

Aus der Forschungsgruppe  
Klinische und Molekulare Onkologie,  
Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin Berlin-Buch

**DISSERTATION**

**Mutationsanalyse der Zellzyklus-Kontrollpunktkinase Chk2 in  
humanen Tumorzelllinien: Bedeutung für Tumorgenese, -Biologie und  
Therapieresistenz**

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité - Universitätsmedizin Berlin

**von**  
**Robert Bindermann**  
**aus Dresden**

Gutachter/in: 1. Prof. Dr. med. P. T. Daniel  
2. Priv.-Doz. Dr. F. Eßmann  
3. Prof. Dr. med. H. Bantel

Datum der Promotion: 01.02.2013

# Inhalt

<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>1 GRUNDLAGEN .....</b>	<b>3</b>
1.1 DER ZELLYKLUS .....	3
1.2 ZELLTOD DURCH APOPTOSE .....	8
1.2.1 Die Caspasen .....	9
1.2.2 Der intrinsische Signalweg .....	9
1.2.3 Der extrinsische Signalweg .....	13
1.3 DAS TUMORSUPPRESSORGEN P53 .....	14
<b>2 EINLEITUNG .....</b>	<b>17</b>
2.1 MALIGNOME ALS ERKRANKUNG DER ERBINFORMATION.....	17
2.2 DIE ZELLULÄRE ANTWORT AUF DNA-SCHÄDIGUNG .....	26
2.2.1 Schadenkontrollpunkte organisieren die DNA-Schadenantwort .....	26
2.2.2 Komponenten der Schadenkontrollpunkte .....	29
2.2.3 Drei DNA-Schadenkontrollpunkte im Zellzyklus .....	34
2.2.4 Relevanz von Chk2 und Chk1 für die Kontrollpunktfunktion .....	39
2.2.5 Chk2 und Seneszenz.....	39
2.2.6 Chk2 und DNA-Reparatur.....	42
2.2.7 Chk2 und Zelltod durch Apoptose oder Mitotische Katastrophe .....	42
2.3 DIE MOLEKULARE STRUKTUR UND AKTIVIERUNG VON CHK2.....	44
2.4 CHK2 IN NIEDEREN ORGANISMEN .....	47
2.5 DEFEKTE IM ATM-CHK2-SIGNALWEG IN HUMANEN TUMOREN .....	48
2.5.1 Atm-Keimbahnmutationen verursachen Ataxia-Telangiectasia und erhöhen leicht das Brustkrebsrisiko.....	48
2.5.2 Atm-Mutationen bei sporadischen Tumoren.....	48
2.5.3 Viele Chk2-Effektoren sind tumorkritische Gene .....	49
2.5.4 Kongenitale Chk2-Varianten: Bedeutung für Li-Fraumeni-Syndrom, Mammakarzinom und weitere Tumorarten.....	49
2.5.5 Chk2-Mutationen bei sporadischen Tumoren.....	50
2.5.6 Chk1-Defekte in Tumoren.....	50
<b>3 FRAGESTELLUNG .....</b>	<b>51</b>
<b>4 MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>52</b>
4.1 ÜBERBLICK .....	52
4.2 ANALYSIERTE TUMORZELLINIEN.....	53
4.3 METHODEN .....	56
4.3.1 Extraktion der genomischen DNA.....	56

4.3.2	Polymerasekettenreaktion .....	57
4.3.3	Single-Strand Conformation Polymorphism (SSCP) Analysis .....	61
4.3.4	Sequenzierung .....	63
4.4	MATERIALIEN UND GERÄTE .....	67
4.4.1	Software .....	67
4.4.2	Puffer und Lösungen .....	68
4.4.3	Komplette Kits .....	68
4.4.4	Geräte .....	68
4.4.5	Reagenzien .....	70
4.4.6	Firmenübersicht .....	71
<b>5</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>72</b>
5.1	ÜBERBLICK .....	72
5.2	HETEROZYGOTE MISSENSE-MUTATION L355P IN EXON 9 IN HCT-116 (A), HCT-116 (B) UND MATU .....	74
5.3	HETEROZYGOTE BASENDELETION MIT FRAMESHIFT IN EXON 8 IN HCT-116 (A) .....	76
5.4	HETEROZYGOTE MISSENSE-MUTATION R145W IN EXON 2 IN HCT-15 UND DLD-1 .....	78
5.5	HETEROZYGOTE MISSENSE-MUTATION A247D IN EXON 5 IN HCT-15 UND DLD-1 .....	79
5.6	STILLER POLYMORPHISMUS IM CODON 84, EXON 1B .....	80
<b>6</b>	<b>DISKUSSION.....</b>	<b>83</b>
6.1	GEFUNDENE CHK2-MUTATIONEN .....	83
6.1.1	Heterozygote Missense-Mutation L355P in HCT-116 (a), (b) und MATU, sowie heterozygote Deletion mit Frameshift in HCT-116 (a) .....	83
6.1.2	Heterozygote Missense-Mutationen R145W und A247D in HCT-15 und DLD-1 .....	86
6.1.3	Stiller Polymorphismus in Codon 84 .....	87
6.2	METHODIK.....	87
6.2.1	Prinzipielle Grenzen der Methodik .....	88
6.2.2	Sensitivität der Mutationsanalyse .....	89
6.3	ZELLULÄRE FUNKTIONEN VON CHK2.....	90
6.3.1	Übersicht über die Chk2-Interaktionspartner .....	91
6.3.2	Chk2 und Zellzyklusarrest .....	92
6.3.3	Relevanz von Chk2: Ergebnisse aus Tiermodellen .....	93
6.3.4	Chk2 und Seneszenz .....	94
6.3.5	Chk2 und DNA-Reparatur .....	96
6.3.6	Chk2 und Zelltod durch Apoptose oder Mitotische Katastrophe .....	96
6.3.7	Die Chk2-p53-Verbindung .....	97
6.3.8	Chk2 als räumlicher Verteiler des Signals .....	98
6.3.9	Vergleich von Chk1 und Chk2 .....	99
6.3.10	Wie wichtig ist Chk2 für DNA-Schadenantwort und Onkogenese? .....	100
6.4	INAKTIVIERUNG VON KOMPONENTEN DES ATM-CHK2-SIGNALWEGS IN HUMANEN TUMOREN .....	101

6.4.1	Kongenitale Chk2-Varianten: Bedeutung für Li-Fraumeni-Syndrom, Mammakarzinom und weitere Tumorarten.....	101
6.4.2	Chk2-Mutationen bei sporadischen Tumoren.....	103
6.4.3	Mutationen von Atm und Chk1 .....	104
6.5	CHK2 ALS ANGRIFFPUNKT DER CHEMOTHERAPIE .....	105
6.5.1	Chk2-Inhibition .....	105
6.5.2	Chk2-Aktivierung .....	107
6.5.3	Der jeweilige zelluläre Kontext bestimmt die Wirksamkeit einer Therapie .....	107
<b>7</b>	<b>SCHLUSSFOLGERUNG.....</b>	<b>108</b>
<b>8</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>109</b>
8.1	BASESEQUENZ VON CHK2.....	109
8.2	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....	110
<b>9</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>113</b>
<b>10</b>	<b>LEBENS LAUF .....</b>	<b>126</b>
<b>11</b>	<b>SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG.....</b>	<b>127</b>

## Zusammenfassung

### Einleitung:

Die Ansammlung von Mutationen und chromosomalen Veränderungen kennzeichnet die Entwicklung maligner Tumore. Defekte der zellulären Antwortprogramme auf DNA-Schäden begünstigen Onkogenese und beeinflussen Therapieansprechen und Prognose von Tumoren. Die Proteinkinase Chk2 (checkpoint kinase 2, Kontrollpunktkinase 2) ist ein zentraler Signalverteiler in der DNA-Schadenantwort. Sie reguliert die möglichen Zellantworten wie temporären Zellzyklusarrest, DNA-Reparatur, Seneszenz oder Zelltod durch Apoptose. Eine Bedeutung von Chk2 (das Chk2-kodierende Gen) als tumorkritisches Gen wurde für viele Gewebearten gezeigt.

### Fragestellung:

In dieser Arbeit wurden humane Tumorzelllinien auf Mutationen in den kodierenden Abschnitten des Chk2-Gens untersucht. Das Ziel war zum einen Erkenntnisse zur Bedeutung von Chk2 in Onkogenese und Tumorbilogie zu gewinnen, und zum anderen diese häufig in Studien zur Tumorbilogie eingesetzten Zelllinien hinsichtlich zu berücksichtigender Chk2-Defekte zu charakterisieren.

### Material und Methoden:

Untersucht wurden 47 Zelllinien von Kolonkarzinomen, Mammakarzinomen, Leukämien, Lymphomen und weiteren Tumorarten. Nach Extraktion der DNA wurden die interessierenden Abschnitte des Chk2-Gens durch Polymerasekettenreaktion amplifiziert und mittels Single-Strand Conformation Polymorphism Analyse (SSCP-Analyse) auf Mutationen gescreent. Auffällige Proben wurden zur Bestätigung und Spezifizierung sequenziert. Aufgrund der Existenz hochgradig homologer Pseudogene konnten nicht alle Chk2-Exons untersucht werden.

### Ergebnisse:

In vier der untersuchten Tumorzelllinien wurden Mutationen gefunden. In der Kolonkarzinomlinie HCT-116 und der Mammakarzinomlinie MATU fand sich die heterozygot vorliegende Missense-Mutation L355P in Exon 9, die Kinasedomäne von Chk2 betreffend. Eine Version von HCT-116 zeigte zusätzlich eine heterozygote Basendeletion in Exon 8, ebenfalls in der Kinasedomäne. Die beiden bereits bekannten

heterozygoten Missense-Mutationen R145W in Exon 2 und A247D in Exon 5 in den Kolonkarzinomlinien HCT-15 und DLD-1 wurden bestätigt.

**Schlussfolgerung:**

Chek2-Mutationen treten in Tumoren eher selten auf und haben für sich allein eine geringe Bedeutung für die Onkogenese. Aufgrund der Komplexität und Parallelität der Signalwege hängt der Effekt eines einzelnen Defekts vom konkreten Mutationsstatus der übrigen Signalwegkomponenten ab. Bei der Verwendung von HCT-116 und anderer Tumorzelllinien als Modellsysteme für die Erforschung der DNA-Schadenantwort sollten Chek2-Mutationen berücksichtigt werden.

# 1 Grundlagen

In den folgenden Abschnitten werden aufgrund ihrer fundamentalen Bedeutung in der Onkogenese der Zellzyklus, der Zelltod durch Apoptose und das Tumorsuppressorgen p53 vorgestellt. Viele Erkenntnisse stammen aus Studien an der Hefe, hier wird jedoch vorwiegend auf die Abläufe beim Menschen bzw. in Säugern eingegangen.

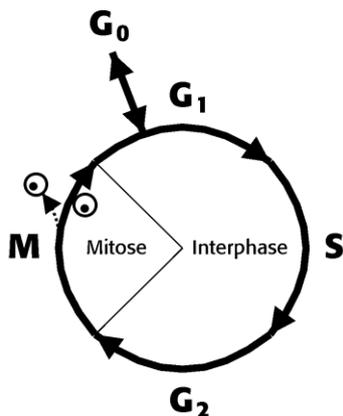
Die Kontrollmechanismen von Zellzyklus und Apoptose sind eng miteinander vernetzt, um so die für ein geordnetes Überleben des Organismus essentielle Koordination dieser Prozesse zu erreichen. So wird es möglich, bei DNA-Schäden sowohl den Zellzyklus anzuhalten und gleichzeitig pro- oder antiapoptotisch das Zellschicksal zu beeinflussen. Oder mitogene Signale, die oft sowohl Proliferation als auch Apoptose stimulieren, können gezielt die selektive Proliferation von Zellen bewirken, bei denen durch Überlebenssignale die Apoptose gehemmt wird, wohingegen Zellen sterben, die keine Überlebenssignale erhalten. Ein weiteres Beispiel ist der Schutz vor überschießender mitogener Stimulation, indem dann Apoptose induziert wird.

## 1.1 Der Zellzyklus

Der Zellzyklus umfasst die Vorgänge, bei der sich eine Zelle in zwei Zellen teilt (Übersichten: Vermeulen et al. 2003b, Alberts et al. 2004). Man unterscheidet die vier nacheinander ablaufenden Phasen G1, S, G2, M (**Abbildung 1**), nach der M-Phase tritt die Zelle wieder in die G1-Phase über. In der S- oder Synthesephase wird die DNA repliziert, in der M- oder Mitosephase findet die eigentliche Teilung von Chromosomen und Zelle in zwei Tochterzellen statt. G1 und G2 sind Gap- (Lücke-) Phasen. Aus der G1-Phase kann die Zelle reversibel in eine G0- oder Ruhephase eintreten. Die Phasen zwischen zwei Zellteilungen, also G1, S und G2, nennt man zusammen auch Interphase.

Die meisten Zellen des menschlichen Körpers sind nicht zellteilungsaktiv und befinden sich in G1 oder G0, darin können sie dauerhaft über Tage, Wochen, Jahre, verharren. Bei mitogenen Signalen und günstigen Bedingungen treten sie in den Zellzyklus ein und durchlaufen dann normalerweise ohne Pause alle Phasen bis zum erneuten G1-

Zustand. Ab einem bestimmten Punkt am Übergang von G1 zu S, dem sogenannten Restriktionspunkt, gibt es für die Zelle kein Zurück mehr (Pardee 1974). Die Regulation der Vorgänge um diesen Restriktionspunkt ist daher grundlegend für die Kontrolle der Zellproliferation. Bei auftretenden DNA-Schäden kann der Ablauf des Zellzyklus von verschiedenen DNA-Schadenkontrollpunkten angehalten werden. Beim Menschen dauert eine komplette Zellverdopplungsrunde ohne Halt in G1 etwa 24 Stunden. Viele Bakterien bewältigen den gesamten Zyklus dagegen in einer halben Stunde.



