disposition für ein Mammakarzinom über einen Zeitraum von insgesamt ca. 30 Jahren alle zwei Jahre eine Mammographie empfohlen wird (Bick, 2015). Und auch bezüglich der Empfehlungen für Frauen aus der Normalbevölkerung gibt es kritische Meinungen zu einer regelmäßigen Strahlenbelastung in Form von Mammographie (Berrington de Gonzalez and Reeves, 2005).

Beim Vergleich der unbestrahlten Lymphozytenkulturen mit den Lymphozytenkulturen nach Bestrahlung mit 4 Gy Kobalt 60 ergab sich hingegen schon bei den Kontrollen ein deutlich anderes Bild: Der Anteil der aberranten Metaphasen stieg nach Bestrahlung um mehr als das Dreifache an. Auch die Anzahl der Aberrationen pro aberranter Metaphase erhöhte sich signifikant (p-Wert: 0,008). Dieser Unterschied war alleine durch den Anstieg der Anzahl der azentrischen Fragmente bedingt, denn die Anzahl der dizentrischen Chromosomen blieb gleich und die Anzahl der numerischen Aberrationen sank sogar geringfügig. Dies kann als Hinweis darauf gewertet werden, dass durch die verwendete Versuchsanordnung bevorzugt solche DNA-Schäden dargestellt wurden, die durch nicht reparierte DNA-Doppelstrangbrüche entstanden. Im Gegensatz dazu wurden Schäden aufgrund fehlerhafter Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen, wie z.B. dizentrische Chromosomen oder Aneuploidien infolge von Fehlern im Spindelapparat durch die verwendete Methode weniger gut dargestellt, bzw. entstanden seltener durch Bestrahlung.

4.2.2. Ergebnisse bei den gesunden *BRCA1*-Mutationsträgerinnen

Bei der Auswertung der Ergebnisse der gesunden *BRCA1*-Mutationsträgerinnen zeigten sich Ergebnisse analog zu denen in der Kontrollgruppe: Zwischen den unbestrahlten und den mammographierten Proben ließ sich keine signifikante Differenz darstellen. Die fehlenden Unterschiede hier lassen darauf schließen, dass die Auswirkungen einer einzelnen Mammographie für *BRCA1*-Mutationsträgerinnen nicht stärker sind als für Frauen der Normalbevölkerung. Im Gegensatz dazu haben Colin et al. mit Hilfe des γ H2AX-Assays gezeigt, dass durch eine Mammographie und besonders durch eine Dosiswiederholung (2 + 2 mGy) signifikant mehr Doppelstrangbrüche bei Brustdrüsenzellen von Hochrisikopatienten im Gegensatz zu Probanden mit niedrigerem Risiko entstehen (Colin et al., 2011).

Auch bei den gesunden *BRCA1*-Mutationsträgerinnen zeigten sich nach Bestrahlung mit 4 Gy Kobalt 60 signifikante Unterschiede hinsichtlich nicht reparierter Strahlenschäden: Sowohl der Anteil aberranter Metaphasen als auch die Anzahl der azentrischen Fragmente und der dizentrischen Chromosomen pro aberranter Metaphase stieg signifikant an ($p = 0,002$ bzw. $p = 0,02$). Hingegen änderte sich die Anzahl der numerischen Aberrationen nicht signifikant. Der höhere Anteil aberranter Metaphasen und die höhere Anzahl der Aberrationen pro aberranter Metaphase waren auch in dieser Untersuchungsgruppe überwiegend durch den Anstieg der azentrischen Fragmente und weniger durch den Anstieg dizentrischer Chromosomen bedingt. Dies lässt vermuten, dass die numerischen Aberrationen nicht im Zusammenhang zur Strahlenbelastung zu sehen sind, da sich dieser Wert weder bei den Mutationsträgerinnen noch bei den Kontrollen signifikant verändert hatte. Hingegen scheint der Anstieg der azentrischen Fragmente durch die Bestrahlung verursacht zu sein. Der stärkere Anstieg bei den gesunden *BRCA1*-Mutationsträgerinnen gegenüber den Kontrollen lässt vermuten, dass eine verminderte DNA-Reparaturkapazität ursächlich ist (Ernestos et al., 2010).

4.2.3. Ergebnisse bei den erkrankten *BRCA1*-Mutationsträgerinnen

Die erkrankten *BRCA1*-Mutationsträgerinnen wiesen nach Mammographie einen signifikant erhöhten Anteil aberranter Metaphasen auf, der bei den gesunden *BRCA1*-Mutationsträgerinnen und in der Kontrollgruppe nicht signifikant erhöht war. Dies könnte auf eine zusätzlich verminderte Fähigkeit zur Reparatur von strahleninduzierter DNA-Schäden durch die bereits durchgeführte Therapie (aufgetretene Erkrankung) zurückzuführen sein.

Möglich ist aber auch ein zufällig signifikant erhöhter Wert aufgrund von Schwankungen im Rahmen der kleinen Stichprobe. Dafür spricht, dass das Ausmaß der Schädigung der Zellen gemessen in Form der durchschnittlichen Anzahl der Aberrationen pro aberranter Metaphase nach Mammographie bei den erkrankten *BRCA1*-Mutationsträgerinnen wie auch bei den gesunden *BRCA1*-Mutationsträgerinnen und in der Kontrollgruppe keinen Anstieg zeigte. Dies würde bedeuten, dass die Therapie keinen wesentlichen Einfluss auf die Fähigkeit zur Reparatur von Strahlenschäden hat. Nach Bestrahlung mit 4 Gy zeigten auch die Lymphozytenkulturen der erkrankten *BRCA1*-Mutationsträgerinnen gegenüber den unbestrahlten Kulturen einen signifikant höheren Anteil an aberranten Metaphasen. Auch das Ausmaß der Schädigung der Zellen war höher: Insbesondere die Anzahl der azentrischen Fragmente stieg wie bei den gesunden *BRCA1*-Mutationsträgerinnen signifikant an ($p = 0,008$). Es zeigte sich außerdem ein deutlicher, aber nicht signifikanter Anstieg des Medians der mittleren Anzahl der dizentrischen Chromosomen. Die Anzahl numerischer Aberrationen war nach Bestrahlung mit 4 Gy Kobalt 60 niedriger als in den unbestrahlten Lymphozytenkulturen. Dies zeigt erneut, dass es eher keinen Zusammenhang zwischen der Bestrahlung und der Anzahl numerischer Aberrationen gibt.

Sowohl für die Kontrollgruppe als auch für die gesunden und die erkrankten *BRCA1*-Mutationsträgerinnen zeigte sich, dass besonders die mittlere Anzahl der azentrischen Fragmente und etwas weniger die Anzahl der dizentrischen Chromosomen nach Bestrahlung mit 4 Gy anstieg. Das zeigt, dass 4 Gy Kobalt 60 mehr DNA-Brüche erzeugte als Lymphozyten gesunder Probanden und *BRCA1*-Mutationsträgerinnen reparieren konnten. Damit ist die experimentelle Anordnung und die Auswertung der azentrischen Fragmente insbesondere geeignet um die individuelle Strahlensensibilität zu messen. Die Ergebnisse der Auswertung der mittleren Anzahl numerischer Aberrationen sprechen dafür, dass sie weniger als die azentrischen Fragmente oder gar nicht im Zusammenhang mit der *BRCA1*-vermittelten DNA-Reparatur zu bringen sind.

4.2.4. Vergleich der Ergebnisse bei den Kontrollen mit denen bei den gesunden *BRCA1*-Mutationsträgerinnen

Im Vergleich der Lymphozytenkulturen der Kontrollgruppe mit den gesunden *BRCA1*-Mutationsträgerinnen ergaben sich sowohl zwischen den unbestrahlten als auch zwischen den mammographierten Lymphozytenkulturen keine großen Unterschiede. Unsere Ergebnisse lassen vermuten, dass durch eine einmalige Strahlenbelastung von 0,005 Gy auch bei den

gesunden *BRCA1*-Mutationsträgerinnen keine relevanten Strahlenschäden zusätzlich entstehen.

Nach Bestrahlung mit 4 Gy war hingegen der Anteil der geschädigten Lymphozyten und auch das Ausmaß der Schädigung der aberranten Metaphasen in den Lymphozytenkulturen der *BRCA1*-Mutationsträgerinnen deutlich höher als in der Kontrollgruppe. Die signifikanten Unterschiede könnten mit aller Vorsicht als Anzeichen einer erhöhten Strahlensensibilität der *BRCA1*-Mutationsträgerinnen gedeutet werden, da der Anstieg genau die Arten von Chromosomenaberrationen betrifft, die durch unreparierte DNA-Doppelstrangbrüche entstehen, nämlich azentrische Fragmente (Foray et al., 1997, Herrmann et al., 2006). Da das *BRCA1*-Protein an der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen beteiligt ist (O'Donovan and Livingston, 2010), dürfte dessen funktioneller (Teil-)Ausfall zu einer schlechteren Reparatur und damit zu mehr azentrischen Fragmenten führen (Foray et al., 1997).

4.2.5. Vergleich der Ergebnisse bei den Kontrollen mit denen bei den erkrankten *BRCA1*-Mutationsträgerinnen

Im Vergleich der Ergebnisse zwischen den erkrankten *BRCA1*-Mutationsträgerinnen und den Kontrollen ergaben sich zum größten Teil ähnliche Ergebnisse wie im Vergleich zwischen gesunden Mutationsträgerinnen und Kontrollen, obwohl die erkrankten Mutationsträgerinnen z.T. schon einer Therapie erhalten hatten (siehe 2.1.1.2). Allerdings schien der Unterschied zwischen Kontrollgruppe und den erkrankten *BRCA1*-Mutationsträgerinnen etwas größer zu sein als zu den gesunden Mutationsträgerinnen. Mit aller Vorsicht kann vermutet werden, dass eine bereits erfolgte Therapie eventuell einen leichten Einfluss auf die Reparaturfähigkeit von mammographieinduzierten Strahlenschäden bei *BRCA1*-Mutationsträgerinnen hat.

4.2.6. Vergleich der Ergebnisse bei den gesunden *BRCA1*-Mutationsträgerinnen mit denen bei den erkrankten *BRCA1*-Mutationsträgerinnen

Im Vergleich der Ergebnisse zwischen den gesunden und erkrankten *BRCA1*-Mutationsträgerinnen ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den jeweils unbestrahlten, mammographierten und bestrahlten Lymphozytenkulturen. Allerdings zeigten die erkrankten *BRCA1*-Mutationsträgerinnen für alle gemessenen Parameter einen etwas stärkeren Anstieg als die gesunden *BRCA1*-Mutationsträgerinnen. Auch wenn die Unterschiede nicht signifikant waren, lässt die Tatsache, dass vier Parameter stärker stiegen, die Vermutung zu, dass eine vorausgegangene Erkrankung/Therapie keinen günstigen

Einfluss auf die Reparaturfähigkeit von DNA-Brüchen hat. Ähnliches hat eine Studie aus dem Jahr 2004 ermittelt (Baeyens et al., 2004). Nach Bestrahlung mit 2 Gy Kobalt 60 wurde mittels G2- und G0-Micronucleus-Assay eine höhere Strahlensensibilität bei erkrankten als bei gesunden *BRCA*-Mutationsträgerinnen gemessen. Allerdings war in diesem Versuchsaufbau die Strahlensensibilität gesunder *BRCA*-Mutationsträgerinnen nicht höher als in der Gruppe gesunder Kontrollprobanden.

