

Britta Tews

Dr. med.

## **Der Einfluss von DNA-Schädigung auf die Checkpoint-Funktion von CHK1 am Centrosom**

Promotionsfach: Innere Medizin

Doktorvater: Prof. Dr. med. Alwin Krämer

Der Entstehung von Krebs liegt ein mehrstufiger Prozess zu Grunde, bei dem es zu Veränderungen des Genoms der betreffenden Zelle kommt. Ein wesentlicher Mechanismus liegt hierbei in der Deregulation von Genen, die das Zellwachstum und die Zellteilung regulieren. Den Zellzykluskontrollgenen, die bei Vorliegen eines DNA-Schadens diesen detektieren und den Zellzyklus arretieren, kommt hierbei eine zentrale Rolle zu. Sie initiieren die Reparatur der geschädigten DNA bzw. induzieren die Apoptose der betroffenen Zelle, falls eine Reparatur nicht mehr möglich ist. Durch Interaktion mit geschädigter DNA werden die Kinasen ATM und ATR aktiviert und setzen die nachfolgende Signaltransduktionskaskade als Antwort auf die DNA-Schädigung in Gang. Ein wesentliches Zielprotein von ATR und zum Teil auch von ATM ist die Serin/Threonin-Proteinkinase CHK1. Diese Kinase phosphoryliert während ungestörter Zellzyklen die Phosphatase CDC25, welche schließlich CDK1 im Komplex mit Cyclin B dephosphoryliert, damit die Zelle in die Mitose eintreten kann. Im Falle eines DNA-Schadens durch genotoxische Noxen, wie etwa radioaktive Gammastrahlung oder UV-Strahlung kommt es hingegen zu einem CHK1-vermittelten Zellzyklusarrest. Es ist allerdings noch nicht vollständig geklärt, welchen Einfluss hierbei Lokalisation, Kinasefunktion und Expressionshöhe von CHK1 haben. Ein besonderes Merkmal, das vielen Tumoren gemeinsam ist, ist das Vorliegen chromosomaler Instabilität. Darunter ist eine erhöhte Rate numerischer Chromosomen-Fehlverteilungen während der Mitose zu verstehen, die zu Aneuploidie führt. Es wird diskutiert, dass dies mit Selektionsvorteilen der malignen Zellen in der Tumorevolution einhergehen könnte. Die genauen Mechanismen sind bisher noch nicht geklärt, es scheint jedoch ein Zusammenhang mit dem Vorliegen multipler Centrosomen und daraus hervorgehenden multipolaren Mitosespindeln vorzuliegen.

In dieser Arbeit wurde der Einfluss von DNA-Schädigung auf die Zellzykluskontrollpunkt-Funktion von CHK1 untersucht. Zudem wurden die Konsequenzen einer ATM/ATR-

Blockade bzw. CHK1-Depletion im Bezug auf die längerfristigen Änderungen der genomweiten Genexpression nach DNA-Schädigung der Zelle mittels *Microarrays* untersucht.

Die Untersuchungen der Spindelpolarität von U2OS-Zellen zeigen, dass die Expressionsmenge von CHK1 mit der Anzahl multipolarer Spindeln positiv korreliert. Dieser Effekt hängt direkt mit der Kinasefunktion von CHK1 zusammen, da die überexprimierte kinase-tote Variante eine geringere Anzahl multipolarer Spindeln induziert wie Wildtyp-U2OS-Zellen. Eine Inhibition von CHK1 führt in Tumorzellen zu einer Normalisierung der Spindelpolarität, wohingegen sie bei nicht malignen Zellen in einer leicht aberranten Spindelpolarität resultiert. Dieser Effekt unterstreicht die Rolle von CHK1 als Tumorsuppressor.

Eine Überexpression von centrosomal gebundenem CHK1 in U2OS-Zellen hat einen G2/M-Arrest zur Folge; unabhängig davon, ob ein zusätzlicher exogener DNA-Schaden gesetzt wird. Dies lässt darauf schließen, dass CHK1 eine Schlüsselfunktion in der Kontrolle des G2/M-Überganges einnimmt. Es wurde bereits gezeigt, dass die Induktion einer Centrosomenamplifikation durch einen DNA-Schaden von CHK1 abhängig ist. In dieser Arbeit konnte bestätigt werden, dass eine centrosomale Anreicherung von CHK1 und Centrosomenamplifikation konzertiert als Antwort auf einen DNA-Schaden erfolgt. Das Ausmaß der centrosomalen Anreicherung von CHK1 korreliert mit jenem der Centrosomenamplifikation. Centrosomal gebundenes CHK1 induziert eine Amplifikation der Centrosomen; dies sogar in Abwesenheit eines exogenen DNA-Schadens, was zeigt, dass die Rekrutierung von CHK1 an das Centrosom für die G2/M-Antwort nach DNA-Schädigung kritisch ist.

Mittels *Microarray*-Experimenten wurden die längerfristigen Effekte einer DNA-Schädigung kombiniert mit Inhibition der Zellzyklusproteine ATM, ATR und CHK1 auf globale Genexpressionsänderungen hin untersucht. Eine ATM/ATR-Blockade mittels Coffein nach einer DNA-Schädigung resultiert 24 h später im Vergleich zu einer DNA-Schädigung ohne ATM/ATR-Blockade in einer Genexpressionserhöhung des p53-Verstärkers *Cyclin-dependent kinase 2a interacting protein (CDKN2AIP)* sowie des proapoptotisch wirkenden *B-cell lymphoma 2 like 11 (BCL2L11)*. Ein Wegfall von ATM/ATR führt demnach zu einer Verstärkung der p53- sowie in einer proapoptotischen Antwort.

Eine siRNA-vermittelte CHK1-Depletion hat 24 h nach DNA-Schaden im Vergleich zu 24 h nach DNA-Schaden ohne eine solche Depletion zur Folge, dass das Transkriptlevel von *Denticleless (DTL)* herunterreguliert wird. Es konnte durch einige Arbeitsgruppen bereits

gezeigt werden, dass DTL, analog zu CHK1, wesentlich am frühen G2/M-Checkpoint beteiligt und essentiell für den Übergang von der G2- zur Mitose-Phase ist. 48 h nach DNA-Schädigung ist eine verminderte Expression des G2/M-Zellzykluskontroll- und Reparaturproteins *RAD50-interacting protein (RINT1)* nach *CHK1-knockdown* zu beobachten. Neben RINT1 wiesen auch *B lymphoma Mo-MLV insertion region 1 homolog (BMI1)* *polycomb ringfinger oncogene* und *X-ray radiation resistance associated 1 (XRR1)* nach *CHK1-knockdown* bei DNA-Schädigung verminderte Genexpressionslevel auf. Es konnte bereits gezeigt werden, dass ein Verlust von BMI1 zu einer erhöhten Radiosensitivität sowie einer verminderten Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen führt und BMI1 die Tumorsuppressoren p16(INK4A) und p14(ARF) hemmt. Die Herunterregulation von *XRR1* nach *CHK1-Depletion* könnte ebenfalls mit einer Radiosensitivierung der Zellen einhergehen. Eine Inhibition des *CHK1-Signaltransduktionsweges* in Tumoren ist demnach ein vielversprechender therapeutischer Ansatz, dessen Erfolg allerdings vom individuellen genetischen Profil eines Patienten abhängen könnte, da die Inhibition von *CHK1* eine *Deregulation* anderer wesentlicher *Signaltransduktionskaskaden* nach sich zieht.