**Abbildung 1: Der Zellzyklus**

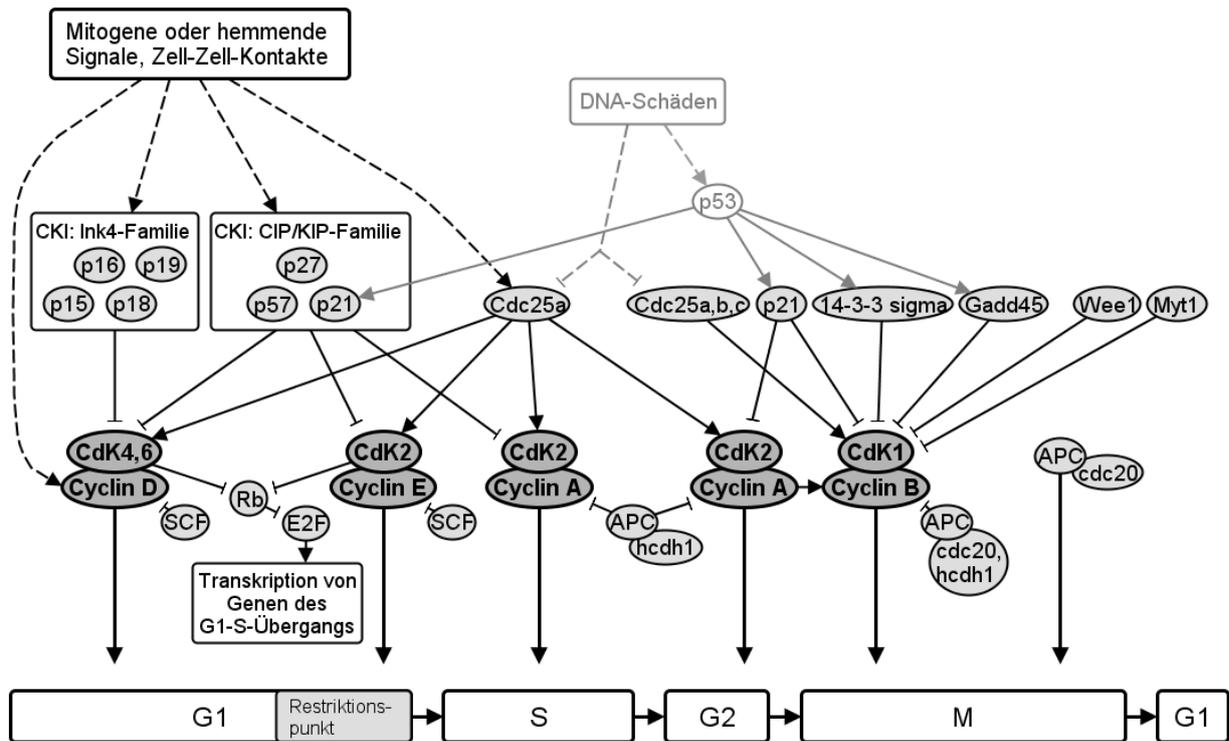
Der Zellzyklus besteht aus den vier Phasen G<sub>1</sub> (Gap1), S (Synthese der DNA), G<sub>2</sub> (Gap2) und M (Mitose, eigentliche Zellteilung). G<sub>1</sub>, S und G<sub>2</sub> werden auch als Interphase zusammengefasst. Aus G<sub>1</sub> kann die Zelle reversibel in eine Ruhephase G<sub>0</sub> eintreten.

Wie wird der Ablauf des Zellzyklus konkret gesteuert? Im Folgenden soll ein sehr grober Überblick über das äußerst komplexe Zellzykluskontrollsystem bei Säugern gegeben werden (siehe auch Vermeulen et al. 2003b, Alberts et al. 2004). In diesem Netzwerk von Regulationsprozessen hemmen und aktivieren sich die beteiligten Gene und Proteine untereinander durch verschiedene Mechanismen, dazu gehören gegenseitige Phosphorylierung und Dephosphorylierung, Zusammenlagerung, Transkriptionsaktivierung und Ubiquitinierung mit nachfolgendem Abbau oder Sequestration. Positive Rückkopplungen verschärfen dabei die Umschaltungen.

### **Wichtige Komponenten des Zellzykluskontrollsystems**

Das Herzstück im Zellzyklus bildet ein Satz **Cyclin-abhängiger Kinasen (cyclin dependent kinases, CdKs)**, die periodisch jeweils in einer bestimmten Zellzyklusphase aktiviert werden und dann die phasenspezifischen Prozesse vermitteln (Morgan 1997,

Pavletich 1999, Vermeulen et al. 2003b). Ein komplexes Ensemble von Regulationsprozessen steuert die Aktivität dieser Kinasen (**Abbildung 2**), darunter die Cycline, die durch Bindung die CdKs aktivieren und deren Substratspezifität beeinflussen (Pines 1991).



**Abbildung 2: Die Regulation des Zellzyklus**

Das Herzstück der Zellzykluskontrolle bilden die Cyclin-abhängigen Kinase (CdKs), die in Verbindung mit den zugehörigen Cyclinen die Teilprozesse des Zellzyklus starten. Viele Mechanismen regulieren die Aktivität der CdKs, besonders am Übergang aus G1 zu S. Bei DNA-Schädigung kann der Zellzyklus aufgehalten werden. Details siehe Text.

Die Konzentration der Cycline oszilliert mit den Phasen des Zellzyklus, und wird durch Transkriptionsaktivierung sowie Ubiquitinierung und Abbau durch das Proteasom reguliert (Glutzer et al. 1991). Die verschiedenen CdKs und Cycline der Zellzyklusphasen sind in **Tabelle 1** wiedergegeben. Bei DNA-Schäden kann der Zellzyklus an verschiedenen Stellen von **DNA-Schadenkontrollpunkten** gestoppt werden. Diese Kontrollpunkte sind in **Abbildung 2** angedeutet, sie werden im entsprechenden Kapitel genauer besprochen.

**Tabelle 1: Übersicht der wichtigsten humanen Cyclin-abhängigen Kinasen (CdKs) und Cycline**

Phase	CdK	Cyclin
G1	CdK4, CdK6	Cyclin D1, D2, D3
G1-S-Übergang	CdK2	Cyclin E
S	CdK2	Cyclin A
G2-M-Übergang	CdK2	Cyclin A
M	CdK1	Cyclin B

Das Retinoblastomprotein **Rb** und der Transkriptionsfaktor **E2f** kontrollieren am Restriktionspunkt den G1-S-Übergang über die Aktivierung von Zielgenen wie Cyclin E und A, CdK1, p21, c-Myc (Harbour et al. 2000). Die CdK aktivierende Kinase (**CAK**) phosphoryliert CdKs, was zur deren vollen Aktivierung nötig ist (Jeffrey et al. 1995). CAK ist ein Heterodimer aus CdK7 und Cyclin H (Fisher et al. 1994). Eine Reihe von Proteinen steuert die Feinregulation der CdK-Aktivitäten. Dazu zählen die **CdK-Inhibitoren** (Sherr et al. 1995, Morgan 1997, Pavletich 1999), die durch direkte Interaktion die CdKs hemmen, vor allem in G1 und S. Sie teilen sich in die Cip/Kip-Familie (Hengst et al. 1998) und die Ink4-Familie (Inhibiert CdK4) (Carnero et al. 1998) und umfassen folgende Faktoren (in Klammern jeweils Synonyme und der Gencode): **p21** (Waf1, Cip1, Gen: Cdkn1a), **p27** (Kip1, Gen: Cdkn1b), **p57** (Kip2, Gen: Cdkn1c), **p16** (Ink4a, Gen: Cdkn2a), **p15** (Ink4b, Gen: Cdkn2b), **p18** (Ink4c, Gen: Cdkn2c), **p19** (Ink4d, Gen: Cdkn2d). Auch an der CdK-Feinregulation beteiligt ist die **Cdc25-Familie**. Die drei Phosphatasen Cdc25a, Cdc25b und Cdc25c wirken aktivierend auf CdKs, indem sie hemmend wirkende Phosphorylierungen durch die Kinasen **Wee1** (Heald et al. 1993) und **Myt1** (Liu et al. 1997) rückgängig machen (Lew et al. 1996). Cdc25a wirkt hauptsächlich auf CdK4, 6 und 2 in G1 und S, Cdc25b und c wirken auf CdK1 in M. Eine wichtige Rolle bei der Kontrolle der Cyclinkonzentration spielen die Ubiquitinligasen **SCF** (Skp1 [S-phase kinase-associated protein 1]-cullin-F-box) und **APC** (Anaphase fördernder Komplex, Anaphase promoting complex). Sie katalysieren die Übertragung von Ubiquitin auf Cycline und andere Zellzyklusregulatoren, wodurch diese zum Abbau durch das Proteasom markiert werden (Peters 1998, Vodermaier

2004, Castro et al. 2005). SCF wirkt auch auf einige Inhibitoren der CdKs, vor allem in G1 und S, zum Beispiel auf p27. APC spielt außerdem eine fundamentale Rolle in der Mitosesteuerung, es wird reguliert durch die Bindungspartner Cdc20 und Hcdh1 (Synonym: Fzr1) (Castro et al. 2005).

### **Der Ablauf des Zellzyklus**

**G1:** Die G1-Phase ist eine Phase fehlender CdK-Aktivität. CdK-Inhibitoren und der APC-Hcdh1-Komplex verhindern die CdK-Aktivierung und damit den Eintritt in den Zellzyklus. Erst extrazelluläre mitogene Signale bzw. der Wegfall hemmender Signale starten über die Anhäufung von G1- und G1/S-Cyclinen (Cyclin D, E), über hemmende Wirkung auf die CdK-Inhibitoren und andere Mechanismen den Zellzyklus (Woo et al. 2003, Alberts et al. 2004). Durch Aktivierung der CdK4/6 wird dabei Rb phosphoryliert und E2f aktiviert, was den Eintritt in den Zellzyklus vorantreibt (Harbour et al. 2000). Ein wichtiger Signalweg zur Vermittlung von mitogenen Zellrezeptorsignalen ist der Ras-Signalweg, der die MAP-Kinasekaskade und dadurch den Transkriptionsfaktor Myc aktiviert. Myc aktiviert dann eine Vielzahl von Genen, darunter Cyclin D, SCF und E2f (Leone et al. 1997, Ewen 2000, Chang et al. 2003). Andere Signalwege aktivieren das Genregulatorprotein NF- $\kappa$ B, das wiederum auf Rb und Myc wirkt (Vermeulen et al. 2003a).

**Synthesephase:** Die Aktivität des Cyclin A-CdK2-Komplexes löst die DNA-Replikation aus.

**G2 und Mitose:** Die während der S-Phase allmählich ansteigende Cyclin-A-CdK2-Aktivität erreicht ihren Höhepunkt in der späten G2-Phase und kontrolliert den Übergang zur Mitose, insbesondere durch die Kontrolle der Cyclin B-CdK1-Aktivierung (Lindqvist et al. 2009). Der Eintritt in die Mitose wird dann über die Anhäufung von Cyclin B und damit Hochregulierung der CdK1-Aktivität vermittelt (Lindqvist et al. 2009). Verschiedene weitere Mechanismen kontrollieren die CdK1-Aktivität und verhindern gegebenenfalls eine Mitose bei DNA-Schäden: verstärkend wirken Cdc25b und c, hemmend wirken dagegen p21, 14-3-3- $\sigma$ -vermittelter Export aus dem Zellkern, Gadd45 und weitere Mechanismen (Taylor et al. 2001, Perdiguero et al. 2004, Stark et al. 2006). Während der Mitose vermittelt die Ubiquitinligase APC mit dem Bindungspartner cdc20 den Übergang von der Metaphase zur Anaphase (über Securin, Separin, Cohesin) und mit Hcdh1 den Ausgang aus der Mitose (durch Degradation von Cyclin B) (Castro et al.

2005). Die Chromosomentrennung darf keinesfalls vor Fertigstellung der DNA-Verdopplung passieren. Dies verhindert der sogenannte **S-M-Kontrollpunkt** (auch als Replikationskontrollpunkt bezeichnet). Er blockiert den Eintritt in die Mitose, wenn nicht replizierte DNA-Abschnitte oder angehaltene Replikationsgabeln vorliegen (Sancar et al. 2004). Die Details sind noch nicht vollständig geklärt, beteiligt sind Cdc25c, Atr und Chk1 und andere Pfade (Brown 2003), siehe auch Abschnitt über DNA-Schadenantwort. Ein anderer Kontrollpunkt, der **Spindelanheftungs-Kontrollpunkt**, kontrolliert während der Mitose die ordnungsgemäße Anheftung aller Chromosomen an der Mitosespindel. Als zentrales Element wird dabei der Cdc20-APC-Komplex gehemmt (Castro et al. 2005, May et al. 2006, Diaz-Martinez et al. 2009).

## 1.2 Zelltod durch Apoptose

Die Apoptose als Selbstmordprogramm der Zelle dient auf vielfältige Weise der gezielten Beseitigung überflüssiger oder potenziell schädlicher Zellen. Während der embryonalen Entwicklung wird Apoptose zur Modellierung von Körperformen und Geweben (zum Beispiel im Nervensystem) genutzt, indem überzählige Zellen abgebaut werden. Apoptose erhält das Gleichgewicht zwischen Zellvermehrung und -Untergang im reifen Gewebe. Sie spielt eine wichtige Rolle bei der Regulierung der Zellen des Immunsystems und dient zudem universell zur Beseitigung aller Arten geschädigter Zellen. Im Menschen sterben täglich Milliarden meist gesunder Zellen durch Apoptose. Im Gegensatz zur Nekrose geschieht dies zielgerichtet und kontrolliert, ohne Zellyse und ohne Schädigung des umliegenden Gewebes. Die Zelle zerlegt sich von innen, fragmentiert ihre DNA und zerfällt in mehrere noch von der Zellmembran umschlossene Apoptosekörperchen, die dann von Fresszellen oder benachbarten Zellen phagozytiert werden. Eine Dysregulation der Apoptose wird außer bei der Tumorentstehung auch bei neurodegenerativen und Autoimmunerkrankungen beobachtet (Überblick zur Apoptose: Lawen 2003, Alberts et al. 2004).