4.3. Eignung der Methode des AHC-FISH zur Messung der Strahlensensibilität und als Funktionstest zur Bestimmung von Varianten unklarer Signifikanz

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung mit einer All-Human-Centromer-Sonde prinzipiell geeignet ist, um die Strahlensensibilität quantitativ darzustellen. Dabei hat sich wie schon in anderen Publikationen eine Strahlendosis von ca. 4 Gy als optimal erwiesen (Becker et al., 2012). Für Probanden mit einer eingeschränkten Reparaturkapazität von DNA-Doppelstrangbrüchen eignet sich diese Methode besonders gut, da damit insbesondere azentrische Fragmente gut dargestellt werden. Auch lässt sich die Anzahl numerischer Aberrationen damit gut darstellen. Allerdings sind diese nicht im Zusammenhang mit der Strahlenbelastung zu sehen, da numerische Aberrationen durch andere Pathomechanismen entstehen. Sie können in diesem Versuchsaufbau aber als Vergleich genutzt werden. Für die quantitative Auswertung nichtreparierter Strahlenschäden haben sich die Parameter "Anteil aberranter Metaphasen" sowie "Aberrationen pro aberranter Metaphase" bewährt, da sich damit sowohl Schadensausmaß als auch Schadensintensität darstellen lassen. Anhand der Ergebnisse ließ sich zeigen, dass Trägerinnen einer pathogenen Mutation im *BRCA1*-Gen nach Bestrahlung mit 4 Gy Kobalt 60 gegenüber Frauen aus der Normalbevölkerung eine erhöhte Strahlensensibilität aufwiesen. Eine erhöhte Anzahl nicht-reparierter Strahlenschäden nach Mammagraphie ließ sich hingegen nicht zeigen.

Trotz der signifikanten Unterschiede zwischen Mutationsträgerinnen und Kontrollgruppe nach Bestrahlung mit 4 Gy Kobalt 60 scheint die AHC-FISH-Methode bisher noch nicht ausreichend sicher, um als Funktionstest zur Bestimmung von VUS eingesetzt werden zu können. Denn bereits in der Kontrollgruppe gab es eine starke Varianz der Ergebnisse von 44,0 bis 72,0 % aberranter Metaphasen bzw. durchschnittlich 1,5 bis 4,4 Aberrationen pro aberranter Methaphase nach Bestrahlung mit 4 Gy Kobalt 60. In der Gruppe der *BRCA1*-Mutationsträgerinnen schwankten die Ergebnisse zwischen 47,8 bis 92 % aberranter Metaphasen bzw. durchschnittlich 2,3 bis 5,0 Aberrationen pro aberranter Metaphase. Zur

Einordnung der zu testenden Sequenzveränderungen wären möglicherweise Proben von mehreren Probanden mit der gleichen Mutation hilfreich.

Für beide Fragestellungen, erscheint es in der Zukunft sinnvoll, sich auf die Auswertung von azentrischen Fragmenten und dizentrischen Chromosomen zu beschränken und für die Vergleiche schließlich nur den Anteil der aberranten Metaphasen sowie die Gesamtzahl der Aberrationen pro aberranter Metaphase zu verwenden. Abschließend sollte zur Verbesserung der Präzision eine Adjustierung für multiples Testen erfolgen.

4.4. Methodenvergleich

In der vorliegenden Arbeit wurde versucht, die Strahlensensibilität mittels eines FISH-Assays mit einer All-Human-Centromer-Sonde zu messen. Zudem sollte mittels dieser Technik geprüft werden, ob die Strahlensensibilität von *BRCA1*-Mutationsträgerinnen gegenüber Frauen der Normalbevölkerung erhöht ist. Zudem sollte ermittelt werden, ob diese Methode als Funktionstest zur Einordnung von VUS geeignet ist. Für die Anwendung dieser Technik zu diesem Zwecke gibt es in der Literatur bisher noch keine Vergleichsstudien. Allerdings untersuchten Darroudi et al. Aneuploidien an Hepatozyten und Lymphozyten nach Bestrahlung sowie chemischer Induktion anhand einer Kombination von Micronucleolus-Assay und FISH plus AHC-Probe. Damit konnten sie eine erhöhte Aberrationsrate in Form von Zentromer-positiven Micronuclei sowohl nach Bestrahlung als auch nach chemischer Induktion vor allem bei Hepatozyten feststellen (Darroudi et al., 1996). Und auch Durante et al. konnten mit einer AHC-FISH-Probe plus WCP-FISH für Chromosom 4 eine erhöhte Anzahl von Chromosomenaberrationen nach Bestrahlung feststellen (Durante et al., 1996).

Am ehesten vergleichbar mit der vorliegenden Arbeit ist die Studie von Becker et al. aus dem Jahr 2012 (Becker et al., 2012), in der zu identischem Zwecke die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung mittels 24-Farben-Metaphase-FISH angewendet wurde. Allerdings untersuchte Becker die Strahlensensibilität von Trägerinnen einer pathogenen *BRCA2*-Mutation (n=10), statt einer *BRCA1*-Mutation, sowie sieben VUS-Mutationen im *BRCA2*-Gen (n = 7). Zum Vergleich wurden ebenfalls Proben von alters-gematchten Kontrollen (n = 13) herangezogen, die, wie in der hier vorliegenden Arbeit, nicht auf eine *BRCA2*-Mutation untersucht worden waren, aber keine auffällige Eigen- oder Familienanamnese hinsichtlich Mamma- oder Ovarialkarzinom hatten. Als Material dienten Becker et al. ebenfalls Lymphozytenkulturen (*BRCA2*: n = 7 Kulturen, Kontrollen: n = 7 Kulturen, VUS: n = 7). Zusätzlich wurden auch Fibroblasten (*BRCA2*: n = 4 Kulturen, Kontrollen: n = 4 Kulturen)

untersucht. Aufgrund von großer Heterogenität der Ergebnisse vor allem bei den Mutationsträgerinnen, geringer Zahl an strahleninduzierten Schäden sowie fehlender Signifikanz zwischen den Ergebnissen der Kontrollen und der Mutationsträgerinnen beendeten Becker et. al. die Untersuchungen an Fibroblasten und führten die weiteren Untersuchungen nur an Lymphozytenkulturen durch. Dies bestätigt die Wahl von Lymphozytenkulturen als Untersuchungsmaterial in der vorliegenden Arbeit. Becker et al. bestrahlten ihre Lymphozytenkulturen mittels Linearbeschleuniger mit Bestrahlungsdosen von 0,125, 0,5, 1, 2, 4, 6, 8, und 12 Gy. Wie auch in unseren Vorversuchen war eine Auswertung nach Bestrahlung mit mehr als 4 Gy aufgrund der komplexen Chromosomenveränderungen nicht möglich. Auch Becker et al. konnten erst ab einer Strahlendosis von 4 Gy signifikante Unterschiede zwischen Mutationsträgerinnen und Kontrollen zeigen (Aberrationen pro ausgewerteter Metaphase), was das von uns gewählte experimentelle Design bestätigt. Durch die Benutzung von M-FISH und G-Banden-Darstellung (in Form einer invertierten DAPI-Gegenfärbung) war es Becker et al. allerdings möglich, alle 46 Chromosomen zu identifizieren und damit auch Translokationen, Ringchromosomen, Insertionen und bedingt große Deletionen sowie z.T. Isochromosomen zu detektieren. Im Gegensatz dazu war es mit der AHC-Methode nur möglich, die Chromosomenzahl zu bestimmen und azentrische Fragmente sowie dizentrische Chromosomen zu bestimmen. Die Vielfalt der Auswertung ist beim AHC-FISH durch die Beschränkung auf die Zentromere eingeschränkt. So lassen sich Translokationen, Inversionen, Deletionen und Duplikationen nicht darstellen. Becker verwendete als Parameter lediglich Aberrationen pro ausgewerteter Metaphase. Die einzelnen Aberrationen wurden nicht verglichen. In der hier durchgeführten Analyse wurde mittels der Parameter Anteil aberranter Metaphasen und Aberrationen pro aberranter Metaphase sowohl die Anzahl der geschädigten Zellen als auch das Ausmaß der geschädigten Zellen gemessen. Zudem wurden die Auswertungen der einzelnen Aberrationen verglichen. Trotz der methodischen Unterschiede, der in der vorliegenden Arbeit geringfügig höheren Fallzahlen und der Tatsache, dass Becker et al. auch Trägerinnen von unklassifizierten *BRCA2*-Sequenzveränderungen untersucht hatten, die nicht sicher pathogen waren, konnten beide Arbeiten zeigen, dass die Strahlensensibilität von *BRCA*-Mutationsträgerinnen im Vergleich zu Kontrollpersonen anhand der Ergebnisse der jeweiligen Methode sowie der gewählten Bezugsgröße (Prozent aberrante Metaphasen plus Aberrationen pro aberranter Metaphase versus Aberrationen pro ausgewerteter Metaphase) bei einer Bestrahlung von 4 Gy erhöht war. Mithilfe ihrer Methode ordneten Becker et al. die untersuchten VUS in "pathogen" und "nicht pathogen" ein.

Allerdings zeigten auch diese Ergebnisse trotz der ermittelten Signifikanz große Streuungen sowohl innerhalb der Kontrollgruppe als auch innerhalb der Gruppe der *BRCA2*-Mutationsträgerinnen, so dass auch diese Methode in der Praxis als Funktionstest zur sicheren Identifizierung von pathogenen Mutationen nicht ausreichend geeignet zu sein scheint.

4.5. Bedeutung der Ergebnisse für die Anwendung von Mammographie und Strahlentherapie in der Klinik

Verbindliche Aussagen zu klinisch relevanten Auswirkungen der Mammographie auf die Zellen *in vivo* können anhand der vorliegenden Untersuchungen noch nicht gemacht werden. Tendenziell zeigten sich nach einer Mammographie zwar vereinzelt Chromosomenaberrationen. Sie schienen jedoch bei den *BRCA1*-Mutationsträgerinnen nicht häufiger und umfangreicher zu sein als in der Kontrollgruppe. Da die Frage nach potentiellen Strahlenschäden durch wiederholte Mammographien für viele besorgte Frauen von Bedeutung ist, wäre eine Ausweitung dieser Studie mit größeren Probandenzahlen und weiteren Methoden wie 24-Farben-FISH wünschenswert. Methodisch wäre es interessant, einen zeitlichen Ablauf zu etablieren, in dem die Lymphozytenkulturen mehreren Mammographien unterzogen werden, um den wiederholten Einfluss einer diagnostischen Strahlenbelastung zu simulieren. Allerdings ist hierfür die Lebensdauer der Lymphozyten zu gering. Bei der Verwendung von permanenten Zelllinien würden *in vitro* wahrscheinlich mehr spontane Aberrationen entstehen, als durch die Mammographie induziert würden. Zu der Frage, ob eine erhöhte Frequenz an Mammographien gerade in jüngerem Alter bei *BRCA*-Mutationsträgerinnen zu einem erhöhten Mammakarzinomrisiko führt, wurden bereits einige retrospektive Studien mit sehr unterschiedlichen, zum Teil gegensätzlichen Ergebnissen durchgeführt. Einige Studien zeigten, dass es durch vermehrte diagnostische Strahlung bei *BRCA*-Mutationsträgerinnen zu einem vermehrten Auftreten von Mammakarzinomen kam (Andrieu et al., 2006, Lecarpentier et al., 2011), andere konnten diesen Zusammenhang nicht nachweisen (Narod et al., 2006, Goldfrank et al., 2006, John et al., 2013). Berücksichtigt und diskutiert werden muss unter diesem Aspekt auch der Nutzen der Mammographie. Der Erkennung des Mammakarzinoms im Frühstadium folgt ein früherer Behandlungsbeginn. Hieraus ergibt sich eine Senkung der Mortalität und bessere Therapieoptionen (Berrington de Gonzalez et al., 2009). Da aber zumindest einige Studien zeigten, dass besonders der frühe Beginn und die erhöhte Frequenz der jährlichen Mammographien das Risiko erhöhen, an einem Mammakarzinom zu erkranken (Pijpe et al., 2012), gab es in den letzten Jahren bereits

einen Wandel in den Vorsorgeempfehlungen sowohl in Deutschland (Bick and Fallenberg, 2013), als auch beispielsweise in den Niederlanden (NABON, 2012). So wurde der Beginn der Mammographie im Rahmen der Vorsorge bei Hochrisikopatienten vom 30. Lebensjahr auf das 40. Lebensjahr verschoben und auch nur alle ein bis zwei Jahre statt jährlich empfohlen.

Auch im Zusammenhang mit der Therapie eines Mammakarzinomes kann eine erhöhte Strahlensensibilität von *BRCA1*-Mutationsträgerinnen diskutiert werden. Bei Brustkrebspatienten (zum größten Teil ohne genetische Prädisposition) konnte in einer retrospektiven Kohortenstudie gezeigt werden, dass es nach kombinierter Therapie (Chemotherapie, Radiotherapie, Hormontherapie) zu einem vermehrten Auftreten von Zweitkarzinomen im Vergleich zu nicht an einem Karzinom erkrankten Kontrollpersonen gekommen ist. Durch eine alleinige Strahlentherapie gab es jedoch kein signifikant höheres Auftreten an Zweitkarzinomen (Kirova et al., 2008). Eine weitere Metaanalyse (Drooger et al., 2015) fasst zusammen, dass es in mehreren Studien (Haffty et al., 2002, Seynaeve et al., 2004, Kirova et al., 2005, Garcia-Etienne et al., 2009, Pierce et al., 2010, Robson et al., 2005) bei *BRCA*-Mutationsträgerinnen zu keinem vermehrten Auftreten von ipsilateralem oder kontralateralem Mammakarzinom nach Radiotherapie im Vergleich zu Nicht-Mutationsträgerinnen gekommen ist. Bezüglich der Auswirkung einer Strahlentherapie können mittels des hier beschriebenen Versuchsaufbaus Aussagen nur mit Vorsicht getroffen werden. Denn die Einzeldosis jeder Sitzung im Rahmen der Strahlentherapie beträgt 1,8 bis 2 Gy mit einer kumulativen Dosis von 50-54 Gy. Diese Einzeldosis ist deutlich geringer als bei der in diesem Versuchsaufbau untersuchten Strahlendosis von 4 Gy Kobalt 60.

4.6. Fazit und Ausblick

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass strahleninduzierte Chromosomenaberrationen in Form von azentrischen Fragmenten und dizentrischen Chromosomen durch die AHC-FISH-Methode dargestellt und für die Messung der individuellen Strahlenempfindlichkeit genutzt werden können.

Mit der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Technik konnte gezeigt werden, dass *BRCA1*-Mutationsträgerinnen nach Bestrahlung mit 4 Gy Kobalt 60 mehr nicht reparierte Chromosomenaberrationen infolge einer verminderten DNA-Reparaturkapazität haben als gesunde Frauen aus der Normalbevölkerung. Allerdings gab es trotz signifikanter Unterschiede in beiden Gruppen einzelne Ausreißer und eine z.T. erhebliche

Schwankungsbreite, weshalb die Methode derzeit als Funktionstest zur Klassifizierung von Sequenzveränderungen unklarer Signifikanz im *BRCA1*-Gen noch nicht geeignet zu sein scheint. Ein direkter Vergleich der AHC-FISH-Methode mit bereits etablierten Methoden (z. B. Chromosomenanalyse) könnte helfen, deren Praktikabilität und Aussagekraft besser einzuschätzen. In jedem Fall sollte eine größere Anzahl von *BRCA1*-Mutationsträgerinnen untersucht werden, um den Fehler der kleinen Zahl zu minimieren. Dabei könnte es interessant sein, mehrere Mutationsträgerinnen mit der gleichen Sequenzveränderung/Mutation zu untersuchen, um den funktionellen Einfluss des Mutationstyps einschätzen zu können. Auch eine Kombination von zwei Methoden (AHC- mit M-FISH) könnte möglicherweise eine genauere Beurteilung der individuellen Strahlenempfindlichkeit ermöglichen.

5. Zusammenfassung

Das Mammakarzinom tritt in 20 % der Fälle familiär gehäuft auf. Mutationen in den Genen *BRCA1* und *BRCA2* stellen die häufigste erbliche Disposition für das familiäre Mammakarzinom dar. Das *BRCA1*-Protein ist Bestandteil des Reparaturapparates, der in der Zelle DNA-Doppelstrangbrüche repariert, wie sie unter anderem durch ionisierende Strahlung induziert werden. Ziel dieser Arbeit war es, zu prüfen, ob Frauen mit einer pathogenen *BRCA1*-Mutation gegenüber gesunden Kontrollen eine erhöhte Sensibilität für die bei der Mammographie und der Strahlentherapie verabreichten Strahlenarten und Strahlendosen haben. Dafür wurde hier eine Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung mit einer AHC-Sonde als entsprechender Funktionstest gewählt. Damit wurden in unbestrahlten Lymphozytenkulturen, als auch nach Mammographie (0,005 Gy) und nach Bestrahlung mit 4 Gy Kobalt 60 nicht reparierte Strahlenschäden in Lymphozytenkulturen in Form von azentrischen Fragmenten, dizentrischen Chromosomen und numerischen Aberrationen bestimmt. Daraus wurde der Anteil aberranter Metaphasen und die Anzahl der Aberrationen pro aberranter Metaphase berechnet. Die Ergebnisse von insgesamt 21 *BRCA1*-Mutationsträgerinnen (10 gesunde und 11 bereits an einem Karzinom erkrankte) sowie von neun gesunden Frauen (altersgematcht, ohne familiären Hintergrund aber unbekanntem *BRCA*-Status) als Kontrollen wurden miteinander verglichen. Bei den Vergleichen innerhalb der drei Untersuchungsgruppen konnten in den mammographierten Proben nicht signifikant mehr Aberrationen ermittelt werden als in den unbestrahlten Lymphozytenkulturen. Erst nach Bestrahlung mit 4 Gy Kobalt 60 zeigten sich in allen drei Gruppen signifikante Unterschiede zu den unbestrahlten Kulturen sowohl im Anteil der aberranten Metaphasen als auch in den Aberrationen pro aberranter Metaphase (Kontrollen: $p = 0,008$ und $p = 0,008$; gesunde *BRCA1*-Mutationsträgerinnen: $p = 0,002$ und $p = 0,002$; erkrankte *BRCA1*-Mutationsträgerinnen: $p = 0,004$ und $p = 0,008$). Auch der Vergleich zwischen der Kontrollgruppe und den *BRCA1*-Mutationsträgerinnen ergab nur nach Bestrahlung mit 4 Gy Kobalt 60 signifikante Unterschiede (Kontrolle - ges. *BRCA1*-Mutationsträgerinnen: Anteil aberranter Metaphasen: $p = 0,011$, Aberrationen pro aberranter Metaphase: $p = 0,027$; Kontrolle - erkr. *BRCA1*-Mutationsträgerinnen: Anteil aberranter Metaphasen: $p = 0,004$, Aberrationen pro aberranter Metaphase: $p = 0,02$).

Es konnte gezeigt werden, dass nach einer einzelnen Mammographie bei den *BRCA1*-Mutationsträgerinnen nicht signifikant mehr unreparierte DNA-Schäden verbleiben als bei den Kontrollen. Im Gegensatz zur diagnostischen Strahlenbelastung konnte jedoch gezeigt

werden, dass *BRCA1*-Mutationsträgerinnen nach Bestrahlung mit 4 Gy gegenüber gesunden Kontrollen eine verminderte Reparaturfähigkeit für strahleninduzierte DNA-Doppelstrangbrüche und damit eventuell eine erhöhte Sensibilität für die therapeutische Bestrahlung aufweisen. Abschließend ist festzustellen, dass sich die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung mittels All-Human-Centromer-Sonde zur Messung der Strahlensensibilität in Form von nicht reparierten strahleninduzierten Chromosomenschäden eignet und damit eine erhöhte Strahlensensibilität von *BRCA1*-Mutationsträgerinnen gegenüber Kontrollen nach Bestrahlung mit 4 Gy Kobalt 60 dargestellt werden konnte.

6. Literaturverzeichnis

Abkevich, V., Zharkikh, A., Deffenbaugh, A. M., Frank, D., Chen, Y., Shattuck, D., Skolnick, M. H., Gutin, A. and Tavtigian, S. V. (2004): Analysis of missense variation in human BRCA1 in the context of interspecific sequence variation. *J Med Genet*, 41, 492-507.

Ahlborn, L. B., Dandanell, M., Steffensen, A. Y., Jonson, L., Nielsen, F. C. and Hansen, T. V. (2015): Splicing analysis of 14 BRCA1 missense variants classifies nine variants as pathogenic. *Breast Cancer Res Treat*, 150, 289-98.

Andrieu, N., Easton, D. F., Chang-Claude, J., Rookus, M. A., Brohet, R., Cardis, E., Antoniou, A. C., Wagner, T., Simard, J., Evans, G., Peock, S., Fricker, J. P., Nogues, C., Van't Veer, L., Van Leeuwen, F. E. and Goldgar, D. E. (2006): Effect of chest X-rays on the risk of breast cancer among BRCA1/2 mutation carriers in the international BRCA1/2 carrier cohort study: a report from the EMBRACE, GENEPSO, GEO-HEBON, and IBCCS Collaborators' Group. *J Clin Oncol*, 24, 3361-6.

Anonymous (1997): Breast cancer and hormone replacement therapy: collaborative reanalysis of data from 51 epidemiological studies of 52,705 women with breast cancer and 108,411 women without breast cancer. Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. *Lancet*, 350, 1047-59.

Antonini, N., Jones, H., Horiot, J. C., Poortmans, P., Struikmans, H., Van Den Bogaert, W., Barillot, I., Fourquet, A., Jager, J., Hoogenraad, W., Collette, L., Pierart, M., Hart, G. and Bartelink, H. (2007): Effect of age and radiation dose on local control after breast conserving treatment: EORTC trial 22881-10882. *Radiother Oncol*, 82, 265-71.

Antoniou, A., Pharoah, P. D., Narod, S., Risch, H. A., Eyfjord, J. E., Hopper, J. L., Loman, N., Olsson, H., Johannsson, O., Borg, A., Pasini, B., Radice, P., Manoukian, S., Eccles, D. M., Tang, N., Olah, E., Anton-Culver, H., Warner, E., Lubinski, J., Gronwald, J., Gorski, B., Tulinius, H., Thorlacius, S., Eerola, H., Nevanlinna, H., Syrjakoski, K., Kallioniemi, O. P., Thompson, D., Evans, C., Peto, J., Lalloo, F., Evans, D. G. and Easton, D. F. (2003): Average risks of breast and ovarian cancer associated with BRCA1 or BRCA2 mutations detected in case Series unselected for family history: a combined analysis of 22 studies. *Am J Hum Genet*, 72, 1117-30.

Antoniou, A. C., Casadei, S., Heikkinen, T., Barrowdale, D., Pylkas, K., Roberts, J., Lee, A., Subramanian, D., De Leeneer, K., Fostira, F., Tomiak, E., Neuhausen, S. L., Teo, Z. L., Khan, S., Aittomaki, K., Moilanen, J. S., Turnbull, C., Seal, S., Mannermaa, A., Kallioniemi, A., Lindeman, G. J., Buys, S. S., Andrulis, I. L., Radice, P., Tondini, C., Manoukian, S., Toland, A. E., Miron, P., Weitzel, J. N., Domchek, S. M., Poppe, B., Claes, K. B., Yannoukakos, D., Concannon, P., Bernstein, J. L., James, P. A., Easton, D. F., Goldgar, D. E., Hopper, J. L., Rahman, N., Peterlongo, P., Nevanlinna, H., King, M. C., Couch, F. J., Southey, M. C., Winqvist, R., Foulkes, W. D. and Tischkowitz, M. (2014): Breast-cancer risk in families with mutations in PALB2. *N Engl J Med*, 371, 497-506.

Armstrong, K., Eisen, A. and Weber, B. (2000): Assessing the risk of breast cancer. *N Engl J Med*, 342, 564-71.

Atchley, D. P., Albarracin, C. T., Lopez, A., Valero, V., Amos, C. I., Gonzalez-Angulo, A. M., Hortobagyi, G. N. and Arun, B. K. (2008): Clinical and pathologic characteristics of patients with BRCA-positive and BRCA-negative breast cancer. *J Clin Oncol*, 26, 4282-8.

Baeyens, A., Thierens, H., Claes, K., Poppe, B., De Ridder, L. and Vral, A. (2004): Chromosomal radiosensitivity in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. *Int J Radiat Biol*, 80, 745-56.