### Zwei Hauptsignalwege

Die Apoptose wird über komplexe Signalwege streng reguliert, schließlich hat ein irrtümliches Auslösen der Apoptose den Zelltod zur Folge. Apoptose auslösen können Signale an Todesrezeptoren der Zelle, der Entzug von Überlebenssignalen, DNA-

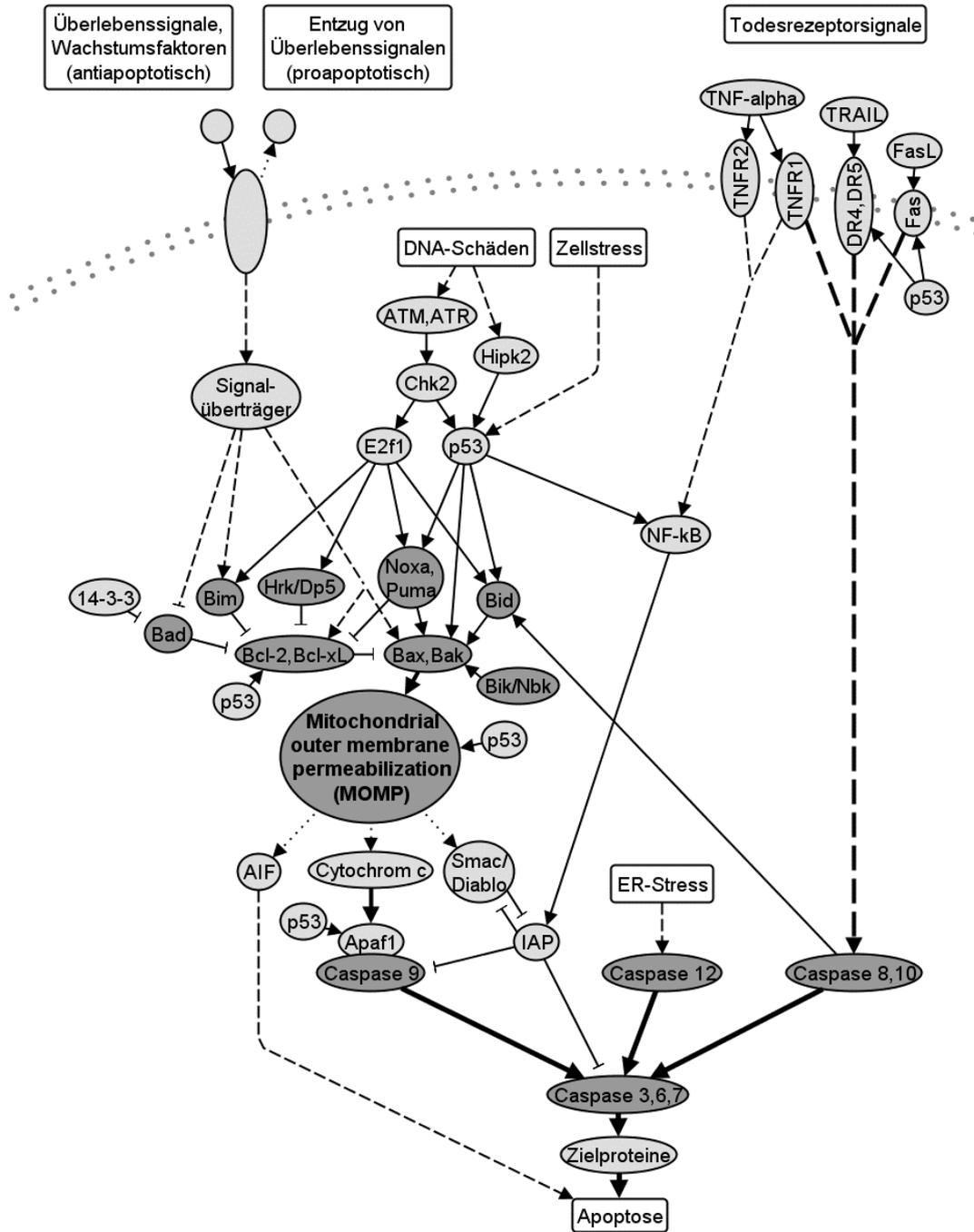
Schäden und viele andere Arten von Zellstress. Überlebens- und Wachstumssignale wirken dagegen antiapoptotisch. Die beiden Hauptsignalwege sind der extrinsische oder Rezeptor-vermittelte und der intrinsische oder mitochondriale Signalweg. Ein weiterer Signalweg löst bei Stress am Endoplasmatischen Retikulum Apoptose aus. Die Signalwege laufen in einer gemeinsamen Endstrecke zusammen (**Abbildung 3**).

### 1.2.1 Die Caspasen

Die gemeinsame Endstrecke von intrinsischem und extrinsischem Signalweg besteht aus einer Kaskade von sich gegenseitig aktivierenden Caspasen (Cystein-haltigen, an Aspartat schneidenden Proteasen), die schließlich über die Aktivierung einer Reihe von Zielproteinen zur Zerlegung der Zelle und allen Phänomenen der Apoptose führt (Lawen 2003). Die Caspasen werden durch Adapterproteine aktiviert bzw. Inhibitor-der-Apoptose-Proteine (IAP) gehemmt, wobei extrazelluläre Signale regulierend wirken (Salvesen et al. 2002).

### 1.2.2 Der intrinsische Signalweg

Eine Vielzahl intra- und extrazellulärer Faktoren wirkt über den intrinsischen Signalweg: Wachstums- und Überlebenssignale bzw. deren Entzug, Zytokine, DNA-Schäden, oxidativer Stress, die Wirkung zytotoxischer Substanzen und anderes. Den zentralen Prozess im intrinsischen Signalweg stellt das Durchlässigwerden der äußeren Mitochondrienmembran (mitochondrial outer membrane permeabilization, MOMP) dar. Dies führt durch die Freisetzung verschiedener apoptogener Faktoren aus dem mitochondrialen Intermembranraum in das Zytoplasma, insbesondere Cytochrom c, Smac-Diablo und AIF (Apoptose-induzierender Faktor), zur irreversiblen Apoptoseinduktion (ausführliche Darstellung in Kroemer et al. 2007). Freigesetztes Cytochrom c bindet an Apaf1 (Apoptotische Protease aktivierender Faktor 1) und führt zur Bildung eines Signalkomplexes, genannt Apoptosom, der die Aktivierung der Caspase 9 katalysiert. Smac-Diablo inhibiert die IAP (Inhibitor-der-Apoptose-Proteine). AIF vermittelt Caspase-unabhängig einen Apoptose-ähnlichen Zelltod.



**Abbildung 3: Die Regulation der Apoptose**

Im intrinsischen Signalweg (linke Bildhälfte) führen vielfältige extra- und intrazelluläre Signale über die Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien zur irreversiblen Apoptoseinduktion. Wichtige Regulatoren dieses Prozesses sind die Proteine der Bcl-2-Familie, eingeteilt nach dem Aufbau aus BH- (Bcl-2-homologen) Domänen: antiapoptotische Multidomän-Proteine wie Bcl-2, Bcl-xL, proapoptotische Multidomän-Proteine wie Bax und Bak sowie proapoptotische BH3-only-Proteine wie Noxa, Puma, Bad, Bim, Bid, Bik/Nbk/BIK, Hrk/Dp5. Die verschiedenen Bcl-2-Proteine wechselwirken auf vielfältige Weise untereinander. Zur Permeabilisierung der Mitochondrienmembran führen letztlich die proapoptotischen Multidomän-Proteine, insbesondere Bax und Bak. Im extrinsischen Signalweg (rechte Bildhälfte) aktivieren Todesrezeptorsignale die Apoptose. Intrinsischer und extrinsischer Signalweg aktivieren in ihrer gemeinsamen Endstrecke Caspasen, die die Apoptose vermitteln. Ein weiterer Signalweg löst bei Stress am Endoplasmatischen Retikulum (ER) Apoptose aus. Details siehe Text.

Es gibt ab der Permeabilisierung der Mitochondrienmembran kein Zurück mehr für die Zelle. Dieser zentrale Prozess wird durch die Gruppe der nach ihrem bekanntesten Mitglied benannten Bcl-2-Proteine reguliert (Übersichtsdarstellungen: Daniel et al. 2003, Kroemer et al. 2007, Youle et al. 2008, Hardwick et al. 2009). Die meisten pro- oder antiapoptotischen zellulären Signale wirken letztlich durch die Beeinflussung dieser Proteine. Man kennt mittlerweile über ein Dutzend humane Bcl-2-Proteine. Klassischerweise unterscheidet man nach Aufbau aus den sogenannten BH- (Bcl-2-homologen) Domänen und pro- oder antiapoptotischer Funktion drei Gruppen: Erstens antiapoptotische Proteine mit mehreren BH3-Domänen (BH1-BH4), dazu gehören Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-W, Mcl-1, A1/Bfl-1. Zweitens proapoptotisch wirkende Multidomän-Proteine, die Hauptvertreter sind Bax und Bak. Drittens die ausschließlich proapoptotisch wirkenden sogenannten BH3-only-Proteine, die nur die BH3-Domäne enthalten, dazu zählen Bad, Bid, Bim, Puma, Noxa, Bik/Nbk/Blk, Hrk/Dp5 (Shamas-Din et al. 2011).

Die Bcl-2-Proteine können sich zu Homo- und Heterooligomeren zusammenlagern und bilden ein komplexes Netzwerk gegenseitiger Hemmung und Aktivierung. Über die detaillierten Abläufe gibt es verschiedene Modelle, doch letztlich führen die proapoptotischen Multidomän-Proteine, also insbesondere Bax und Bak, zur Permeabilisierung der Mitochondrienmembran. Die anderen Bcl-2-Proteine, also die antiapoptotischen Multidomän-Proteine und die proapoptotischen BH3-only-Proteine regulieren diesen Prozess durch komplexe, spezifische Interaktionen untereinander und mit Bax und Bak. So ist beispielsweise Bax essentiell erforderlich für die Apoptoseinduktion durch das BH3-only-Protein Bik/Nbk/Blk (Gillissen et al. 2003), dabei bedingt das antiapoptotische Bcl-2-Protein Mcl-1 diese Bax-Abhängigkeit, denn nach Mcl-1-Inaktivierung kann Bik/Nbk/Blk auch über eine Bak-Aktivierung Apoptose induzieren (Gillissen et al. 2007).

Die zentrale Rolle in der Apoptoseregulation machen die Bcl-2-Proteine zu hochinteressanten Forschungsobjekten. Für Malignome kann die Inaktivierung proapoptotischer Bcl-2-Proteine oder die Überaktivierung antiapoptotischer Bcl-2-Familienmitglieder einen Vorteil darstellen. Andererseits könnte eine entgegengesetzte Beeinflussung durch geeignete Pharmazeutika als Tumorthherapie eingesetzt werden. Ein Beispiel für die Inaktivierung proapoptotischer Bcl-2-Proteine in Tumoren ist die oft in Klarzelligen Nierenkarzinomen beobachtete Inaktivierung des BH3-only-Proteins

Bik/Nbk/Blk (Sturm et al. 2006b). Interessanterweise wurde dabei auch die Inaktivierung von Bim beobachtet, was nahelegt, dass die Dysregulation mehrerer Bcl-2-Proteine besonders förderlich für die Tumorgenese ist. Aber nicht nur für Bcl-2-Proteine, auch für viele andere zentrale Apoptoseregulatoren wurde eine Dysregulation in Tumoren nachgewiesen, so ist die Herunterregulation von Apaf1 in Patienten mit B-CLL (B-Zell-chronisch-lymphatischer Leukämie) bei gleichzeitig bestehender p53-Mutation mit einer schlechten Prognose verbunden (Sturm et al. 2006a).

Je nach Auslöser werden die Bcl-2-Proteine über verschiedene Signalwege beeinflusst. So sind an der intrazellulären Weiterleitung extrazellulärer Signale zu den Bcl2-Proteinen die verschiedensten Rezeptortypen und Signalüberträger beteiligt, etwa Proteinkinase A (PKA), Proteinkinase C (PKC), der PI3K (Phosphoinositid-3-Kinase)-Akt (auch Proteinkinase B, PKB)-Signalweg, der Jak (Januskinasen)-Stat (Signal Transduktor und Aktivator der Transkription)-Signalweg und Mitglieder der Src-Tyrosinkinasefamilie (siehe Kroemer et al. 2007, Youle et al. 2008). Antiapoptotische Überlebens- und Wachstumssignale führen unter anderem zur Aktivierung von Bcl-2 und Bcl-xL und zur Hemmung von Bad, dabei binden 14-3-3-Proteine Bad und verhindern durch Sequestration dessen proapoptotische Wirkung. Der Entzug einiger Überlebenssignale wirkt auch proapoptotisch über die Stimulation von Bim und Bax.