Bartelink, H., Horiot, J. C., Poortmans, P. M., Struikmans, H., Van Den Bogaert, W., Fourquet, A., Jager, J. J., Hoogenraad, W. J., Oei, S. B., Warlam-Rodenhuis, C. C., Pierart, M. and Collette, L. (2007): Impact of a higher radiation dose on local control and survival in breast-conserving therapy of early breast cancer: 10-year results of the randomized boost versus no boost EORTC 22881-10882 trial. *J Clin Oncol*, 25, 3259-65.

Becker, A. A., Graeser, M. K., Landwehr, C., Hilger, T., Baus, W., Wappenschmidt, B., Meindl, A., Weber, R. G. and Schmutzler, R. K. (2012): A 24-color metaphase-based radiation assay discriminates heterozygous BRCA2 mutation carriers from controls by chromosomal radiosensitivity. *Breast Cancer Res Treat*, 135, 167-75.

Bekker-Jensen, S., Lukas, C., Kitagawa, R., Melander, F., Kastan, M. B., Bartek, J. and Lukas, J. (2006): Spatial organization of the mammalian genome surveillance machinery in response to DNA strand breaks. *J Cell Biol*, 173, 195-206.

Berrington De Gonzalez, A., Berg, C. D., Visvanathan, K. and Robson, M. (2009): Estimated risk of radiation-induced breast cancer from mammographic screening for young BRCA mutation carriers. *J Natl Cancer Inst*, 101, 205-9.

Berrington De Gonzalez, A. and Reeves, G. (2005): Mammographic screening before age 50 years in the UK: comparison of the radiation risks with the mortality benefits. *Br J Cancer*, 93, 590-6.

Bick, U. (2015): Intensified surveillance for early detection of breast cancer in high-risk patients. *Breast Care (Basel)*, 10, 13-20.

Bick, U. and Fallenberg, E. M. 2013. Radiologische Besonderheiten

familiärer Tumoren; Das radiologische Früherkennungsprinzip. *Mamma-Mia Spezial*, *Komme ich aus einer Krebsfamilie?* Kronberg: GeKo Verlag GbR.

Böcker W, D. H., Heitz Ph U, Moch H (2008): Pathologie, München; Jena, Elsevier, Urban & Fischer.

Bogdanova, N., Feshchenko, S., Schurmann, P., Waltes, R., Wieland, B., Hillemanns, P., Rogov, Y. I., Dammann, O., Bremer, M., Karstens, J. H., Sohn, C., Varon, R. and Dork, T. (2008): Nijmegen Breakage Syndrome mutations and risk of breast cancer. *Int J Cancer*, 122, 802-6.

Bonassi, S., Hagmar, L., Stromberg, U., Montagud, A. H., Tinnerberg, H., Forni, A., Heikkila, P., Wanders, S., Wilhardt, P., Hansteen, I. L., Knudsen, L. E. and Norppa, H. (2000): Chromosomal aberrations in lymphocytes predict human cancer independently of exposure to carcinogens. European Study Group on Cytogenetic Biomarkers and Health. *Cancer Res*, 60, 1619-25.

Borgmann, K., Roper, B., El-Awady, R., Brackrock, S., Bigalke, M., Dork, T., Alberti, W., Dikomey, E. and Dahm-Daphi, J. (2002): Indicators of late normal tissue response after radiotherapy for head and neck cancer: fibroblasts, lymphocytes, genetics, DNA repair, and chromosome aberrations. *Radiother Oncol*, 64, 141-52.

Byrski, T., Gronwald, J., Huzarski, T., Grzybowska, E., Budryk, M., Stawicka, M., Mierzwa, T., Szwiec, M., Wisniowski, R., Siolek, M., Dent, R., Lubinski, J. and Narod, S. (2010): Pathologic complete response rates in young women with BRCA1-positive breast cancers after neoadjuvant chemotherapy. *J Clin Oncol*, 28, 375-9.

Calo, V., Bruno, L., La Paglia, L., Perez, M., Margarese, N., Di Gaudio, F. and Russo, A. (2010): The Clinical Significance of Unknown Sequence Variants in BRCA Genes. *Cancers (Basel)*, 2, 1644-60.

Chen, J., Silver, D. P., Walpita, D., Cantor, S. B., Gazdar, A. F., Tomlinson, G., Couch, F. J., Weber, B. L., Ashley, T., Livingston, D. M. and Scully, R. (1998): Stable interaction between the products of the BRCA1 and BRCA2 tumor suppressor genes in mitotic and meiotic cells. *Mol Cell*, 2, 317-28.

Chen, W. Y., Rosner, B., Hankinson, S. E., Colditz, G. A. and Willett, W. C. (2011): Moderate alcohol consumption during adult life, drinking patterns, and breast cancer risk. *JAMA*, 306, 1884-90.

Clarke, M. (2006): Meta-analyses of adjuvant therapies for women with early breast cancer: the Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group overview. *Ann Oncol*, 17 Suppl 10, x59-62.

Colin, C., Devic, C., Noel, A., Rabilloud, M., Zobot, M. T., Pinet-Isaac, S., Giraud, S., Riche, B., Valette, P. J., Rodriguez-Lafrasse, C. and Foray, N. (2011): DNA double-strand breaks

induced by mammographic screening procedures in human mammary epithelial cells. *Int J Radiat Biol*, 87, 1103-12.

Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer (2012): Menarche, menopause, and breast cancer risk: individual participant meta-analysis, including 118 964 women with breast cancer from 117 epidemiological studies. *Lancet Oncol*, 13, 1141-51.

Cornforth, M. N. (2001): Analyzing Radiation-Induced Complex Chromosome Rearrangements by Combinatorial Painting. *Radiation Research*, 155, 643-659.

Cornforth, M. N. and Goodwin, E. H. (1991): Transmission of radiation-induced acentric chromosomal fragments to micronuclei in normal human fibroblasts. *Radiat Res*, 126, 210-7.

Cremer, T. J., Anna; Ried, Thomas; Schröck, Evelin; Lengauer, Christoph; Cremer, Marion; Speicher, Michael R. (1995): Medizinische Genetik und Tumorzytogenetik: Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH). *Dt Ärztebl* 92, 1593-601.

Daly, M. B., Axilbund, J. E., Buys, S., Crawford, B., Farrell, C. D., Friedman, S., Garber, J. E., Goorha, S., Gruber, S. B., Hampel, H., Kaklamani, V., Kohlmann, W., Kurian, A., Litton, J., Marcom, P. K., Nussbaum, R., Offit, K., Pal, T., Pasche, B., Pilarski, R., Reiser, G., Shannon, K. M., Smith, J. R., Swisher, E. and Weitzel, J. N. (2010): Genetic/familial high-risk assessment: breast and ovarian. *J Natl Compr Canc Netw*, 8, 562-94.

Darby, S., McGale, P., Correa, C., Taylor, C., Arriagada, R., Clarke, M., Cutter, D., Davies, C., Ewertz, M., Godwin, J., Gray, R., Pierce, L., Whelan, T., Wang, Y. and Peto, R. (2011): Effect of radiotherapy after breast-conserving surgery on 10-year recurrence and 15-year breast cancer death: meta-analysis of individual patient data for 10,801 women in 17 randomised trials. *Lancet*, 378, 1707-16.

Darroudi, F., Meijers, C. M., Hadjidekova, V. and Natarajan, A. T. (1996): Detection of aneugenic and clastogenic potential of X-rays, directly and indirectly acting chemicals in human hepatoma (Hep G2) and peripheral blood lymphocytes, using the micronucleus assay and fluorescent in situ hybridization with a DNA centromeric probe. *Mutagenesis*, 11, 425-33.

Deffenbaugh, A. M., Frank, T. S., Hoffman, M., Cannon-Albright, L. and Neuhausen, S. L. (2002): Characterization of common BRCA1 and BRCA2 variants. *Genet Test*, 6, 119-21.

Domchek, S. M., Friebel, T. M., Singer, C. F., Evans, D. G., Lynch, H. T., Isaacs, C., Garber, J. E., Neuhausen, S. L., Matloff, E., Eeles, R., Pichert, G., Van T'Veer, L., Tung, N., Weitzel, J. N., Couch, F. J., Rubinstein, W. S., Ganz, P. A., Daly, M. B., Olopade, O. I., Tomlinson, G., Schildkraut, J., Blum, J. L. and Rebbeck, T. R. (2010): Association of risk-reducing surgery in BRCA1 or BRCA2 mutation carriers with cancer risk and mortality. *JAMA*, 304, 967-75.

Donnelly, J., Mack, P. and Donaldson, L. A. (2001): Follow-up of breast cancer: time for a new approach? *Int J Clin Pract*, 55, 431-3.

Drooger, J. C., Hooning, M. J., Seynaeve, C. M., Baaijens, M. H., Obdeijn, I. M., Sleijfer, S. and Jager, A. (2015): Diagnostic and therapeutic ionizing radiation and the risk of a first and second primary breast cancer, with special attention for BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: a critical review of the literature. *Cancer Treat Rev*, 41, 187-96.

Durante, M., George, K., Wu, H. and Yang, T. C. (1996): Rejoining and misrejoining of radiation-induced chromatin breaks. I. experiments with human lymphocytes. *Radiat Res*, 145, 274-80.

Easton, D. F., Pooley, K. A., Dunning, A. M., Pharoah, P. D., Thompson, D., Ballinger, D. G., Struwing, J. P., Morrison, J., Field, H., Luben, R., Wareham, N., Ahmed, S., Healey, C. S., Bowman, R., Meyer, K. B., Haiman, C. A., Kolonel, L. K., Henderson, B. E., Le Marchand, L., Brennan, P., Sangrajrang, S., Gaborieau, V., Odefrey, F., Shen, C. Y., Wu, P. E., Wang, H. C., Eccles, D., Evans, D. G., Peto, J., Fletcher, O., Johnson, N., Seal, S., Stratton, M. R., Rahman, N., Chenevix-Trench, G., Bojesen, S. E., Nordestgaard, B. G., Axelsson, C. K., Garcia-Closas, M., Brinton, L., Chanock, S., Lissowska, J., Peplonska, B., Nevanlinna, H., Fagerholm, R., Eerola, H., Kang, D., Yoo, K. Y., Noh, D. Y., Ahn, S. H., Hunter, D. J., Hankinson, S. E., Cox, D. G., Hall, P., Wedren, S., Liu, J., Low, Y. L., Bogdanova, N., Schurmann, P., Dork, T., Tollenaar, R. A., Jacobi, C. E., Devilee, P., Klijn, J. G., Sigurdson, A. J., Doody, M. M., Alexander, B. H., Zhang, J., Cox, A., Brock, I. W., Macpherson, G., Reed, M. W., Couch, F. J., Goode, E. L., Olson, J. E., Meijers-Heijboer, H., Van Den Ouweland, A., Uitterlinden, A., Rivadeneira, F., Milne, R. L., Ribas, G., Gonzalez-Neira, A., Benitez, J., Hopper, J. L., Mccredie, M., Southey, M., Giles, G. G., Schroen, C., Justenhoven, C., Brauch, H., Hamann, U., Ko, Y. D., Spurdle, A. B., Beesley, J., Chen, X., Mannermaa, A., Kosma, V. M., Kataja, V., Hartikainen, J., Day, N. E., Cox, D. R. and Ponder, B. A. (2007): Genome-wide association study identifies novel breast cancer susceptibility loci. *Nature*, 447, 1087-93.

Edlich, R. F., Winters, K. L. and Lin, K. Y. (2005): Breast cancer and ovarian cancer genetics. *J Long Term Eff Med Implants*, 15, 533-45.

Ernestos, B., Nikolaos, P., Koulis, G., Eleni, R., Konstantinos, B., Alexandra, G. and Michael, K. (2010): Increased chromosomal radiosensitivity in women carrying BRCA1/BRCA2 mutations assessed with the G2 assay. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 76, 1199-205.

Evans, D. G., Lalloo, F., Cramer, A., Jones, E. A., Knox, F., Amir, E. and Howell, A. (2009): Addition of pathology and biomarker information significantly improves the performance of the Manchester scoring system for BRCA1 and BRCA2 testing. *J Med Genet*, 46, 811-7.