DNA-Schäden führen über den Atm/Atr-Chk2/Chk1-Signalweg und über Atm/Atr-Hipk2 zur p53-Aktivierung und damit zum breiten Spektrum p53-vermittelter proapoptotischer Effekte (Bitomsky et al. 2009, Puca et al. 2010). Ebenso aktivieren auch viele andere Arten von Zellstress p53. P53 fördert die Transkription vieler proapoptotischer Bcl2-Proteine wie Bax, Bak (Graupner et al. 2011), Puma, Noxa, Bid und hemmt die Transkription des antiapoptotischen Bcl-2, außerdem beeinflusst p53 die Transkription vieler anderer an der Apoptosevermittlung beteiligter Signalträger wie Apaf1, NF-kB und der Todesrezeptoren Fas, DR4, DR5 (Yoshida et al. 2010). Zudem sind auch transkriptionsunabhängige Effekte von p53 bekannt, so kann p53 extranukleär direkt an den Mitochondrien proapoptotisch wirken indem es mit Bax und Bak auf Proteinebene interagiert (Green et al. 2009). Die Translokation von p53 zu den Mitochondrien führt per se jedoch nicht notwendigerweise zum Zelltod (Essmann et al. 2005). Auch p53-unabhängig kann bei DNA-Schäden Apoptose vermittelt werden, offenbar über mehrere Signalwege. Involviert sind das durch Atm/Atr-Chk2 aktivierte Tumorsuppressor-Protein Pml (Yang et al. 2002) und der ebenfalls über Atm/Atr-Chk2 aktivierte

Transkriptionsfaktor E2f1, der die p53-Familienmitglieder p63 und p73 (nicht mit abgebildet) aktiviert, die ähnlich wie p53 die Transkription verschiedener Bcl-2-Proteine beeinflussen (Roos et al. 2006, Schmitt et al. 2007, Graupner et al. 2011).

Der Tumorsuppressor p14-Arf (nicht mit abgebildet), der eine zentrale Rolle in der Regulation von Zellzyklusarrest und Seneszenz spielt und insbesondere durch zelluläre oder virale Onkogene aktiviert wird (Sherr 2006), kann ebenfalls Apoptose sowohl p53-vermittelt als auch p53-unabhängig auslösen. Im letzteren Fall ist das BH3-only-Protein Puma essentiell beteiligt (Hemmati et al. 2010), Bax und Bak sind involviert aber nicht unbedingt erforderlich (Hemmati et al. 2002, Hemmati et al. 2006). Im Falle eines intakten p53-Puma-Bax-Signalweges wird die p14-Arf-getriggerte Apoptose durch Verlust des Zellzyklusstopp-regulierenden p21 noch verstärkt (Hemmati et al. 2005, Hemmati et al. 2010).

Der Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B ist essentiell für die p53-vermittelte Apoptose nach DNA-Schäden (Ryan et al. 2000), NF- $\kappa$ B wird zudem durch extrazelluläres TNF- $\alpha$  aktiviert und beeinflusst eine zunehmende Zahl von Genen, die an der Apoptose beteiligt sind, insbesondere die IAP (Liu et al. 2007).

Interessanterweise enthalten Viren oft virale IAP (Salvesen et al. 2002), virale antiapoptotische Bcl2-Proteine (Hardwick et al. 2009) und andere Apoptoseinhibitoren (Kroemer et al. 2007) und können darüber infizierte Zellen am Sterben hindern.

### **1.2.3 Der extrinsische Signalweg**

Beim extrinsischen oder Rezeptor-vermittelten Signalweg führt die Bindung von Liganden an Zelloberflächenrezeptoren über Adaptermoleküle zur Caspasenaktivierung und zum Zelltod. Todesrezeptoren und ihre Liganden spielen eine wesentliche Rolle in der physiologischen Regulation des programmierten Zelltodes und der Erhaltung der Gewebshomöostase (Übersicht: Daniel et al. 2001). Ein Beispiel ist der Todesrezeptor Fas aus der Familie der TNF-Rezeptoren (Tumor Nekrose Faktor-Rezeptoren, TNFR). Die Bindung des Fas-Liganden (FasL) an Fas aktiviert mittels des Adaptermolekül FADD (Fas-associated death domain protein, Fas-assoziiertes Todesdomänprotein) die Initiatorcaspase 8 oder auch 10 und führt so zur Apoptose (Lawen 2003). T-Zellen des Immunsystems beispielsweise können FasL auf ihrer Oberfläche exprimieren und

Zielzellen durch die Bindung an Fas auf deren Oberfläche töten. Außerdem können T-Zellen auch eigene Fas-Rezeptoren aktivieren und Selbstmord begehen. Andere Mitglieder der TNFR-Familie sind TNFR1, TNFR2, DR4 (death receptor 4, Todesrezeptor 4), DR5 und p75. Sie vermitteln Apoptose auf ähnliche Weise wie Fas, sie können aber auch antiapoptotische oder proliferative Effekte vermitteln, dies hängt vom bindenden Adaptermolekül und den weiteren Signalwegen ab.

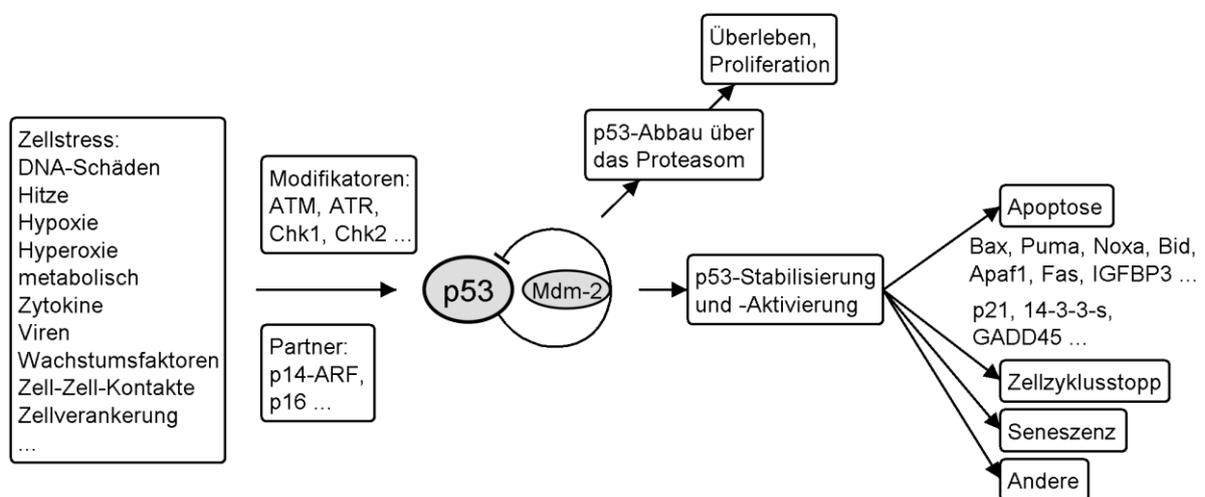
In sogenannten Typ-I-Zellen ist die durch aktive Caspase 8 induzierte Caspase-3-Aktivität für eine Apoptoseinduktion ausreichend, in Typ-II-Zellen dagegen ist eine Verstärkung des extrinsischen Todessignals durch Aktivierung des intrinsischen (mitochondrialen) Signalweges nötig, dies passiert über das BH3-only-Protein Bid, über das eine Querverbindung zum intrinsischen Signalweg besteht (Kroemer et al. 2007, Überblick in: Daniel et al. 2001). Demzufolge ist in Typ-II-Zellen auch das Ensemble der Bcl-2-Proteine an der Apoptosevermittlung durch Todesrezeptoren beteiligt. Deutlich wird dies beispielsweise an der Bedeutung des antiapoptotischen Bcl-2-Proteins Mcl-1 für die Resistenz Bax-defizienter Tumorzellen gegenüber TRAIL-vermittelter Apoptose (Gillissen et al. 2010).

### 1.3 Das Tumorsuppressorgen p53

P53 ist wohl das bekannteste und am intensivsten erforschte Tumorsuppressorgen, hier kann nur ein sehr grober Überblick über seine Funktionen gegeben werden (siehe Überblicksartikel: Oren 2003, Levine et al. 2009, Vousden et al. 2009, Brady et al. 2010, Yoshida et al. 2010). Bei zellulärem Stress verschiedenster Art vermittelt p53 über eine Vielzahl von Zielgenen und -proteinen ein breites Spektrum von Zellprozessen: Apoptose, temporären oder permanenten Zellzyklusstopp (Seneszenz), DNA-Reparatur und andere Zellprozesse (**Abbildung 4**). Die Zahl der von p53 beeinflussten Gene und Proteine geht in die Hunderte.

Normalerweise ist die Konzentration des p53-Proteins in der Zelle sehr niedrig, erst bei Stress steigt sie stark an. Der p53-Spiegel wird dabei gering gehalten durch einen negativen Rückkopplungskreis über Mdm2 (mouse double minute 2), das durch Ubiquitinierung den Abbau von p53 durch das Proteasom vermittelt und auch die Transkriptionsaktivität von p53 hemmt. Aktiviert wird p53 durch nahezu alle Arten von

Zellstress: DNA-Schäden, Hypoxie, Hyperoxie, Hitze, schädliche Metaboliten, Viren, Zell-Zell-Interaktionen, chromosomale Aberrationen, Telomererosion, Onkogenaktivierung, Zytokine, Wachstumsfaktoren, Fehlfunktion der Zellverankerung und andere. In die p53-Aktivierung sind dementsprechend verschiedenste Signalwege involviert, DNA-Schäden führen über den Atm/Atr-Chk2/Chk1-Signalweg und über Atm/Atr-Hipk2 zur p53-Aktivierung (Bitomsky et al. 2009, Puca et al. 2010). Onkogenaktivierung (beispielsweise von Ras) und andere Stresseinflüsse aktivieren p14-Arf, welches Mdm2 hemmt und damit p53 aktiviert.



#### Abbildung 4: Das Tumorsuppressorgen p53

Viele Arten von Zellstress führen über Modifikation von oder Bindung an p53 oder Mdm2 zur Aktivierung von p53. Ohne aktivierende Signale ist die p53-Konzentration niedrig durch ständigen Abbau durch das Proteasom. Mdm2 vermittelt diesen Abbau in einer negativen Rückkopplungsschleife. Aktives p53 induziert durch Transkriptionsaktivierung vieler Zielgene Apoptose, Zellzyklusstopp oder andere Effekte.

Mutationen von p53 oder Mdm2 begünstigen die Tumorprogression, da sie Zellzyklusstopp und Apoptose hemmen. P53-Mutationen werden in etwa der Hälfte aller Tumoren gefunden. Es ist bekannt, dass p53-Mutationen in Tumoren auch erst durch DNA-schädigende Chemotherapien selektioniert werden und dies dann mit einer partiellen Chemotherapieresistenz und schlechteren Prognose assoziiert sein kann (Sturm et al. 2003).

P53 wirkt hauptsächlich als nukleärer Transkriptionsfaktor, meist transkriptionsaktivierend, aber auch transkriptionsrepressiv. Die Wirkung von p53 wird dabei durch eine Vielzahl von Proteinen beeinflusst. Sie modulieren die Zielsequenzspezifität von p53 und bewirken so die Aktivierung von Teilmengen der p53-Zielgene. Zu den eher wenigen p53-Zielgenen, die Zellzyklusstopp vermitteln, zählen p21, Gadd45 und 14-3-3- $\sigma$ . Apoptose wird dagegen von wesentlich mehr p53-Zielgenen beeinflusst, darunter Puma, Noxa, Bax, Bak, Bid, Bcl2, Apaf1, DR4, DR5, Fas, IGFBP3 und NF-kB. Es sind jedoch auch transkriptionsunabhängige Effekte von p53 bekannt, so kann p53 extranukleär direkt an den Mitochondrien proapoptotisch wirken indem es durch Interaktion mit den Proteinen der Bcl2-Familie zur Permeabilisierung der Mitochondrienmembran führt (Green et al. 2009).

Aktiviertes p53 verändert das Zellschicksal dramatisch. Es führt zu Apoptose oder zu DNA-Reparatur und Zellzyklusstopp, auch permanent als Seneszenz. Welcher Weg eingeschlagen wird entscheidet dabei der aktuelle zelluläre Kontext, die komplexe Signalbalance aus vielen intra- und extrazellulären Signalen. Aufgrund der großen Anzahl von p53-Modifikatoren und Zielgenen bzw. -proteinen und der vielfältigen Wechselwirkungen der beteiligten Signalwege gibt es leider keine einfachen Aussagen über die p53-Wirkung. P53 wirkt zwar meist proapoptotisch, in einigen Fällen konnten jedoch kontextabhängig auch antiapoptotische Effekte beobachtet werden. Überraschenderweise wirken mehrere p53-Zielproteine antiapoptotisch, so p21, die TNF- (Tumor-Nekrose-Faktor-) Rezeptoren TNFRSF10C und TNFRSF10D (tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10C/D), der Transkriptionsfaktor SLUG und andere (Janicke et al. 2008). Außerdem kann sich die Zellsituation durch p53-vermittelte effektive DNA-Reparatur und Zellzyklusarrest oder auch Seneszenz so stabilisieren, dass die proapoptotischen Signale übertönt werden (Essmann et al. 2005, Gatz et al. 2006). Es gibt Daten, die nahelegen, dass die Entscheidung zwischen Leben und Tod direkt vom Ausmaß und Dauer des Zellschadens abhängt (Bensaad et al. 2007).

## 2 Einleitung

### 2.1 Malignome als Erkrankung der Erbinformation

Maligne Tumoren stellen in den Industrieländern die zweithäufigste Todesursache nach Herz-Kreislauferkrankungen dar. Sie entstehen durch unkontrollierte Zellvermehrung und können aus allen Gewebearten des menschlichen Körpers hervorgehen. Von den etwa  $10^{13}$  bis  $10^{14}$  Zellen, aus denen ein Mensch besteht, sterben täglich Milliarden, und ähnlich viele Zellen entstehen neu, um untergegangene Zellen zu ersetzen oder Gewebe wachsen zu lassen (Alberts et al. 2004). Komplexe Steuerungsnetzwerke in den Zellen, basierend auf einer Vielzahl von Zellmolekülen und deren Wechselwirkungen untereinander, sorgen für eine strenge Kontrolle von Zellproliferation und -Tod und ermöglichen damit die Existenz hochkomplexer Gewebsverbände. Zu den zu koordinierenden Prozessen gehören die Übertragung und Verarbeitung extrazellulärer Signale, Zell-Zell-Interaktionen, das Zellwachstum, DNA-Verdopplung und Zellteilung (der Zellzyklus), Reparatur von DNA-Schäden, der programmierte Zelltod durch Apoptose oder Mitotische Katastrophe, Zellverankerung und andere. Lassen Störungen dieser Abläufe eine unkontrollierte Zellvermehrung über Generationen hinweg zu, führt dies zur Tumorentstehung.

Die DNA als Erbinformation kodiert den Aufbau der Zellbestandteile. DNA-Schäden verändern die Struktur und damit Funktion der Zellbausteine und können so zu Störungen in allen Zellprozessen führen. Nur Störungen, die auch an die nächsten Zellgenerationen weitergegeben werden, können Tumoren verursachen. Damit wird plausibel, dass Schäden der DNA - der Erbinformation - die Grundlage der Tumorentstehung darstellen. Jedoch sind DNA-Schäden nicht nur die Basis der Tumorentstehung, sondern auch der Tumorthherapie und deren Nebenwirkungen. Denn viele Therapieprinzipien (abgesehen von der Chirurgie) wie Bestrahlung und die herkömmlichen Chemotherapeutika wirken durch DNA-Schädigung. Tumorzellen, die durch Störungen in Zellteilung, DNA-Reparatur und ihre genetische Instabilität diesem zusätzlichen Stress nicht standhalten können sterben. Gesunde Zellen dagegen können diese Schäden eher reparieren und überstehen. Die bekannten Therapienebenwirkungen wie Knochenmarksuppression, Haarausfall, gastrointestinale

Toxizität und spätere Zweitmalignome sind direkte Folgen der Schädigung der DNA des zuvor gesunden Gewebes.

### Exogene Faktoren verursachen die meisten Tumorfälle

Epidemiologische Untersuchungen fanden für nahezu alle Tumorarten starke regionale Häufigkeitsunterschiede (**Tabelle 2**), (Muir 1987, Alberts et al. 2004). Da wandernde Populationen dazu neigen, das für das Zielland typische Muster der Tumorfrequenzen anzunehmen, scheinen die Inzidenzunterschiede und damit die Mehrheit aller Tumorfälle durch Umwelteinflüsse und Lebensumstände, also exogene Faktoren, und nicht durch genetische Veranlagungen bestimmt zu sein (Doll et al. 1981, Peto 2001). Nur in wenigen Fällen sind die einzelnen exogenen Faktoren und deren Wirkmechanismen bekannt, genannt seien Alkohol, Rauchen, das Schimmelpilzgift Aflatoxin, EBV und HPV-Infektionen und chronische Hepatitis-B-Infektionen. Generell müssen alle mutagenen Faktoren als karzinogen angesehen werden.

**Tabelle 2: Regionale Unterschiede in der Tumorzinzidenz**

Tumorart	Inzidenz Region 1	Inzidenz Region 2
Lungenkrebs	USA, New Orleans, Farbige: 110	Indien, Madras: 5,8
Brustkrebs	Hawaii, Hawaiianerinnen: 94	Israel, Nichtjüdinnen: 14
Prostatakrebs	USA, Atlanta, Farbige: 91	China, Tianjin: 1,3
Magenkrebs	Japan, Nagasaki: 82	Kuwait, Kuwaitis: 3,7
Speiseröhrenkrebs	Frankreich, Calvados: 30	Rumänien, Bereich Clui: 1,1
Kehlkopfkrebs	Brasilien, São Paulo: 18	Japan, Gebiet Miyagi: 2,1
Hodenkrebs	Schweiz: 10	China, Tianjin: 0,6

Angegeben ist die Inzidenz in neuen Fällen pro Jahr pro 100 000 Einwohner. Werte korrigiert für die Standard-Altersverteilung, um Effekte durch die unterschiedlichen Altersverteilungen der Populationen zu beseitigen. Die Zahlen für Brustkrebs beziehen sich auf Frauen, alle anderen auf Männer. Nach Alberts et al. 2004, auf der Grundlage von Muir 1987.

Ein Beispiel für das Zusammenwirken mehrerer nachgewiesener Risikofaktoren sind Mundhöhlenkarzinome. Rauchen, Alkohol, der Genuss rauchloser Tabakprodukte und HPV-Infektionen stellen dabei die wesentlichen exogenen Faktoren dar, deren Einfluss je nach Region und lokalen Lebensgewohnheiten variiert. Die höchsten Inzidenzraten treten in Melanesien, Südzentralasien und Zentral-/Osteuropa auf, die niedrigsten in Ostasien (Jemal et al. 2011). Allerdings steigen die Inzidenzraten für

Mundhöhlenkarzinome im Zusammenhang mit oralen HPV-Infektionen in den USA und einigen Ländern Westeuropas an, teilweise vermutlich durch Änderungen des oralen Sexualverhaltens (Jemal et al. 2011).

### Unterschiedlichen Tumorhäufigkeiten bei Frauen und Männern

Nicht wenige Tumorarten treten bei Frauen und Männern mit deutlich unterschiedlichen Inzidenzen auf, dies betrifft nicht nur die geschlechtsspezifischen Gewebe wie Mamma, Zervix uteri, Ovar, Prostata, Hoden, sondern auch viele andere Tumorarten, darunter die häufigsten Entitäten wie Lungen- und kolorektale Karzinome, aber auch seltene Tumorformen wie beispielsweise das Burkitt-Lymphom (**Tabelle 3**), (Nahleh et al. 2006, Sant et al. 2010, Jemal et al. 2011).

**Tabelle 3: Beispiele für geschlechtsspezifische Tumorinzidenzen**

Tumorart	Männer	Frauen
alle Tumorarten (außer nicht-melanomische Hauttumoren)	300,1	225,5
Brust	~1	66,4
Prostata	62,0	-
Lunge	47,4	18,6
Kolorektum	37,6	24,2
Blase	16,6	3,6
Niere	11,8	5,8
Zervix uteri	-	9,0
Ovarien	-	9,4
Leber	8,1	2,7
Hoden	4,6	-
Burkitt-Lymphom	0,31	0,13

Angegeben sind die Inzidenzen in neuen Fällen pro Jahr pro 100 000 Einwohner, korrigiert für die Standard-Altersverteilung, um Effekte durch die unterschiedlichen Altersverteilungen der Populationen zu beseitigen. Angaben für Burkitt-Lymphom für Europa nach Sant et al. 2010, für männliches Mammakarzinom für Europa und USA nach Nahleh et al. 2006, alle anderen Daten für die entwickelten Weltregionen nach Jemal et al. 2011.

Diese unterschiedlichen Inzidenzen sind nicht allein durch die verschiedenen Lebensgewohnheiten von Frauen und Männern erklärbar, sondern liegen auch in unterschiedlichen Geschlechtshormonwirkungen und anderen Stoffwechselfdifferenzen

begründet, die Details sind meist noch unklar. Die Bedeutung von Chek2-Mutationen für das Mammakarzinom bei Frauen und insbesondere bei Männern wird in den Kapiteln 2.5.4 bzw. 6.4.1 diskutiert.

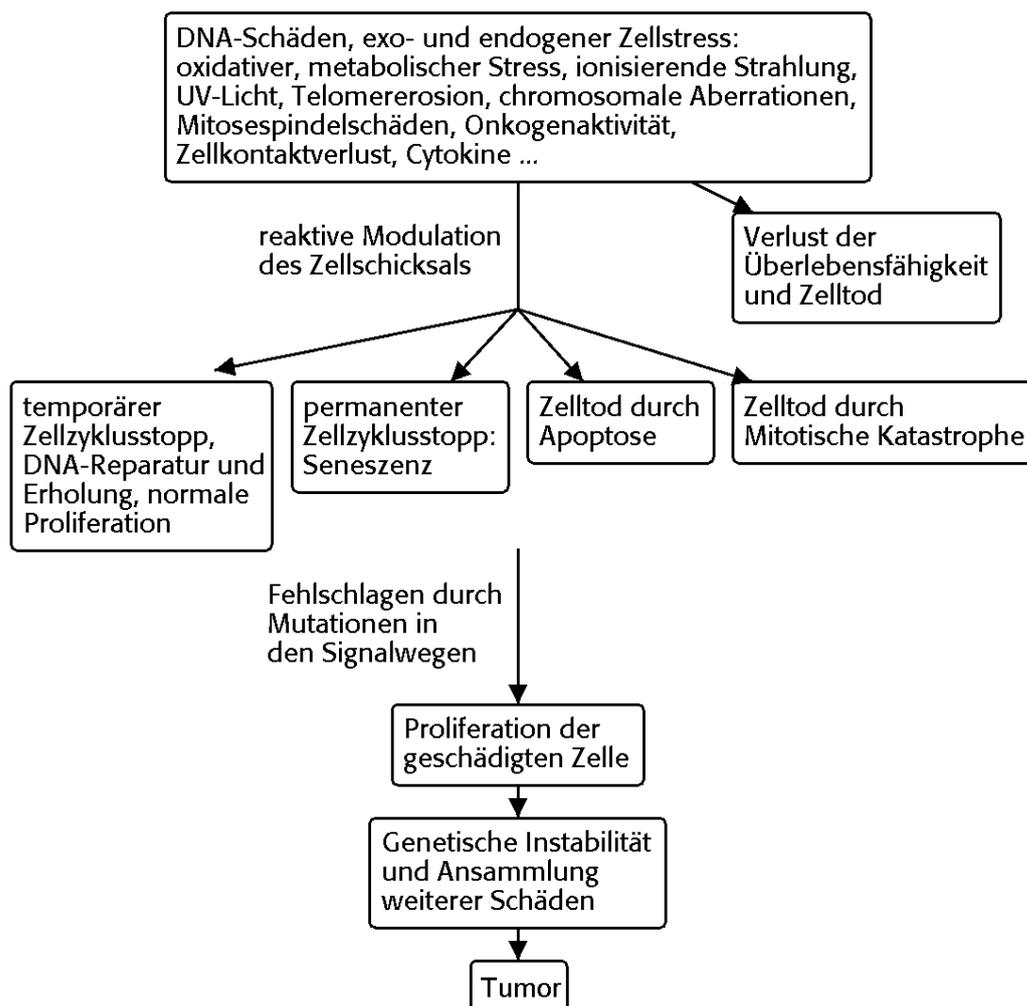
### **DNA-Schäden und Mutationen sind häufig**

DNA-Schäden und Mutationen sind natürliche und häufige Ereignisse, die täglich in jedem Menschen milliardenfach auftreten. Die DNA ist ein chemisch sehr reaktives Molekül und kann verschiedenste molekulare Veränderungen erleiden (siehe entsprechender Abschnitt weiter unten). Die Ursachen von DNA-Schäden sind zum einen exogene Faktoren wie UV-Licht, ionisierende Strahlung, Chemikalien, Nahrungsbestandteile und bestimmte Viren, und zum anderen endogene Faktoren wie reaktive Sauerstoffverbindungen und andere Metaboliten, Fehler bei der DNA-Replikation und Zellteilung sowie Telomerosion (Alberts et al. 2004). In einer metabolisch aktiven Zelle treten pro Tag ca. 10 000 DNA-Schäden auf (Lindahl 1993, Jackson 2001). Meist repariert die Zelle diese Schäden oder reagiert effektiv, beispielsweise mit Zelltod, nur ein Teil führt zu beständigen DNA-Veränderungen. Jede einzelne Zellteilung hinterlässt bei der DNA-Replikation Nukleotidfehler mit einer Rate von  $10^{-9}$ , das sind im gesamten Genom etwa drei Mutationen. Im Laufe des menschlichen Lebens finden schätzungsweise  $10^{16}$  Zellteilungen statt, es kommt also täglich zu vielen Millionen Mutationen, die statistisch betrachtet jedes Gen betreffen.

Der Begriff Mutation bezeichnet allgemein jede verbleibende Änderung der DNA-Sequenz. Dazu zählen der Austausch, die Deletion oder Insertion eines oder mehrerer Nukleotide oder auch längeren DNA-Stückes, auch die Verdopplung eines DNA-Bereiches. Im weiteren Sinne gehören auch Veränderungen in chromosomaler Dimension dazu, wie der Verlust oder die Verdopplung ganzer Chromosomenabschnitte oder kompletter Chromosomen sowie die Umverteilung längerer DNA-Abschnitte zwischen den Chromosomen durch Translokation, Rekombination und andere Mechanismen (Alberts et al. 2004). DNA-Schäden und Mutationen können für die Zelle folgenlos bleiben oder zu Veränderungen der Zellfunktionen bis hin zum Zelltod führen. Sie sind einerseits eine beständige Gefahr, bilden andererseits aber erst die Grundlage für genetische Variabilität und Evolution.

## Zelluläre Stress-Antwortprogramme schützen den Organismus

Die Erhaltung der genomischen Integrität ist essenziell für ein gesundes Funktionieren der Zellen. Die Natur hat daher effektive Mechanismen entwickelt, die in eukaryoten Zellen die Integrität des Genoms überwachen und bei DNA-Schäden zweckmäßige Antworten auslösen (**Abbildung 5**).



**Abbildung 5: Die Reaktionsmechanismen der Zelle auf Stress**

Zur Vermeidung negativer Folgen von DNA-Schäden und anderem Zellstress hat die Zelle mehrere Reaktionsmöglichkeiten: temporärer Zellzyklusstopp und Schadenreparatur, permanenter Zellzyklusstopp (Seneszenz), Selbstmord durch Apoptose oder Mitotische Katastrophe. Das Versagen dieser Mechanismen durch Mutationen in den beteiligten Signalwegen fördert die Tumorentstehung.

Dazu gehören der vorübergehende Zellzyklusstopp mit Schadenreparatur (Sancar et al. 2004), der dauerhafte Zellzyklusstopp durch Seneszenz (Ben-Porath et al. 2004, Campisi 2005) sowie der Zelltod durch Apoptose (Norbury et al. 2004) oder Mitotische Katastrophe (der kontrollierte Zelltod bei fehlerhaft verlaufender Mitose, Castedo et al. 2004a, Okada et al. 2004). In mehrzelligen Lebewesen bietet der kontrollierte Tod von einzelnen Zellen so ein effektives Mittel zum Schutz des Gesamtorganismus.