Farmer, H., McCabe, N., Lord, C. J., Tutt, A. N., Johnson, D. A., Richardson, T. B., Santarosa, M., Dillon, K. J., Hickson, I., Knights, C., Martin, N. M., Jackson, S. P., Smith, G.

C. and Ashworth, A. (2005): Targeting the DNA repair defect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy. *Nature*, 434, 917-21.

Finch, A. P., Lubinski, J., Moller, P., Singer, C. F., Karlan, B., Senter, L., Rosen, B., Maehle, L., Ghadirian, P., Cybulski, C., Huzarski, T., Eisen, A., Foulkes, W. D., Kim-Sing, C., Ainsworth, P., Tung, N., Lynch, H. T., Neuhausen, S., Metcalfe, K. A., Thompson, I., Murphy, J., Sun, P. and Narod, S. A. (2014): Impact of oophorectomy on cancer incidence and mortality in women with a BRCA1 or BRCA2 mutation. *J Clin Oncol*, 32, 1547-53.

Foray, N., Arlett, C. F. and Malaise, E. P. (1997): Radiation-induced DNA double-strand breaks and the radiosensitivity of human cells: a closer look. *Biochimie*, 79, 567-75.

Frampton, J. E. (2015): Olaparib: a review of its use as maintenance therapy in patients with ovarian cancer. *BioDrugs*, 29, 143-50.

Gadzicki, D., Schubert, A., Fischer, C., Milde, S., Lehmann, U., Steinemann, D., Luck, H. J., Kreipe, H. and Schlegelberger, B. (2009): Histopathological criteria and selection algorithms for BRCA1 genetic testing. *Cancer Genet Cytogenet*, 189, 105-11.

Gao, P., Ma, N., Li, M., Tian, Q. B. and Liu, D. W. (2013): Functional variants in NBS1 and cancer risk: evidence from a meta-analysis of 60 publications with 111 individual studies. *Mutagenesis*, 28, 683-97.

Garcia-Etienne, C. A., Barile, M., Gentilini, O. D., Botteri, E., Rotmensz, N., Sagona, A., Farante, G., Galimberti, V., Luini, A., Veronesi, P. and Bonanni, B. (2009): Breast-conserving surgery in BRCA1/2 mutation carriers: are we approaching an answer? *Ann Surg Oncol*, 16, 3380-7.

Gerber, B. (2001): Einfluss von Umwelt, Ernährung und Lebensstil auf das Brustkrebsrisiko. *Deutsches Arzteblatt-Arztliche Mitteilungen-Ausgabe A*, 98, 1612-1618.

Gibis, B., Busse, R., Reese, E., Richter, K., Schwartz, F.-W. and Köbberling, J. (1998): Health Technology Assessment: Das Mammographie-Screening als Verfahren zur Brustkrebsfrüherkennung, Baden-Baden, Nomos-Verlag.

Goldfrank, D., Chuai, S., Bernstein, J. L., Ramon, Y. C. T., Lee, J. B., Alonso, M. C., Diez, O., Baiget, M., Kauff, N. D., Offit, K. and Robson, M. (2006): Effect of mammography on breast cancer risk in women with mutations in BRCA1 or BRCA2. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 15, 2311-3.

Goldgar, D. E., Easton, D. F., Deffenbaugh, A. M., Monteiro, A. N., Tavtigian, S. V. and Couch, F. J. (2004): Integrated evaluation of DNA sequence variants of unknown clinical significance: application to BRCA1 and BRCA2. *Am J Hum Genet*, 75, 535-44.

Gray, J. W., Pinkel, D. and Brown, J. M. (1994): Fluorescence In Situ Hybridization in Cancer and Radiation Biology. *Radiation Research*, 137, 275-289.

Greenberg, R. A., Sobhian, B., Pathania, S., Cantor, S. B., Nakatani, Y. and Livingston, D. M. (2006): Multifactorial contributions to an acute DNA damage response by BRCA1/BARD1-containing complexes. *Genes Dev*, 20, 34-46.

Gronwald, J., Tung, N., Foulkes, W. D., Offit, K., Gershoni, R., Daly, M., Kim-Sing, C., Olsson, H., Ainsworth, P., Eisen, A., Saal, H., Friedman, E., Olopade, O., Osborne, M., Weitzel, J., Lynch, H., Ghadirian, P., Lubinski, J., Sun, P. and Narod, S. A. (2006): Tamoxifen and contralateral breast cancer in BRCA1 and BRCA2 carriers: an update. *Int J Cancer*, 118, 2281-4.

Guenard, F., Labrie, Y., Ouellette, G., Beauparlant, C. J., Bessette, P., Chiquette, J., Laframboise, R., Lepine, J., Lesperance, B., Pichette, R., Plante, M. and Durocher, F. (2007): Germline mutations in the breast cancer susceptibility gene PTEN are rare in high-risk non-BRCA1/2 French Canadian breast cancer families. *Fam Cancer*, 6, 483-90.

Haffty, B. G., Harrold, E., Khan, A. J., Pathare, P., Smith, T. E., Turner, B. C., Glazer, P. M., Ward, B., Carter, D., Matloff, E., Bale, A. E. and Alvarez-Franco, M. (2002): Outcome of conservatively managed early-onset breast cancer by BRCA1/2 status. *Lancet*, 359, 1471-7.

Hagmar, L., Bonassi, S., Stromberg, U., Brogger, A., Knudsen, L. E., Norppa, H. and Reuterwall, C. (1998): Chromosomal aberrations in lymphocytes predict human cancer: a report from the European Study Group on Cytogenetic Biomarkers and Health (ESCH). *Cancer Res*, 58, 4117-21.

Hartlerode, A. J. and Scully, R. (2009): Mechanisms of double-strand break repair in somatic mammalian cells. *Biochem J*, 423, 157-68.

Hearle, N., Schumacher, V., Menko, F. H., Olschwang, S., Boardman, L. A., Gille, J. J., Keller, J. J., Westerman, A. M., Scott, R. J., Lim, W., Trimpath, J. D., Giardiello, F. M., Gruber, S. B., Offerhaus, G. J., De Rooij, F. W., Wilson, J. H., Hansmann, A., Moslein, G., Royer-Pokora, B., Vogel, T., Phillips, R. K., Spigelman, A. D. and Houlston, R. S. (2006): Frequency and spectrum of cancers in the Peutz-Jeghers syndrome. *Clin Cancer Res*, 12, 3209-15.

Herrmann, T., Baumann, M. and Dörr, W. (2006): *Klinische Strahlenbiologie. kurz und bündig*, München, Elsevier GmbH, Urban & Fischer Verlag.

Iliakis, G. (1991): The role of DNA double strand breaks in ionizing radiation-induced killing of eukaryotic cells. *Bioessays*, 13, 641-8.

Iliakis, G., Wang, H., Perrault, A. R., Boecker, W., Rosidi, B., Windhofer, F., Wu, W., Guan, J., Terzoudi, G. and Pantelias, G. (2004): Mechanisms of DNA double strand break repair and chromosome aberration formation. *Cytogenet Genome Res*, 104, 14-20.

John, E. M., Mcguire, V., Thomas, D., Haile, R., Ozcelik, H., Milne, R. L., Felberg, A., West, D. W., Miron, A., Knight, J. A., Terry, M. B., Daly, M., Buys, S. S., Andrulis, I. L., Hopper, J. L., Southey, M. C., Giles, G. G., Apicella, C., Thorne, H., Kathleen Cuninghame Foundation Consortium for Research into Familial Breast, C. and Whittemore, A. S. (2013): Diagnostic chest X-rays and breast cancer risk before age 50 years for BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 22, 1547-56.

Kakati, S., Kowalczyk, J. R., Gibas, Z. and Sandberg, A. A. (1986): Use of radiation induced chromosomal damage in human lymphocytes as a biological dosimeter is questionable. *Cancer Genet Cytogenet*, 22, 137-41.

Kauffmann, G., Sauer, R. and Weber, W. (2011): *Radiologie - Bildgebende Verfahren, Strahlentherapie, Nuklearmedizin und Strahlenschutz*, München, Elsevier GmbH.

Kaurah, P., Macmillan, A., Boyd, N., Senz, J., De Luca, A., Chun, N., Suriano, G., Zaor, S., Van Manen, L., Gilpin, C., Nikkel, S., Connolly-Wilson, M., Weissman, S., Rubinstein, W. S., Sebold, C., Greenstein, R., Stroop, J., Yim, D., Panzini, B., Mckinnon, W., Greenblatt, M., Wirtzfeld, D., Fontaine, D., Coit, D., Yoon, S., Chung, D., Lauwers, G., Pizzuti, A., Vaccaro, C., Redal, M. A., Oliveira, C., Tischkowitz, M., Olschwang, S., Gallinger, S., Lynch, H., Green, J., Ford, J., Pharoah, P., Fernandez, B. and Huntsman, D. (2007): Founder and recurrent CDH1 mutations in families with hereditary diffuse gastric cancer. *JAMA*, 297, 2360-72.

Khatcheressian, J. L., Hurley, P., Bantug, E., Esserman, L. J., Grunfeld, E., Halberg, F., Hantel, A., Henry, N. L., Muss, H. B., Smith, T. J., Vogel, V. G., Wolff, A. C., Somerfield, M. R. and Davidson, N. E. (2013): Breast cancer follow-up and management after primary treatment: American Society of Clinical Oncology clinical practice guideline update. *J Clin Oncol*, 31, 961-5.

Khatcheressian, J. L., Wolff, A. C., Smith, T. J., Grunfeld, E., Muss, H. B., Vogel, V. G., Halberg, F., Somerfield, M. R. and Davidson, N. E. (2006): American Society of Clinical Oncology 2006 update of the breast cancer follow-up and management guidelines in the adjuvant setting. *J Clin Oncol*, 24, 5091-7.

King, M. C., Wieand, S., Hale, K., Lee, M., Walsh, T., Owens, K., Tait, J., Ford, L., Dunn, B. K., Costantino, J., Wickerham, L., Wolmark, N. and Fisher, B. (2001): Tamoxifen and breast cancer incidence among women with inherited mutations in BRCA1 and BRCA2: National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project (NSABP-P1) Breast Cancer Prevention Trial. *JAMA*, 286, 2251-6.

Kinzler, K. W. and Vogelstein, B. (1997): Cancer-susceptibility genes. Gatekeepers and caretakers. *Nature*, 386, 761, 763.

Kirova, Y. M., De Rycke, Y., Gambotti, L., Pierga, J. Y., Asselain, B., Fourquet, A. and Institut Curie Breast Cancer Study, G. (2008): Second malignancies after breast cancer: the impact of different treatment modalities. *Br J Cancer*, 98, 870-4.

Kirova, Y. M., Stoppa-Lyonnet, D., Savignoni, A., Sigal-Zafrani, B., Fabre, N. and Fourquet, A. (2005): Risk of breast cancer recurrence and contralateral breast cancer in relation to BRCA1 and BRCA2 mutation status following breast-conserving surgery and radiotherapy. *Eur J Cancer*, 41, 2304-11.

Kote-Jarai, Z., Salmon, A., Mengitsu, T., Copeland, M., Ardern-Jones, A., Locke, I., Shanley, S., Summersgill, B., Lu, Y. J., Shipley, J. and Eeles, R. (2006): Increased level of chromosomal damage after irradiation of lymphocytes from BRCA1 mutation carriers. *Br J Cancer*, 94, 308-10.

Kuo, L. J. and Yang, L. X. (2008): Gamma-H2AX - a novel biomarker for DNA double-strand breaks. *In Vivo*, 22, 305-9.

Kwei, K. A., Kung, Y., Salari, K., Holcomb, I. N. and Pollack, J. R. (2010): Genomic instability in breast cancer: pathogenesis and clinical implications. *Mol Oncol*, 4, 255-66.

Lafarge, S., Sylvain, V., Ferrara, M. and Bignon, Y. J. (2001): Inhibition of BRCA1 leads to increased chemoresistance to microtubule-interfering agents, an effect that involves the JNK pathway. *Oncogene*, 20, 6597-606.

Lahmann, P. H., Hoffmann, K., Allen, N., Van Gils, C. H., Khaw, K. T., Tehard, B., Berrino, F., Tjonneland, A., Bigaard, J., Olsen, A., Overvad, K., Clavel-Chapelon, F., Nagel, G., Boeing, H., Trichopoulos, D., Economou, G., Bellos, G., Palli, D., Tumino, R., Panico, S., Sacerdote, C., Krogh, V., Peeters, P. H., Bueno-De-Mesquita, H. B., Lund, E., Ardanaz, E., Amiano, P., Pera, G., Quiros, J. R., Martinez, C., Tormo, M. J., Wirfalt, E., Berglund, G., Hallmans, G., Key, T. J., Reeves, G., Bingham, S., Norat, T., Biessy, C., Kaaks, R. and Riboli, E. (2004): Body size and breast cancer risk: findings from the European Prospective Investigation into Cancer And Nutrition (EPIC). *Int J Cancer*, 111, 762-71.

Lecarpentier, J., Nogues, C., Mouret-Fourme, E., Stoppa-Lyonnet, D., Lasset, C., Caron, O., Fricker, J. P., Gladieff, L., Faivre, L., Sobol, H., Gesta, P., Frenay, M., Luporsi, E., Coupier, I., Lidereau, R. and Andrieu, N. (2011): Variation in breast cancer risk with mutation position, smoking, alcohol, and chest X-ray history, in the French National BRCA1/2 carrier cohort (GENEPSO). *Breast Cancer Res Treat*, 130, 927-38.

Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, D. K., AWMF): Interdisziplinäre S3-Leitlinie Für Die Diagnostik, Therapie Und Nachsorge Des Mammakarzinoms : Langversion 3.0, Aktualisierung 2012, AWMF-Register-Nummer: 032-0450l, [Http://Leitlinienprogramm-Onkologie.De/Leitlinien.7.0.Html](http://Leitlinienprogramm-Onkologie.De/Leitlinien.7.0.Html) (Stand: 21.10.2015).

Lichtenstein, P., Holm, N. V., Verkasalo, P. K., Iliadou, A., Kaprio, J., Koskenvuo, M., Pukkala, E., Skytthe, A. and Hemminki, K. (2000): Environmental and heritable factors in the causation of cancer--analyses of cohorts of twins from Sweden, Denmark, and Finland. *N Engl J Med*, 343, 78-85.

Loeb, L. A. (2001): A mutator phenotype in cancer. *Cancer Res*, 61, 3230-9.

Maser, R. S., Monsen, K. J., Nelms, B. E. and Petrini, J. H. (1997): hMre11 and hRad50 nuclear foci are induced during the normal cellular response to DNA double-strand breaks. *Mol Cell Biol*, 17, 6087-96.

Mavaddat, N., Rebbeck, T. R., Lakhani, S. R., Easton, D. F. and Antoniou, A. C. (2010): Incorporating tumour pathology information into breast cancer risk prediction algorithms. *Breast Cancer Res*, 12, R28.

Meindl, A., Hellebrand, H., Wiek, C., Erven, V., Wappenschmidt, B., Niederacher, D., Freund, M., Lichtner, P., Hartmann, L., Schaal, H., Ramser, J., Honisch, E., Kubisch, C., Wichmann, H. E., Kast, K., Deissler, H., Engel, C., Muller-Myhsok, B., Neveling, K., Kiechle, M., Mathew, C. G., Schindler, D., Schmutzler, R. K. and Hanenberg, H. (2010): Germline mutations in breast and ovarian cancer pedigrees establish RAD51C as a human cancer susceptibility gene. *Nat Genet*, 42, 410-4.

Meindl, A., Ramser, J., Hauke, J. and Hahnen, E. (2015): Genetik des familiären Brust- und Eierstockkrebses: Paneldiagnostik - Möglichkeiten und Grenzen. *medgen*, 27, 202-210.

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

Muller, W. U. and Streffer, C. (1991): Biological indicators for radiation damage. *Int J Radiat Biol*, 59, 863-73.

Nabon (2012): Breast Cancer. Dutch Guideline.

Narod, S. A., Lubinski, J., Ghadirian, P., Lynch, H. T., Moller, P., Foulkes, W. D., Rosen, B., Kim-Sing, C., Isaacs, C., Domcheck, S. and Sun, P. (2006): Screening mammography and risk of breast cancer in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: a case-control study. *The Lancet Oncology*, 7, 402-406.

Narod, S. A. and Offit, K. (2005): Prevention and management of hereditary breast cancer. *J Clin Oncol*, 23, 1656-63.

Nieuwenhuis, B., Van Assen-Bolt, A. J., Van Waarde-Verhagen, M. A., Sijmons, R. H., Van Der Hout, A. H., Bauch, T., Streffer, C. and Kampinga, H. H. (2002): BRCA1 and BRCA2 heterozygosity and repair of X-ray-induced DNA damage. *Int J Radiat Biol*, 78, 285-95.

O'donovan, P. J. and Livingston, D. M. (2010): BRCA1 and BRCA2: breast/ovarian cancer susceptibility gene products and participants in DNA double-strand break repair. *Carcinogenesis*, 31, 961-7.

Obe, G., Johannes, C. and Schulte-Frohlinde, D. (1992): DNA double-strand breaks induced by sparsely ionizing radiation and endonucleases as critical lesions for cell death, chromosomal aberrations, mutations and oncogenic transformation. *Mutagenesis*, 7, 3-12.

Obe, G., Pfeiffer, P., Savage, J. R. K., Johannes, C., Goedecke, W., Jeppesen, P., Natarajan, A. T., MartíNez-López, W., Folle, G. A. and Drets, M. E. (2002): Chromosomal aberrations: formation, identification and distribution. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 504, 17-36.

Pajic, J., Rakic, B., Rovcanin, B., Jovicic, D., Novakovic, I., Milovanovic, A. and Pajic, V. (2015): Inter-individual variability in the response of human peripheral blood lymphocytes to ionizing radiation: comparison of the dicentric and micronucleus assays. *Radiat Environ Biophys*.

Pierce, L. J., Phillips, K. A., Griffith, K. A., Buys, S., Gaffney, D. K., Moran, M. S., Haffty, B. G., Ben-David, M., Kaufman, B., Garber, J. E., Merajver, S. D., Balmana, J., Meirovitz, A. and Domchek, S. M. (2010): Local therapy in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers with operable breast cancer: comparison of breast conservation and mastectomy. *Breast Cancer Res Treat*, 121, 389-98.

Pijpe, A., Andrieu, N., Easton, D. F., Kesminiene, A., Cardis, E., Nogues, C., Gauthier-Villars, M., Lasset, C., Fricker, J. P., Peock, S., Frost, D., Evans, D. G., Eeles, R. A., Paterson, J., Manders, P., Van Asperen, C. J., Ausems, M. G., Meijers-Heijboer, H., Thierry-Chef, I., Hauptmann, M., Goldgar, D., Rookus, M. A., Van Leeuwen, F. E., Genepso, Embrace and Hebon (2012): Exposure to diagnostic radiation and risk of breast cancer among carriers of BRCA1/2 mutations: retrospective cohort study (GENE-RAD-RISK). *BMJ*, 345, e5660.

Pomp, J., Wike, J. L., Ouwkerk, I. J., Hoogstraten, C., Davelaar, J., Schrier, P. I., Leer, J. W., Thames, H. D. and Brock, W. A. (1996): Cell density dependent plating efficiency affects outcome and interpretation of colony forming assays. *Radiother Oncol*, 40, 121-5.

Powell, S. and Mcmillan, T. J. (1990): DNA damage and repair following treatment with ionizing radiation. *Radiother Oncol*, 19, 95-108.

Quinn, J. E., Kennedy, R. D., Mullan, P. B., Gilmore, P. M., Carty, M., Johnston, P. G. and Harkin, D. P. (2003): BRCA1 functions as a differential modulator of chemotherapy-induced apoptosis. *Cancer Res*, 63, 6221-8.

Reiser, M., Kuhn, F.-P. and Debus, J. (2011): *Duale Reihe Radiologie*, Stuttgart, Thieme Verlag.

Rhiem, K. and Schmutzler, R. K. (2014): [Risk-adapted surveillance: focus on familial breast and ovarian cancer]. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz*, 57, 307-11.

Ripperger, T., Gadzicki, D., Meindl, A. and Schlegelberger, B. (2009): Breast cancer susceptibility: current knowledge and implications for genetic counselling. *Eur J Hum Genet*, 17, 722-31.

Robert Koch-Institut 2013. *Krebs in Deutschland 2009/2010*. Berlin: Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e. V. (Hrsg).

Robson, M., Svahn, T., McCormick, B., Borgen, P., Hudis, C. A., Norton, L. and Offit, K. (2005): Appropriateness of breast-conserving treatment of breast carcinoma in women with germline mutations in BRCA1 or BRCA2: a clinic-based series. *Cancer*, 103, 44-51.

Rosen, E. M., Fan, S. and Isaacs, C. (2005): BRCA1 in hormonal carcinogenesis: basic and clinical research. *Endocr Relat Cancer*, 12, 533-48.

Sautter-Bihl, M.-L., Budach, W., Dunst, J., Feyer, P., Haase, W., Harms, W., Sedlmayer, F., Souchon, R., Wenz, F. and Sauer, R. (2007): *DEGRO Practical Guidelines for Radiotherapy of Breast Cancer I*. *Strahlentherapie und Onkologie*, 183, 661-666.

Scully, R. (2000): Role of BRCA gene dysfunction in breast and ovarian cancer predisposition. *Breast Cancer Res*, 2, 324-30.

Selzer, E. and Hebar, A. (2012): *Basic principles of molecular effects of irradiation*. *Wien Med Wochenschr*, 162, 47-54.

Seynaeve, C., Verhoog, L. C., Van De Bosch, L. M., Van Geel, A. N., Menke-Pluymers, M., Meijers-Heijboer, E. J., Van Den Ouweland, A. M., Wagner, A., Creutzberg, C. L., Niermeijer, M. F., Klijn, J. G. and Brekelmans, C. T. (2004): Ipsilateral breast tumour

recurrence in hereditary breast cancer following breast-conserving therapy. *Eur J Cancer*, 40, 1150-8.

Shields, P. G. and Harris, C. C. (2000): Cancer risk and low-penetrance susceptibility genes in gene-environment interactions. *J Clin Oncol*, 18, 2309-15.

Stacey, S. N., Manolescu, A., Sulem, P., Rafnar, T., Gudmundsson, J., Gudjonsson, S. A., Masson, G., Jakobsdottir, M., Thorlacius, S., Helgason, A., Aben, K. K., Strobbe, L. J., Albers-Akkers, M. T., Swinkels, D. W., Henderson, B. E., Kolonel, L. N., Le Marchand, L., Millastre, E., Andres, R., Godino, J., Garcia-Prats, M. D., Polo, E., Tres, A., Mouy, M., Saemundsdottir, J., Backman, V. M., Gudmundsson, L., Kristjansson, K., Bergthorsson, J. T., Kostic, J., Frigge, M. L., Geller, F., Gudbjartsson, D., Sigurdsson, H., Jonsdottir, T., Hrafkelsson, J., Johannsson, J., Sveinsson, T., Myrdal, G., Grimsson, H. N., Jonsson, T., Von Holst, S., Werelius, B., Margolin, S., Lindblom, A., Mayordomo, J. I., Haiman, C. A., Kiemeny, L. A., Johannsson, O. T., Gulcher, J. R., Thorsteinsdottir, U., Kong, A. and Stefansson, K. (2007): Common variants on chromosomes 2q35 and 16q12 confer susceptibility to estrogen receptor-positive breast cancer. *Nat Genet*, 39, 865-9.

Steel, G. G., Mcmillan, T. J. and Peacock, J. H. (1989): The 5Rs of radiobiology. *Int J Radiat Biol*, 56, 1045-8.

Strachan, T. and Read, A. P. (2005): *Molekulare Humangenetik*, Elsevier/Spektrum-Verlag.

Subramaniam, D. S. and Isaacs, C. (2005): Utilizing prognostic and predictive factors in breast cancer. *Curr Treat Options Oncol*, 6, 147-59.