Nicht nur auf DNA-Schäden, sondern auch auf andere Arten endo- und exogenen zellulären Stresses reagieren die Zellen mit diesen Antwortprogrammen. Die Auswahl der Reaktion hängt dabei von Art und Ausmaß des Schadens, dem momentanen Zellzustand und externen Einflüssen wie Zytokinen oder Immunzellen ab. Da der Zellzyklus mit den Antwortprozessen koordiniert und gegebenenfalls angehalten wird, spricht man von sogenannten Zellzyklus-Kontrollpunkten (Hartwell et al. 1989, für Übersichten siehe: Zhou et al. 2000, Kastan et al. 2004, Motoyama et al. 2004). Die Organisation der Kontrollpunkte und die zentrale Rolle der Kontrollpunktkinase 2 (checkpoint kinase 2, Chk2) in der Signalübermittlung werden im zweiten Teil der Einleitung dargestellt.

### **Von der normalen zur malignen Zelle**

Sind die Reaktionsmechanismen durch Mutationen oder andere Störungen der beteiligten Signalwege defekt, so können geschädigte Zellen proliferieren, weitere Schäden ansammeln und sich eventuell zu malignen Zellen entwickeln, wenn durch Defekte ausreichend vieler kritischer Gene die verschiedenen Kontrollen der Proliferation überwunden werden (Überblick in: Hanahan et al. 2000, Kastan et al. 2004, Okada et al. 2004). Dabei müssen die Zellen trotz aller Anomalien ihre Proliferations- und Überlebensfähigkeit bewahren. Es findet ein Wechselspiel von Mutation und natürlicher Auslese statt, das sich auch bei malignen Zellen fortsetzt, besonders unter dem Selektionsdruck einer stattfindenden Therapie. Es entscheidet über steigenden Malignitätsgrad, Metastasierung, Therapieansprechen oder -resistenz des Tumors. Die ablaufende Anhäufung von genetischen Veränderungen über Zellgenerationen hinweg bezeichnet man als Tumorprogression, sie dauert eine längere Zeit, oft viele Jahre. Malignome können noch Jahre nach der Einwirkung eines schädigenden Faktors (zum Beispiel ionisierende Strahlung, Chemikalien, Rauchen) entstehen, auch wenn die Einwirkung selbst schon längst beendet ist (Alberts et al. 2004).

Man findet sowohl in präkanzerösen Läsionen als auch in Malignomen häufig eine konstitutive Aktivierung der zellulären DNA-Schadenantwortprogramme, insbesondere des in dieser Arbeit untersuchten Atm-Chk2-p53-Signalweges (Bartkova et al. 2005, Gorgoulis et al. 2005, Bartek et al. 2007a). Diese chronische Aktivierung der DNA-Schadenantwort führt zu einem Selektionsdruck für Mutationen in den beteiligten Genen. Defekte der DNA-Schadenantwortprogramme fördern das Auftreten weiterer Anomalien und die genetische Instabilität der Zelle. In zahlreichen Arbeiten wurde die fundamentale Bedeutung einer funktionierenden DNA-Schadenantwort als Barriere gegen genetische Instabilität und Tumorentstehung aufgezeigt (Hoeijmakers 2001, Khanna et al. 2001, Kastan et al. 2004, Bartkova et al. 2005, Gorgoulis et al. 2005, Bartek et al. 2007a, Bartek et al. 2007b, Bartek et al. 2007c).

Bei Diagnosestellung besteht ein Tumor schon im Mittel aus einer Milliarde Zellen, die typischerweise bestimmte Eigenschaften aufweisen (Hanahan et al. 2000, Alberts et al. 2004, Negrini et al. 2010): genetische Instabilität, Defekte der Proliferationskontrolle (Zellzykluskontrollsystem, mitogene Signale, Zell-Zell-Kontakte), Vermeidung von Apoptose und replikativer Seneszenz sowie gestörter Zellreifung und -differenzierung. Maligne Tumoren weisen verglichen mit benignen Tumoren noch zwei zusätzliche Eigenschaften auf: Invasivität (Fähigkeit zum Verlassen des eigenen Zellverbandes und zur Infiltration benachbarter Gewebe) und Metastasierung (Fähigkeit, zu anderen Stellen auszuwandern und dort zu überleben und sich zu vermehren).

### **Jeder Tumor ist ein individuelles und heterogenes Gemisch von Störungen**

Durch das fortwährende Wechselspiel von Mutation und natürlicher Auslese ist jeder Tumor ein heterogenes Gemisch verschiedener genetischer Schäden. Die unterschiedlichen Defektmuster bedingen ein unterschiedliches Ansprechen der Zellen auf mögliche Therapien. Trotz der großen Variation sind jedoch bestimmte Muster häufig, erwähnt sei das Tumorprogressionsmodell für das Kolonkarzinom, das über eine Reihe definierter Schädigungen - unter anderem von Apc (adenomatous polyposis coli), p53, k-Ras und Smad4 - vom normalen Epithel über Adenome zum Kolonkarzinom führt (Fearon et al. 1990). Die Ziele heutiger Forschung sind, diese Muster zu verstehen, im einzelnen Patienten diagnostizieren zu können und individuell darauf abgestimmte effektive Tumorthérapien zu entwickeln.

## **Tumorkritische Gene**

Entscheidend ist nicht unbedingt, an welcher Stelle ein mehrere Komponenten umfassender Signalweg gestört ist, sondern vielmehr, dass er gestört ist. Die Störung kann jeden Baustein betreffen, der an der Signalübertragung beteiligt ist: sezernierte Proteine, Proteinkinasen, Genregulatorproteine, transmembranöse Rezeptoren usw. Man bezeichnet alle Gene, deren Mutation die Tumorentstehung fördern kann, als tumorkritische Gene und unterteilt sie bekanntlich nach der Rolle im Signalweg in Proto-Onkogene und Tumorsuppressorgene (Alberts et al. 2004, Vogelstein et al. 2004). Nicht mutierte Proto-Onkogene haben stimulierende Wirkungen auf Zellwachstum und Vermehrung, erst durch Überaktivierung werden sie zum tumorfördernden Onkogen. Tumorsuppressorgene dagegen haben hemmende Funktionen auf Zellwachstum und Proliferation, bei ihnen fördert der Funktionsverlust die Tumorentstehung, entweder durch Inaktivierung beider vorhandenen homologen Genkopien oder durch eine dominant-negativ wirkende heterozygote Mutation. Das wahrscheinlich bekannteste Tumorsuppressorgen ist p53, weitere sind Rb, p16 und Bcl2, zu den Onkogenen gehören beispielsweise Ras und Myc. Man kennt bereits weit über 100 tumorkritische Gene (Vogelstein et al. 2004).

Die Über- oder Inaktivierung kann durch alle denkbaren Arten von Mutationen erfolgen (Alberts et al. 2004, Vogelstein et al. 2004), durch kleine Sequenzveränderungen wie Punktmutationen oder Deletionen und größere Eingriffe wie partielle Chromosomenverluste oder Translokationen. Die Veränderungen können die kodierenden Bereiche betreffen und so zu modifizierten Proteinen führen, oder sie geschehen in Kontrollregionen und bewirken eine erhöhte oder verminderte Expression des Gens. Zur Überexpression eines tumorkritischen Gens kann es auch kommen, wenn durch Genamplifikation zusätzliche Genkopien entstehen. Weiterhin können chromosomale Umordnungen ein Gen unter den Einfluss einer aktivierenden Regulationssequenz geraten lassen oder mit einem anderen Gen fusionieren. Auch epigenetische Veränderungen können zur Inaktivierung von Genen führen durch Promotor-Methylierung oder Umstrukturierung der DNA zu Heterochromatin. Angeborene Mutationen können zu Tumoren prädisponieren.

## Verschiedene Ursachen und Typen von DNA-Schäden

Die menschliche DNA (Desoxyribonukleinsäure) jeder Zelle umfasst auf 23 Chromosomen rund drei Milliarden Nukleotide. Davon stellen nur etwa 1,5% die kodierenden Bereiche der etwa 30 000 menschlichen Gene dar, die übrigen 98,5% haben regulatorische, teils ungeklärte Funktionen oder sind Überrest der Evolution (Alberts et al. 2004). Die DNA als chemisch sehr reaktives Molekül kann eine Vielzahl verschiedener Schäden erleiden. Aus molekularer Perspektive können diese gruppiert werden in Schäden der DNA-Basen, des DNA-Rückgrates und Quervernetzungen (Alberts et al. 2004, detaillierte Darstellung in: Sancar et al. 2004).

Schäden an den DNA-Basen umfassen Fehlpaarungen (durch Replikationsfehler) verschiedene spezifische Oxidationen, Reduktionen, Methylierungen, Depurinationen und andere Fragmentationen, Dimerisierungen sowie das Anhängen großer oder kleiner Addukte. Basenschäden entstehen durch reaktive Sauerstoffverbindungen und chemische Substanzen. UV-Strahlung erzeugt ebenfalls solche Schäden, sowohl indirekt über die Erzeugung reaktiver Sauerstoffverbindungen als auch durch die Bildung spezifischer Verbindungen wie Pyrimidindimere und (6-4)-Photoprodukte. Viele Chemotherapeutika wirken durch die Bildung von Basenaddukten, zum Beispiel Alkylierungen.

Zu den Schäden am DNA-Rückgrat gehören basenlose Stellen, Einzelstrangbrüche (SSB, single-strand breaks) und Doppelstrangbrüche (DSB). Alle drei Formen treten als Intermediate bei DNA-Reparaturprozessen auf. So entstehen basenlose Stellen oder Abschnitte bei der Basenexzisionsreparatur, SSB bei der Basen- und der Nukleotidexzisionsreparatur und DSB als Intermediate der Rekombination. Basenlose Stellen entstehen ansonsten durch instabile Basenmodifikationen, chemische Substanzen oder auch spontan. SSB bilden sich durch reaktive Sauerstoffverbindungen (so bei UV-Strahlung) und andere chemische Substanzen. DSB als gefährlichste Form von DNA-Schäden treten vor allem durch ionisierende Strahlung und einige Chemikalien (radiomimetische Substanzen) auf. Auch Topoisomerase-Inhibitoren führen zu SSB oder DSB.

Querverbindungen werden durch bifunktionale Agenzien wie Cisplatin oder Mitomycin D verursacht, es bilden sich sowohl Interstrang- als auch DNA-Protein-Quervernetzungen.

Viele der genannten Schadenvarianten behindern auch die Replikation und rufen dann durch steckengebliebene Replikationsgabeln DNA-Schadenantworten hervor. Nicht als DNA-Schäden im engeren Sinne werden DNA-Protein-Komplexe betrachtet, jedoch können extrem feste Komplexe DNA-Schadenantworten auslösen, wenn sie die Replikation oder Transkription behindern.

### **Verschiedene Reparaturprogramme**

Die Zellen verfügen über eine Reihe spezialisierter DNA-Reparaturprogramme, um die Vielfalt möglicher DNA-Schäden beheben zu können. Dazu zählen die Basenexzisionsreparatur (base-excision repair) und die Nukleotidexzisionsreparatur (nucleotide-excision repair) bei punktuellen Schäden und Einzelstrangbrüchen, das nichthomologe End-zu-End-Verbinden (non-homologous end joining) und die homologe Rekombination (homologous recombination) bei Doppelstrangbrüchen sowie die Fehlpaarungsreparatur (mismatch repair) bei Basenfehlpaarungen. Interstrangvernetzungen werden in mehrstufigen Prozessen aufgelöst. Auf die Einzelheiten der Reparaturvorgänge soll hier nicht eingegangen werden (Übersicht: Sancar et al. 2004). Wie diese Reparaturprozesse genau induziert werden und welche Rolle dabei die später beschriebenen DNA-Schadenkontrollpunkte haben ist noch nicht detailliert geklärt.

## **2.2 Die zelluläre Antwort auf DNA-Schädigung**

### **2.2.1 Schadenkontrollpunkte organisieren die DNA-Schadenantwort**

Wie dargestellt bildet die Akkumulation genetischer Veränderungen die Grundlage der Onkogenese. Die Ansammlung von Schäden in tumorkritischen Genen und die Selektion genetischer Varianten beeinflussen zudem die Resistenz von Malignomen gegenüber Radio- und Chemotherapie. Der Umgang der Zellen mit DNA-Schäden - die sogenannten DNA-Schadenkontrollpunkte - und deren Störungen spielen daher eine zentrale Rolle in der Tumorentstehung und der damit einhergehenden genetischen Instabilität (Hoeijmakers 2001, Khanna et al. 2001, Kastan et al. 2004, Bartkova et al. 2005, Gorgoulis et al. 2005, Bartek et al. 2007a). Ihre Erforschung ist essenziell für das

Verständnis von Tumorentstehung, -progression und -therapieresistenz und für die Entwicklung wirksamer diagnostischer und therapeutischer Verfahren.