Sy, S. M., Huen, M. S. and Chen, J. (2009): PALB2 is an integral component of the BRCA complex required for homologous recombination repair. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106, 7155-60.

Szeles, A., Joussineau, S., Lewensohn, R., Lagercrantz, S. and Larsson, C. (2006): Evaluation of spectral karyotyping (SKY) in biodosimetry for the triage situation following gamma irradiation. *Int J Radiat Biol*, 82, 87-96.

Tavtigian, S. V., Samollow, P. B., De Silva, D. and Thomas, A. (2006): An analysis of unclassified missense substitutions in human BRCA1. *Fam Cancer*, 5, 77-88.

Thompson, D., Easton, D. F. and Goldgar, D. E. (2003): A full-likelihood method for the evaluation of causality of sequence variants from family data. *Am J Hum Genet*, 73, 652-5.

Tukey, J. W. (1977): *Exploratory data analysis*, Reading, Mass, Addison-Wesley.

Turnbull, C., Ahmed, S., Morrison, J., Pernet, D., Renwick, A., Maranian, M., Seal, S., Ghousaini, M., Hines, S., Healey, C. S., Hughes, D., Warren-Perry, M., Tapper, W., Eccles, D., Evans, D. G., Hooning, M., Schutte, M., Van Den Ouweland, A., Houlston, R., Ross, G., Langford, C., Pharoah, P. D., Stratton, M. R., Dunning, A. M., Rahman, N. and Easton, D. F. (2010): Genome-wide association study identifies five new breast cancer susceptibility loci. *Nat Genet*, 42, 504-7.

Turnbull, C., Mirugaesu, N. and Eeles, R. (2006): Radiotherapy and genetic predisposition to breast cancer. *Clin Oncol (R Coll Radiol)*, 18, 257-67.

Turnbull, C. and Rahman, N. (2008): Genetic predisposition to breast cancer: past, present, and future. *Annu Rev Genomics Hum Genet*, 9, 321-45.

Walsh, T. and King, M. C. (2007): Ten genes for inherited breast cancer. *Cancer Cell*, 11, 103-5.

Walsh, T., Lee, M. K., Casadei, S., Thornton, A. M., Stray, S. M., Pennil, C., Nord, A. S., Mandell, J. B., Swisher, E. M. and King, M. C. (2010): Detection of inherited mutations for breast and ovarian cancer using genomic capture and massively parallel sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107, 12629-33.

WHO (2003): World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of the Breast and Female Genital Organs, Lyon, IARC Press.

Young, S. R., Pilarski, R. T., Donenberg, T., Shapiro, C., Hammond, L. S., Miller, J., Brooks, K. A., Cohen, S., Tenenholz, B., Desai, D., Zandvakili, I., Royer, R., Li, S. and Narod, S. A. (2009): The prevalence of BRCA1 mutations among young women with triple-negative breast cancer. *BMC Cancer*, 9, 86.

Zhang, F., Ma, J., Wu, J., Ye, L., Cai, H., Xia, B. and Yu, X. (2009): PALB2 links BRCA1 and BRCA2 in the DNA-damage response. *Curr Biol*, 19, 524-9.

7. Anhang

MEDIZINISCHE FAKULTÄT
DER CHRISTIAN-ALBRECHTS-UNIVERSITÄT ZU KIEL

ETHIK-KOMMISSION



Universitäts-Kinderklinik - Schwannenweg 20 - 24105 Kiel

Herrn Prof. Dr. R. Siebert
Frau Dr. S. Heidemann
Herrn Prof. Dr. N. Arnold
Institut für Humangenetik
Schwanenweg 24
24105 Kiel

Weiterleiten an:	
Eing.: 20 NOV. 2008	Telefon 04 31 / 597-18 09
Erledigt:	Telefax 04 31 / 597-18 31
Ablage:	Datum 19.11.2008

AZ.: A 151/08 (bitte stets angeben)
Studienplan: **Etablierung eines BRCA-Funktionstestes zur Beurteilung von unklaren BRCA-Sequenzvariationen durch Bestimmung der Strahlensensibilität von BRCA-Mutationsträgerinnen**
Studienplan; Informationsblätter, Einverständniserklärungen und Einverständniserklärungen - korrigierte Versionen mit Schreiben vom 17.10.08

Antragsteller: Prof. Dr. R. Siebert, Dr. S. Heidemann, Institut für Humangenetik, UKSH, Campus Kiel
Prof. Dr. N. Arnold, Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe, UKSH, Campus Kiel

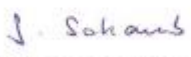
Datum des Erstantrages: 26.06.2008
Datum des überarb. Antrages: 17.10.2008 (Eingang 19.11.2008)

Votum

Die Ethik-Kommission der Medizinischen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel hat die zu dem oben bezeichneten Versuchsplan eingereichten Unterlagen auf mögliche berufsethische und berufsrechtliche Bedenken hin überprüft. Die Kommission stimmt darin überein, daß gegen die Durchführung der Studie nunmehr keine Bedenken bestehen.

Es wird darauf hingewiesen, daß künftig eventuell für zweckmäßig und notwendig erachtete Änderungen und Erweiterungen des Versuchsplanes der Ethik-Kommission anzuzeigen sind und gegebenenfalls eine erneute Beratung erforderlich machen.

Nach Abschluß der Studie erbittet die Kommission einen kurzen Bericht mit einem Hinweis, ob im Laufe der Studie ethische oder juristische Probleme aufgetreten sind.


Prof. Dr. med. Jürgen Schaub
Vorsitzender der Ethik-Kommission


Dr. med. Christine Glinicke
Geschäftsführung der Ethik-Kommission

Nachfolgend sind die Mitglieder der Ethik-Kommission aufgeführt, die diese Studie im Umlaufverfahren beurteilt haben:

Prof. Dr. med. J. Schaub (Pädiatrie)
Vorsitzender der Ethik-Kommission

Prof. Dr. med. H.M. Mehdorn (Neurochirurgie)
Stellv. Vorsitzender der Ethik-Kommission

Frau Prof. Dr. med. R. Fölster-Holst (Dermatologie)

Frau Prof. Dr. med. G. Simon-Herrmann (Innere Medizin und Kardiologie)

Prof. Dr. med. Dr. jur. H.-J. Kaatsch (Rechtsmedizin)

Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. B. Kimmig (Strahlentherapie)

Prof. Dr. med. H. Mönig (Innere Medizin)

Frau E. Mosch-Brockstedt (Pastorin i.R.)

Priv.-Doz. Dr. med. D. Proppe (Innere Medizin und Klinische Pharmakologie)

Tabelle 12: Rohdaten der unbestrahten Lymphozytenkulturen in der Kontrollgruppe

Kontrolle	unbestrahlt										
Fallnr.	Anzahl ausgewertete Metaphasen	aze	azentrische / aberrante Metaphase	diz	dizentrische / aberrante Metaphase	num	numerische / aberrante Metaphase	Anzahl Aberrationen	aberrante Metaphasen	% aberrante Metaphase	Aberrationen / aberrante Metaphase
22	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø
23	25	0	0,00	0	0,00	1	1,00	1	1	4,00	1,00
24	25	9	1,00	2	0,22	2	0,22	13	9	26,00	1,44
25	25	2	0,40	1	0,20	2	0,40	5	5	20,00	1,00
26	25	1	0,20	1	0,20	4	0,80	6	5	20,00	1,20
27	25	6	0,75	0	0,00	3	0,38	9	8	32,00	1,13
28	25,00	0	0,00	1	0,33	2	0,67	3	3	12,00	1,00
29	25,00	1	0,50	0	0,00	1	0,50	2	2	8,00	1,00
30	25,00	1	0,33	2	0,67	0	0,00	3	3	12,00	1,00

Fallnr.: Fallnummer, aze: azentrische Fragmente, diz: dizentrische Chromosomen, num: numerische Aberrationen, ø: nicht auswertbar.

Tabelle 13: Rohdaten der mammographierten Lymphozytenkulturen in der Kontrollgruppe

Kontrolle	Mammographie										
Fallnr.	Anzahl ausgewertete Metaphasen	aze	azentrische / aberrante Metaphase	diz	dizentrische / aberrante Metaphase	num	numerische / aberrante Metaphase	Anzahl Aberrationen	aberrante Metaphasen	% aberrante Metaphase	Aberrationen / aberrante Metaphase
22	25	1	0,25	3	0,75	0	0,00	4	4	16,00	1,00
23	25	5	0,63	3	0,38	1	0,13	9	8	32,00	1,13
24	25	2	0,67	0	0,00	2	0,67	4	3	12,00	1,33
25	25	2	0,40	1	0,20	3	0,60	6	5	20,00	1,20
26	25	4	1,33	0	0,00	3	1,00	7	3	12,00	2,33
27	25	5	0,71	0	0,00	3	0,43	8	7	28,00	1,14
28	25	2	0,50	2	0,50	0	0,00	4	4	16,00	1,00
29	25	2	0,67	0	0,00	2	0,67	4	3	12,00	1,33
30	25	0	0,00	1	1,00	0	0,00	1	1	4,00	1,00

Fallnr.: Fallnummer, aze: azentrische Fragmente, diz: dizentrische Chromosomen, num: numerische Aberrationen, ø: nicht auswertbar.

Tabelle 14: Rohdaten der mit 4 Gy Kobalt 60 bestrahlten Lymphozytenkulturen in der Kontrollgruppe

Kontrolle	Bestrahlung mit 4 Gy Kobalt 60										
Fallnr.	Anzahl ausgewertete Metaphasen	aze	azentrische / aberrante Metaphase	diz	dizentrische / aberrante Metaphase	num	numerische / aberrante Metaphase	Anzahl Aberrationen	aberrante Metaphasen	% aberrante Metaphase	Aberrationen / aberrante Metaphase
22	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅
23	24	49	3,50	3	0,21	12	0,86	64	14	58,33	4,57
24	25	15	1,25	3	0,25	3	0,25	21	12	48,00	1,75
25	25	38	2,53	2	0,13	5	0,33	45	15	60,00	3,00
26	25	23	1,77	1	0,08	2	0,15	26	13	52,00	2,00
27	25	27	1,69	6	0,38	1	0,06	34	16	64,00	2,13
28	25	46	2,56	7	0,39	12	0,67	65	18	72,00	3,61
29	25	8	0,73	4	0,36	4	0,36	16	11	44,00	1,45
30	24	25	1,92	1	0,08	2	0,15	28	13	61,90	2,15

Fallnr.: Fallnummer, aze: azentrische Fragmente, diz: dizentrische Chromosomen, num: numerische Aberrationen, ∅: nicht auswertbar.

Tabelle 15: Rohdaten der unbestrahlten Lymphozytenkulturen der gesunden *BRCA1*-Mutationsträgerinnen

Ges. <i>BRCA1</i> - Mutations- trägerinnen	unbestrahlt											
	Fallnr.	Anzahl ausgewertete Metaphasen	aze	azentrische / aberrante Metaphase	diz	dizentrische / aberrante Metaphase	num	numerische / aberrante Metaphase	Anzahl Aberrationen	aberrante Metaphasen	% aberrante Metaphase	Aberrationen / aberrante Metaphase
	1	25	4	1,00	0	0,00	0	0,00	4	4	16,00	1,00
	2	25	4	0,80	0	0,00	1	0,20	5	5	20,00	1,00
	3	25	0	0,00	0	0,00	5	2,50	5	2	8,00	2,50
	4	25	1	0,25	2	0,50	1	0,25	4	4	16,00	1,00
	5	25	4	1,00	1	0,25	1	0,25	6	4	16,00	1,50
	6	25	6	1,20	0	0,00	0	0,00	6	5	20,00	1,20
	7	25	1	0,14	0	0,00	7	1,00	8	7	28,00	1,14
	8	25	0	0,00	2	0,67	1	0,33	3	3	12,00	1,00
	9	25	1	0,50	0	0,00	1	0,50	2	2	8,00	1,00
	10	25	0	0,00	4	1,00	1	0,25	5	4	16,00	1,25

Fallnr.: Fallnummer, aze: azentrische Fragmente, diz: dizentrische Chromosomen, num: numerische Aberrationen, ø: nicht auswertbar.