Die Begriffe DNA-Schadenkontrollpunkte und Zellzyklus-Kontrollpunkte bezeichnen weitgehend synonym die Signalnetzwerke, die durch DNA-Schäden oder Fehler während des Zellzyklus, beispielsweise bei der DNA-Replikation oder der Chromosomentrennung, aktiviert werden und die Antwortprogramme der Zelle einleiten. Die Kontrollpunkte können den Zellzyklus stoppen, entweder temporär, um Zeit für die Reparatur bereit zu stellen, oder dauerhaft, um durch Seneszenz eine weitere Proliferation geschädigter Zellen zu verhindern. Sie veranlassen und koordinieren DNA-Reparatur, Chromatinrestrukturierung, Veränderungen im Transkriptionsprofil und Zellmetabolismus oder initiieren den Zelltod durch Apoptose oder Mitotische Katastrophe, um den Gesamtorganismus zu schützen (Zhou et al. 2000, Kastan et al. 2004, Motoyama et al. 2004). So bleibt der Organismus trotz ständig auftretender DNA-Schäden überlebensfähig und nur intakte Genome werden an nachfolgende Zellgenerationen weitergegeben. Der Ausdruck Kontrollpunkt charakterisiert dabei weniger einen exakten Punkt im Zellzyklus, an dem die Integrität der DNA geprüft und der Zellzyklus gegebenenfalls angehalten wird, sondern bezeichnet vielmehr die ineinander greifenden Signalwege, die zu allen Zeitpunkten des Zellzyklus aktiv werden können, diesen verlangsamen und in bestimmten Phasen stoppen und alle weiteren Komponenten der Zellantwort initiieren können. Die Zellzyklus-Kontrollpunkte sind zudem in komplexere Signalnetzwerke eingebunden, über die intra- und extrazelluläre Signale das zelluläre Geschehen flexibel und schnell beeinflussen. Es ist nicht überraschend, dass erbliche Defekte in Genen der Zellzykluskontrollpunkte und DNA-Reparatur bei familiär auftretenden Tumorerkrankungen gefunden werden, darunter auch Chek2 (das Chk2-kodierende Gen). Einige Beispiele zeigt **Tabelle 4**.

Im Folgenden werden die Kontrollpunkt-Signalwege erläutert, dabei werden die einzelnen Komponenten, die Aktivierungsmechanismen, die in den verschiedenen Zellzyklusphasen jeweils aktiven Signalwege sowie die Verbindungen zum programmierten Zelltod dargestellt.

**Tabelle 4: Defekte in Kontrollpunkt- und DNA-Reparaturgenen bei familiären Tumorerkrankungen**

Erkrankung	Defektes Gen	Referenzen
Li-Fraumeni-Syndrom	p53	Bell et al. 1999, Vahteristo et al. 2001, Sodha et al. 2002, OMIM 2008f, OMIM 2008g
Ataxia-Telangiectasia	Atm	Savitsky et al. 1995, OMIM 2008a
Seckel-Syndrom (selten mit hämatologischen Malignomen assoziiert)	Atr	OMIM 2008k
Familiäre Häufungen von Mammakarzinomen (bei Frauen und Männern), Ovarialkarzinomen	Brca1, Brca2, Chek2	Vahteristo et al. 2002, Meijers-Heijboer et al. 2002, OMIM 2008b, OMIM 2008c, OMIM 2008d
Multiple endokrine Neoplasie Typ 1 (MEN 1)	Men1	OMIM 2008i
Lynch-Syndrom (hereditäres nicht-polypöses Kolonkarzinom, hereditary nonpolyposis colorectal cancer, HNPCC)	Msh2, Mlh1 (MMR-Gene, mismatch repair genes)	OMIM 2008h
Fanconi-Anämie	FancA, FancB, FancC, FancD1, FancD2, FancE, FancF, FancG, FancI, FancJ, FancL, FancM, FancN, Rad51C	OMIM 2008e
Nijmegen breakage syndrome	Nbs1	OMIM 2008j
Xeroderma pigmentosum	Xpa, Xpc, Ddb2, Ercc3, Ercc4, Ercc5	OMIM 2008l

Atm: ataxia telangiectasia mutated; Atr: ataxia telangiectasia and Rad3 related; Brca1/2: breast cancer 1/2, early onset; Chk2: checkpoint kinase 2, Chek2: das Chk2-kodierende Gen; p53: protein 53; MEN1: multiple endocrine neoplasia I; Nbs1: Nijmegen breakage syndrome 1 (nibrin); MSH2: mutS homolog 2, colon cancer, nonpolyposis type 1 (E. coli); MLH1: mutL homolog 1, colon cancer, nonpolyposis type 2 (E. coli); FancA usw.: Fanconi anemia, complementation group A usw.; Rad51C: Rad51 homolog C; Xpa, Xpc: xeroderma pigmentosum, complementation group A/C; Ddb2: damage-specific DNA binding protein 2; Ercc3, Ercc4, Ercc5: excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 3/4/5

## 2.2.2 Komponenten der Schadenkontrollpunkte

Die im Netzwerk der Kontrollpunktsignalwege beteiligten Moleküle können in fünf funktionelle Gruppen gegliedert werden, wobei die Grenzen fließend sind: **Schadensensoren** erkennen DNA-Schäden, **Signalmediatoren** rekrutieren weitere Moleküle zum Schadenort und modulieren durch vielfältige Wechselwirkungen die Schadenantwort abhängig vom DNA-Schadentyp, **proximale und distale Signaltransduktoren** bündeln und verteilen die Signale auf die **Effektoren**, die für die Umsetzung der verschiedenen Zellantworten sorgen (**Abbildung 6**). Die Signalvermittlung zwischen den Akteuren erfolgt vorwiegend durch Phosphorylierungen und Protein-Protein-Zusammenlagerungen. Die im Folgenden nur kurz charakterisierten Signalwegkomponenten wurden in Übersichtsartikeln detailliert dargestellt: Kastan et al. 2004, Motoyama et al. 2004, Li et al. 2005b, Reinhardt et al. 2009, aber auch: Iliakis et al. 2003, Sancar et al. 2004, Wilson 2004. Sofern nicht im Text genannt sind die vollständigen Protein- und Genbezeichnungen im Abkürzungsverzeichnis im Anhang aufgeführt.

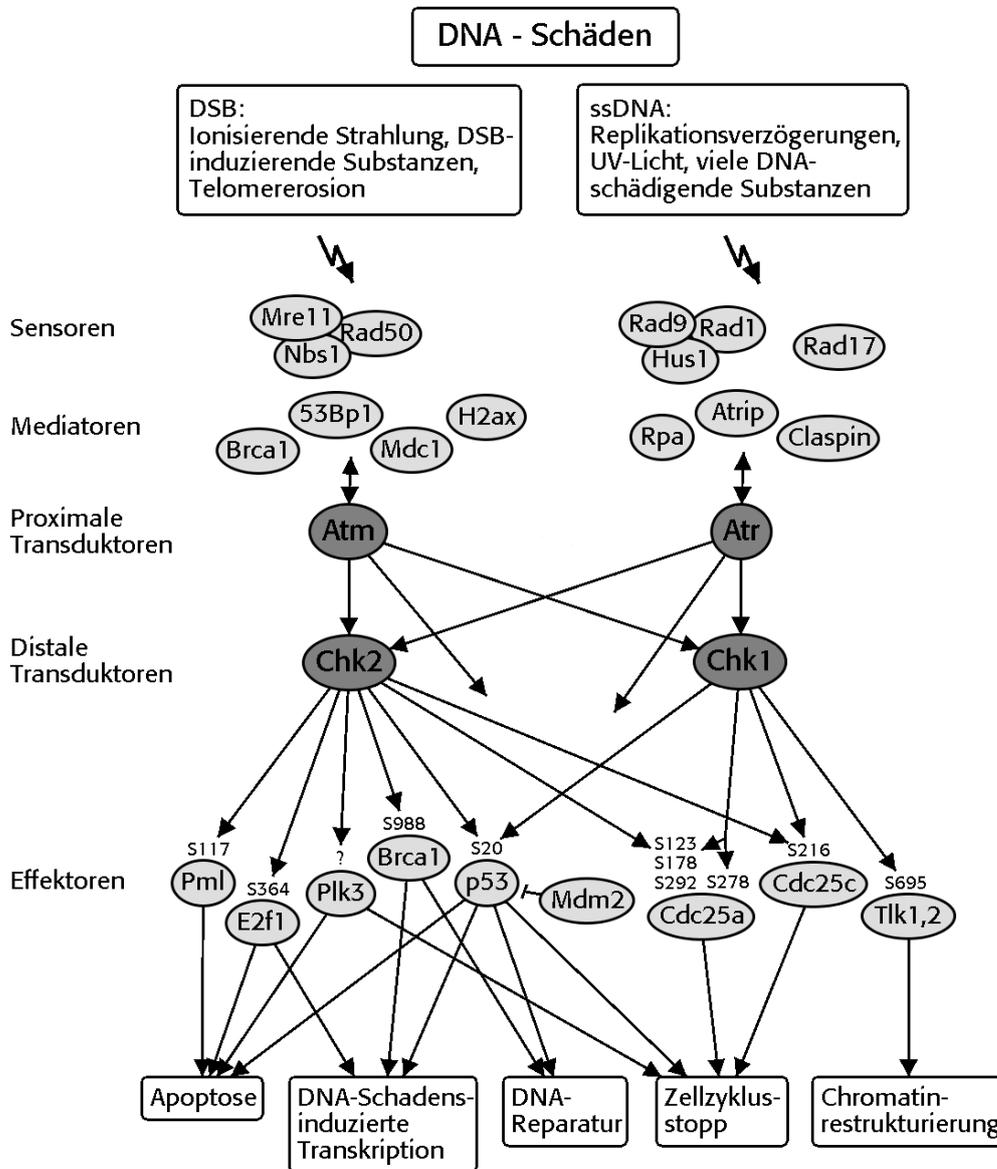
### Schadensensoren

Zu den Schadensensoren gehören der Rad17-RFC-Komplex, der Rad9-Rad1-Hus1- (9-1-1-) Komplex und der Mre11-Rad50-Nbs1- (MRN-) Komplex (Motoyama et al. 2004, Li et al. 2005b, Reinhardt et al. 2009). Der Rad17-RFC-Komplex ähnelt dem bei der DNA-Replikation auftretendem RFC-Komplex, der dort die homotrimeren Replikationsklammer PCNA auf die DNA lädt, die dann als Bindeglied für die DNA-Polymerasen und andere Replikationsproteine agiert. Tatsächlich formen die Komponenten des 9-1-1-Komplexes, Rad1, Hus1 und Rad9, mit dem Kofaktor Rad17 einen heterotrimeren Komplex analog zur PCNA-Replikationsklammer. Der Mre11-Rad50-Nbs1- (MRN-) Komplex lokalisiert sich zusammen mit Brca1 und H2ax an DNA-Doppelstrangbrüchen und ist nötig für die Einleitung der Schadenreparatur und ATM-Aktivierung. Viele Details der Schadenerkennung sind jedoch noch unklar.

### Mediatoren

Die Mediatoren regulieren die Aktivierung der proximalen Transduktorkinasen Atm und Atr und modulieren durch vielfältige Wechselwirkungen die Schadenantwort abhängig vom DNA-Schadentyp. Sie rekrutieren als Adaptermoleküle weitere Moleküle zum Schadenort, modifizieren die Substratauswahl für Atm und Atr, regulieren

möglicherweise auch Atm und Atr direkt und sind zum Teil selbst Substrate von Atm und Atr.



**Abbildung 6: Zentrale Signalwege der DNA-Schadenkontrollpunkte**

Sensoren und Mediatoren aktivieren die Transduktorkinasen Atm, Atr, Chk2, Chk1. Diese vermitteln durch Phosphorylierung vieler Effektorproteine die verschiedenen Antwortkomponenten (die Positionen phosphorylierter Serinreste sind angegeben). Doppelstrangbrüche (DSB) stimulieren vor allem den Atm-Chk2-Weg, ssDNA (single stranded DNA, Einzelstrang-DNA) und andere Schäden eher den Atr-Chk1-Weg. Atm und Atr phosphorylieren außer Chk2 und Chk1 auch Effektor- und Mediatorproteine. Für vollständige Protein-/Genbezeichnungen siehe Abkürzungsverzeichnis im Anhang.

Je nach Typ eines DNA-Schaden kommt es zur Aktivierung verschiedener Pfade der Kontrollpunktsignalwege (Kastan et al. 2004, Li et al. 2005b). Doppelstrangbrüche (durch ionisierende Strahlung oder radiomimetische Substanzen) sowie Telomererosion aktivieren vor allem Atr, das hauptsächlich auf Chk2 wirkt. Daher wird radioaktive Strahlung in vielen Untersuchungen zur Chk2-Funktion eingesetzt (Iliakis et al. 2003). Viele andere DNA-Schäden aktivieren dagegen überwiegend Atr, welches vorwiegend Chk1 stimuliert, darunter UV-Licht und viele chemische Substanzen, DNA-Einzelstrangbereiche und blockierte Replikationsgabeln (Paulsen et al. 2007, Dai et al. 2010).

An der Aktivierung von Atr sind Mdc1, 53Bp1, Brca1 und das Histonprotein H2ax beteiligt (Lavin et al. 2007), der Verlust eines dieser Proteine führt zu einer gestörten Kontrollpunktantwort und zu verstärkter Empfindlichkeit gegenüber DNA-Schäden. Ein interessanter Aspekt ist, dass sich an Doppelstrangbrüchen (zum Beispiel nach ionisierender Strahlung) die beteiligten Schadenantwortproteine, darunter der MRN-Komplex, Mdc1, 53Bp1 und Brca1, an den Schadenstellen stark konzentrieren. Um jeden Doppelstrangbruch bildet sich ein Schadenfokus, der nach spezifischer Markierung im Mikroskop sichtbar ist (Sancar et al. 2004, Li et al. 2005b). Für die Signalweitergabe über Atr werden Claspin, Atrp, Rpa, Brca1 und Mdc1 benötigt (Dai et al. 2010). Brca1, 53bp1 und Mdc1 enthalten sogenannte BRCT-Domänen (Brca1 C terminal repeat domains), Phosphoserin- oder Phosphothreonin-spezifische Bindungsmodule, die der Protein-Protein-Interaktion dienen. Wichtige Mediatorfunktionen haben außerdem auch der MRN-Komplex mit Nbs1 und Smc1. Die detaillierte Klärung der vielfältigen Wechselwirkungen bei der DNA-Schadenerkennung steht noch aus, nicht wenige der Mediatoren sind zudem außer an der Kontrollpunktaktivierung auch an anderen Prozessen beteiligt.