Tabelle 16: Rohdaten der mammographierten Lymphozytenkulturen der gesunden *BRCA1*-Mutationsträgerinnen

74

Ges. <i>BRCA1</i> - Mutations- trägerinnen	Mammographie											
	Fallnr.	Anzahl ausgewertete Metaphasen	aze	azentrische / aberrante Metaphase	diz	dizentrische / aberrante Metaphase	num	numerische / aberrante Metaphase	Anzahl Aberrationen	aberrante Metaphasen	% aberrante Metaphase	Aberrationen / aberrante Metaphase
	1	25	0	∅	0	∅	0	∅	0	0	0,00	∅
	2	25	3	0,50	0	0,00	6	1,00	9	6	24,00	1,50
	3	25	2	0,50	1	0,25	1	0,25	4	4	16,00	1,00
	4	25	0	0,00	4	1,33	0	0,00	4	3	12,00	1,33
	5	8	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅
	6	25	4	0,67	3	0,50	1	0,17	8	6	24,00	1,33
	7	25	4	0,67	0	0,00	2	0,33	6	6	24,00	1,00
	8	25	9	0,75	6	0,50	3	0,25	18	12	48,00	1,50
	9	25	0		0		0		0	0	0,00	∅
	10	25	5	0,50	5	0,50	1	0,10	11	10	40,00	1,10

Fallnr.: Fallnummer, aze: azentrische Fragmente, diz: dizentrische Chromosomen, num: numerische Aberrationen, ∅: nicht auswertbar.

Tabelle 17: Rohdaten der mit 4 Gy Kobalt 60 bestrahlten Lymphozytenkulturen der gesunden *BRCA1*-Mutationsträgerinnen

Ges. <i>BRCA1</i> - Mutations- trägerinnen	Bestrahlung mit 4 Gy Kobalt 60											
	Fallnr.	Anzahl ausgewertete Metaphasen	aze	azentrische / aberrante Metaphase	diz	dizentrische / aberrante Metaphase	num	numerische / aberrante Metaphase	Anzahl Aberrationen	aberrante Metaphasen	% aberrante Metaphase	Aberrationen / aberrante Metaphase
75	1	25	61	2,77	2	0,09	16	0,73	79	22	88,00	3,59
	2	25	63	2,74	8	0,35	19	0,83	90	23	92,00	3,91
	3	25	55	2,89	8	0,42	15	0,79	78	19	76,00	4,11
	4	25	40	2,67	4	0,27	3	0,20	47	15	60,00	3,13
	5	25	35	2,19	9	0,56	11	0,69	55	16	64,00	3,44
	6	25	63	3,50	10	0,56	2	0,11	75	18	72,00	4,17
	7	25	43	2,69	6	0,38	2	0,13	51	16	64,00	3,19
	8	25	86	3,91	20	0,91	13	0,59	119	22	88,00	5,41
	9	25	33	1,57	18	0,86	5	0,24	56	21	84,00	2,67
	10	25	38	2,71	11	0,79	2	0,14	51	14	56,00	3,64

Fallnr.: Fallnummer, aze: azentrische Fragmente, diz: dizentrische Chromosomen, num: numerische Aberrationen, ø: nicht auswertbar.

Tabelle 18: Rohdaten der unbestrahlten Lymphozytenkulturen der erkrankten *BRCA1*-Mutationsträgerinnen

Erkr. <i>BRCA1</i> - Mutations- trägerinnen	unbestrahlt											
	Fallnr.	Anzahl ausgewertete Metaphasen	aze	azentrische / aberrante Metaphase	diz	dizentrische / aberrante Metaphase	num	numerische / aberrante Metaphase	Anzahl Aberrationen	aberrante Metaphasen	% aberrante Metaphase	Aberrationen / aberrante Metaphase
	11	25	2	0,50	0	0,00	2	0,50	4	4	16,00	1,00
	12	25	2	0,67	1	0,33	0	0,00	3	3	12,00	1,00
	13	25	0	0,00	4	1,33	0	0,00	4	3	12,00	1,33
	14	25	1	0,33	0	0,00	2	0,67	3	3	12,00	1,00
	15	25	0	0,00	2	0,67	1	0,33	3	3	12,00	1,00
	16	25	0	∅	0	∅	0	∅	0	0	0,00	∅
	17	25	1	0,17	1	0,17	4	0,67	6	6	24,00	1,00
	18	25	4	2,00	0	0,00	5	2,50	9	2	8,00	4,50
	19	25	1	1,00	0	0,00	0	0,00	1	1	4,00	1,00
	20	25	0	0,00	3	0,60	2	0,40	5	5	20,00	1,00
	21	25	0	0,00	0	0,00	11	2,75	11	4	16,00	2,75

Fallnr.: Fallnummer, aze: azentrische Fragmente, diz: dizentrische Chromosomen, num: numerische Aberrationen, ∅: nicht auswertbar.

Tabelle 19: Rohdaten der mammographierten Lymphozytenkulturen der erkrankten *BRCA1*-Mutationsträgerinnen

Erkr. <i>BRCA1</i> - Mutations- trägerinnen	Mammographie										
Fallnr.	Anzahl ausgewertete Metaphasen	aze	azentrische / aberrante Metaphase	diz	dizentrische / aberrante Metaphase	num	numerische / aberrante Metaphase	Anzahl Aberrationen	aberrante Metaphasen	% aberrante Metaphase	Aberrationen / aberrante Metaphase
11	25	1	0,25	3	0,75	0	0,00	4	4	16,00	1,00
12	25	5	0,63	3	0,38	1	0,13	9	8	32,00	1,13
13	25	2	0,67	0	0,00	2	0,67	4	3	12,00	1,33
14	25	2	0,40	1	0,20	3	0,60	6	5	20,00	1,20
15	25	4	1,33	0	0,00	3	1,00	7	3	12,00	2,33
16	25	5	0,71	0	0,00	3	0,43	8	7	28,00	1,14
17	25	2	0,50	2	0,50	0	0,00	4	4	16,00	1,00
18	25	2	0,67	0	0,00	2	0,67	4	3	12,00	1,33
19	25	0	0,00	1	1,00	0	0,00	1	1	4,00	1,00
20	25	3	1,00	1	0,33	0	0,00	4	3	12,00	1,33
21	25	1	0,33	2	0,67	1	0,33	4	3	12,00	1,33

Fallnr.: Fallnummer, aze: azentrische Fragmente, diz: dizentrische Chromosomen, num: numerische Aberrationen, ø: nicht auswertbar.

Tabelle 20: Rohdaten der mit 4 Gy Kobalt 60 bestrahlten Lymphozytenkulturen der erkrankten *BRCA1*-Mutationsträgerinnen

Erkr. <i>BRCA1</i> - Mutations- trägerinnen	Bestrahlung mit 4 Gy Kobalt 60										
Fallnr.	Anzahl ausgewertete Metaphasen	aze	azentrische / aberrante Metaphase	diz	dizentrische / aberrante Metaphase	num	numerische / aberrante Metaphase	Anzahl Aberrationen	aberrante Metaphasen	% aberrante Metaphase	Aberrationen / aberrante Metaphase
11	25	64	3,37	12	0,63	2	0,11	78	19	76,00	4,11
12	23	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅
13	25	44	2,10	9	0,43	0	0,00	53	21	84,00	2,52
14	25	53	3,53	5	0,33	2	0,13	60	15	60,00	4,00
15	25	78	4,33	11	0,61	1	0,06	90	18	72,00	5,00
16	25	62	3,26	23	1,21	10	0,53	95	19	76,00	5,00
17	25	58	2,90	15	0,75	1	0,05	74	20	80,00	3,70
18	25	55	3,67	13	0,87	0	0,00	68	15	60,00	4,53
19	22	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅
20	25	43	2,15	8	0,40	0	0,00	51	20	80,00	2,55
21	25	66	3,14	27	1,29	4	0,19	97	21	84,00	4,62

Fallnr.: Fallnummer, aze: azentrische Fragmente, diz: dizentrische Chromosomen, num: numerische Aberrationen, ∅: nicht auswertbar.

8. Danksagung

Hiermit möchte ich Prof. Dr. med. Siebert für die Annahme als Doktorandin am Institut für Humangenetik des Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel und die Möglichkeit zur Nutzung der Räumlichkeiten und Geräte danken. Besonders bedanke ich mich bei ihm für die schnelle und konstruktive Kritik an meinem Abstract sowie an der Dissertationsschrift.

Des Weiteren möchte ich Frau Dr. rer. nat. Heidemann für die Bereitstellung des Themas sowie die vielen hilfreichen Tipps und Korrekturen danken.

Frau Wilhelms möchte ich besonders für deren Hilfe bei der Hybridisierung der Lymphozytenkulturen und für die Hybridisierung der restlichen Proben danken.

Bei Frau Dr. rer. nat. Gutwein möchte ich mich für die Überprüfung der Auswertung und hilfreiche Diskussionen bedanken.

Für die Ausarbeitung der Lymphozytenkulturen möchte ich besonders Frau Sieprath danken und wünsche ihr für ihre weitere Dissertation viel Erfolg.

Dipl. math. Vollrath und Dr. rer. nat. Szymczak möchte ich für die Anleitung und Unterstützung bei der statistischen Auswertung danken.

Prof. Dr. rer. nat. Arnold und Dr. rer. nat. Weimar danke ich für die geduldige Beantwortung aller Fragen sowie die Bereitstellung des Sondengemisches.

Prof. Dr. med. Niehaus, PD rer. nat. Siebert und Prof. Dr. med. Schreer danke ich für die Bestrahlung und Mammographie der Lymphozytenkulturen sowie für konstruktive Kritik an meinem Abstract.

Meinem Freund Matti danke ich dafür, dass er auch in schwierigen Zeiten immer für mich da war und mich so gut es ging unterstützt hat.

Zuletzt danke ich meinen Eltern für die Möglichkeit, Medizin studieren zu können, für die vielen aufbauenden Worte während des Studiums und der Zeit der Dissertation. Ich danke ihnen für ihre unendliche Geduld, aber auch für ihre Ehrlichkeit.

9. Lebenslauf und Veröffentlichungen

Persönliche Daten:

Name: Katharina Elisabeth Schau
Geburtsdatum: 19.11.1987
Geburtsort: Hamburg
Anschrift: Adalbertstraße 35, 24106 Kiel
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: deutsch

Beruflicher Werdegang:

seit 01.11.2014: Weiterbildung im Fachbereich Innere Medizin, Städtisches Krankenhaus Kiel

Studium der Humanmedizin:

07.05.2014: Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung
25.02.2013 - 26.01.2014: Praktisches Jahr:
UKSH Campus Kiel: Radiologie, Nuklearmedizin,
Strahlentherapie,
Winterthur, Schweiz: Chirurgie
Städtisches Krankenhaus Kiel: Innere Medizin
Wintersemester 2012/2013: Auslandssemester Universität Gent
19.08.09: Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung
Ab Wintersemester 2007/08: Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Schulbildung:

18.06.07: Allgemeine Hochschulreife
1998-2007: Humboldt-Schule Kiel

1994-1998: Grundschule Russee

Promotion:

ab 11/2010: Institut für Humangenetik, UKSH, Campus Kiel
„Molekularzytogenetische Analyse strahleninduzierter Chromosomenveränderungen mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung mit einer All-Human-Centromer-Probe bei Trägerinnen einer pathogenen *BRCA1*-Mutation“

Hilfswissenschaftliche Tätigkeiten neben dem Studium:

2010-2014: Studentische Hilfskraft im Haus der Lehre, CAU Kiel
Tutorin im Skills Lab sowie beim Kurs „Einführung in die klinische Medizin“

Teile der Arbeit wurden veröffentlicht:

Schau K., Gutwein J., Sieprath S., Nagel I., Wilhelms C., Arnold N., Weimer J., Siebert FA, Niehoff P., Grunewald R., Schreer I., Jonat W., Vollrath O., Siebert R., Heidemann S. (2015): Is the radiosensitivity of *BRCA1* mutation carriers increased? medgen, 27, 120.