### **Proximale Signaltransduktoren**

Die zwei proximalen Signaltransduktoren Atr (ataxia telangiectasia mutated) und Atr (Atr und Rad3-related) sind beides Kinasen aus der Phosphatidylinositol 3-Kinase-(PI3K-) Familie. Sie bündeln und übertragen die Schadensignale durch Phosphorylierungen ihrer Zielproteine, dazu gehören neben Chk2 und Chk1 auch viele Mediator- und Effektorproteine, so phosphoryliert Atr auch Brca1, 53Bp1, Nbs1, H2ax, Fancd2, p53, Mdm2 und Smc1 (Kastan et al. 2004). Die Komplexität der beteiligten

Signalwege ist enorm, so fand eine Studie über 700 Proteine, die möglicherweise Atm- oder Atr-abhängig phosphoryliert werden (Matsuoka et al. 2007).

### **Distale Signaltransduktoren**

Die zwei distalen Signaltransduktoren Chk1 und Chk2 (checkpoint kinases, Kontrollpunktkinasen), manchmal auch als Effektorkinasen bezeichnet, sind zentrale Akteure der Signalverteilung. Sie leiten die Signale von den proximalen Kontrollpunktkinasen Atm und Atr auf die Effektoren weiter, die dann die verschiedenen Zellreaktionen vermitteln (Bartek et al. 2003, Reinhardt et al. 2009). Chk1 und Chk2 sind strukturell verschiedene, an Serin und Threonin phosphorylierende Kinasen. Sie agieren jedoch funktionell überlappend. So beobachtete man Kreuzaktivierungen (beispielsweise von Chk1 durch Atm nach radioaktiver Strahlung), und außerdem phosphorylieren Chk1 und Chk2 zum Teil die gleichen Zielproteine an den gleichen Positionen. Angemerkt sei, dass zumindest Atr und Chk1 neben der Vermittlung der DNA-Schadenantwort auch Aufgaben im ungestörten Zellzyklus haben (Zachos et al. 2007). Details zu Chk2 und Chk1 folgen in späteren Kapiteln.

### **Effektoren**

Die große Gruppe der Effektorproteine wird durch die Transduktoren Chk1, Chk2 und auch Atm, Atr phosphoryliert und übermittelt die Signale auf den Kern des Zellzykluskontrollsystems (die Cyclin-abhängigen Kinasen) und alle anderen betroffenen Prozesse (Bartek et al. 2003, Li et al. 2005b). Diese Gruppe umfasst die Cdc25-Phosphatasen (Cdc25a, b, c), Transkriptionsfaktoren wie p53 und E2f1, in die DNA-Reparatur involvierte Proteine wie Brca1 sowie Chromatinkomponenten und -Regulatoren wie das Histon H2ax und andere Moleküle. Zu den von Chk2 phosphorylierten Substraten zählen der Transkriptionsfaktor **p53** (Chehab et al. 2000, Hirao et al. 2000, Shieh et al. 2000), die Zellzyklus-regulierenden Phosphatasen **Cdc25a** (Falck et al. 2001b, Sorensen et al. 2003) und **Cdc25c** (Matsuoka et al. 1998, Blasina et al. 1999, Chaturvedi et al. 1999), das in der DNA-Reparatur bedeutsame **Brca1** (Lee et al. 2000, Zhang et al. 2004), der Zellzyklus regulierende und proapoptotisch wirkende Transkriptionsfaktor **E2f1** (Stevens et al. 2003) sowie die an der Apoptosevermittlung beteiligten Proteine **Pml** (Yang et al. 2002) und **Plk3** (Xie et al. 2002). Mögliche weitere Substrate von Chk2 sind Abl1, Bub1, Bub3, Psk-H1, Smc3, Plk1, Cdc25b, Dcamk11, Mre11, Pms1 und Xrcc9 (Seo et al. 2003).

Trotz dieser generellen hierarchischen Aufteilung operieren die Kontrollpunkte selten als einfache, lineare Signalwege. Sie enthalten oft Rückkopplungen und Querverbindungen und stellen aufgrund der Vielzahl der Komponenten ein hochkomplexes Regelungssystem dar, dies gilt insbesondere auch für Chk2 (Pommier et al. 2005). Es ist daher meist nicht möglich, für die einzelnen Proteine eine eindeutige Reihenfolge und Funktion im Signalweg anzugeben.

### **Zusätzliche Signalwege**

DNA-Schäden führen auch Atm/Atr-abhängig über die Hipk2-Kinase (nicht mit abgebildet) zur p53-Aktivierung und darüber zum breiten Spektrum p53-vermittelter proapoptotischer Effekte. Dabei hemmen Atm und Atr die Hipk2-Ubiquitinligase Siah1, wodurch Hipk2 stabilisiert und aktiviert wird. Hipk2 phosphoryliert dann Pml-abhängig p53 an Serin 46, was zur Aktivierung von p53 führt (Bitomsky et al. 2009, Puca et al. 2010). Die Regulation von p53 ist komplex (Vousden et al. 2009).

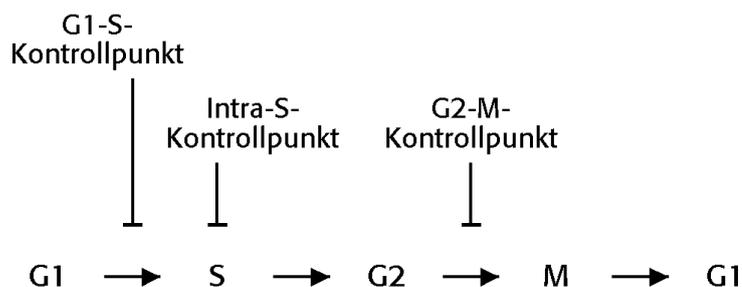
### **Chk2: ein interessantes Forschungsobjekt**

Ihre zentralen Rollen in den Kontrollpunktsignalwegen machen Chk1 und Chk2 (neben Atr und Atm) für die Tumorforschung besonders interessant, denn ihr Funktionsverlust könnte die DNA-Schadenantwort empfindlich stören und so eine Tumorprogression fördern. In präkanzerösen Läsionen und in Malignomen findet sich häufig eine konstitutive Aktivierung der DNA-Schadenantwortprogramme, insbesondere auch des Atm-Chk2-p53-Signalweges (Bartkova et al. 2005, Gorgoulis et al. 2005, Bartek et al. 2007a). Diese chronische Aktivierung lässt einen erhöhten Selektionsdruck für Mutationen in den beteiligten Genen erwarten. Mutationen von Chek2 (dem Chk2-kodierenden Gen) werden in Tumoren regelmäßig gefunden. Zellen ohne Chk2 sind lebensfähig und zeigen Veränderungen in der DNA-Schadenantwort. Dagegen hat Chk1 neben der Vermittlung der DNA-Schadenantwort auch Aufgaben im ungestörten Zellzyklus (Zachos et al. 2007) und ist unentbehrlich für die normale Entwicklung und Überlebensfähigkeit bei Säugern, denn Chek1-defiziente Mäuse (Chek1: das Chk1-kodierende Gen) sterben bereits embryonal (Takai et al. 2000, Liu et al. 2000). Knockdown von Chek1 in humanen Zellen durch RNA-Interferenz zeigte ebenfalls die Bedeutung von Chk1 für die normale S-Phase (Zhao et al. 2002, Sorensen et al. 2003). Zellen mit gestörter Chk1-Funktion sind wahrscheinlich oft nicht lebensfähig, dies erklärt auch das sehr seltene Auftreten von Chek1-Defekten in Tumoren. Interessanterweise

zeigen aktuelle Untersuchungen zur Tumorthherapie durch Chk1-Inhibition vielversprechende Ergebnisse (siehe Kapitel 6.5.1). Für diese Arbeit wurde Chk2 als Gegenstand gewählt. In den folgenden Abschnitten werden die verschiedenen Komponenten der DNA-Schadenantwort und die Rolle von Chk2 detailliert dargestellt. Für Übersichtsartikel zu Chk2 siehe: Bartek et al. 2001, Bartek et al. 2003, Ahn et al. 2004, Antoni et al. 2007.

### 2.2.3 Drei DNA-Schadenkontrollpunkte im Zellzyklus

Da je nach Zellzyklusphase verschiedene Kontrollpunkt-komponenten an der Schadenantwort beteiligt sind, unterscheidet man im Zellzyklus drei DNA-Schadenkontrollpunkte, an denen der Zellzyklus angehalten werden kann: den G1-S-, den Intra-S- und den G2-M-Kontrollpunkt (**Abbildung 7**) (Übersichtsartikel: Kastan et al. 2004, Lukas et al. 2004, Sancar et al. 2004). Der Zellzyklus kann dadurch unmittelbar vor der DNA-Replikation am G1-S-Übergang, während der DNA-Replikation in der S-Phase und vor der Mitose am G2-M-Übergang aufgehalten werden. Die Kontrollpunkte wirken damit in Phasen, in denen die Sicherstellung der Integrität der DNA entscheidend ist für deren fehlerfreie Verdopplung und Teilung.



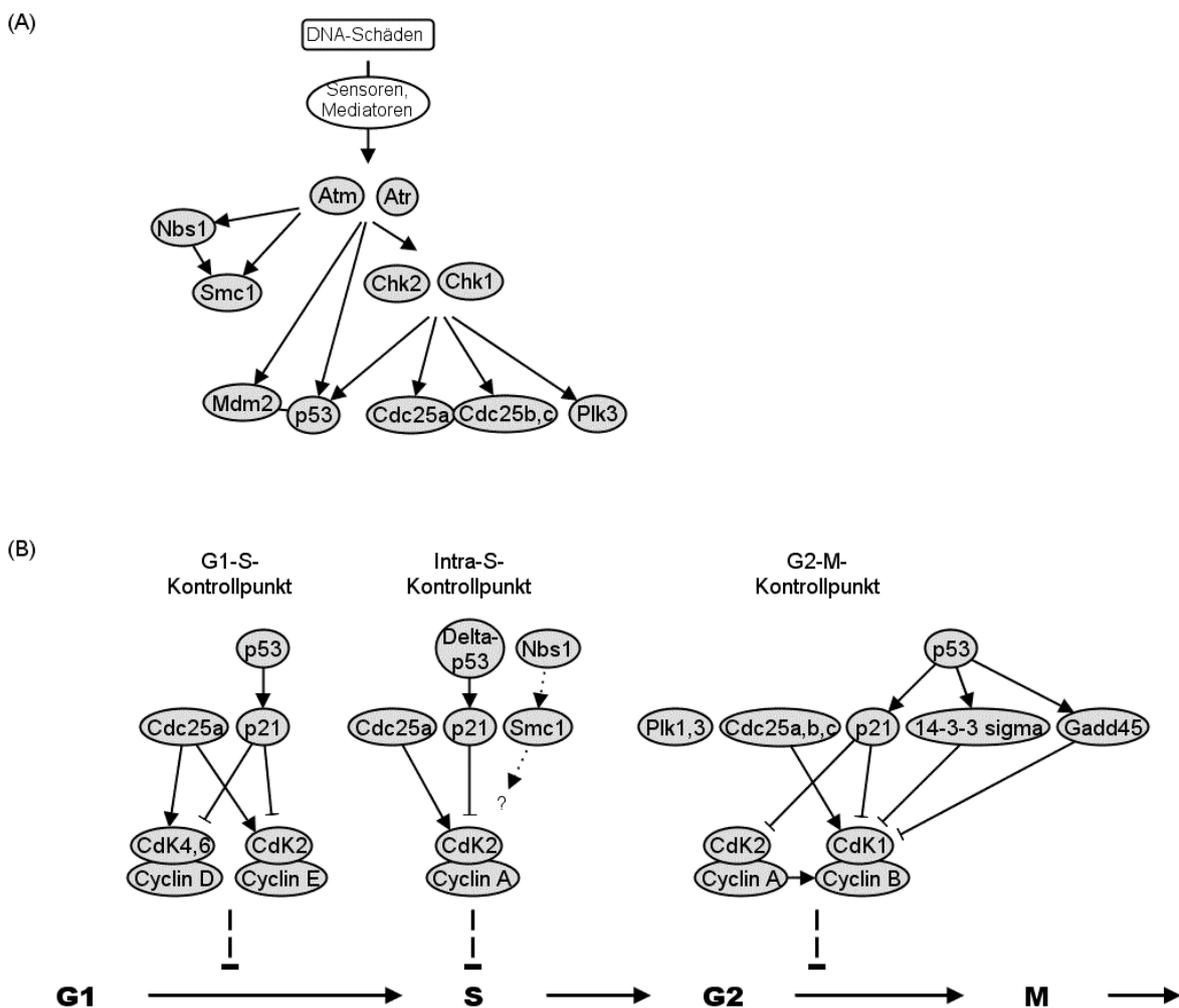
**Abbildung 7: Die DNA-Schadenkontrollpunkte**

Der Zellzyklus kann bei DNA-Schäden vor und während der DNA-Replikation (S-Phase) und vor der Mitose angehalten werden.

Die drei Kontrollpunkte teilen sich viele proximale Komponenten (die Sensoren, Mediatoren, Transduktoren), ihre individuellen Effekte ergeben sich durch die je nach Zellzyklusphase unterschiedlichen beteiligten Effektorproteine.

## G1-S-Kontrollpunkt

Der G1-S-Kontrollpunkt (auch G1-Kontrollpunkt genannt) verhindert bei DNA-Schäden den Eintritt in die S-Phase und die DNA-Replikation, und zwar unabhängig davon, ob der Restriktionspunkt überschritten wurde oder nicht (Kastan et al. 2004, Sancar et al. 2004). Bei DNA-Schäden in G1 werden die Transduktoren Atm, Atr und Chk2, Chk1 aktiviert, diese phosphorylieren sowohl Cdc25a als auch p53 und Mdm2, dadurch wird der Zellzyklus auf zwei Wegen aufgehhalten (**Abbildung 8**).



**Abbildung 8: Die Wirkungen der DNA-Schadenkontrollpunkte auf den Zellzyklus**

(A) Die Transduktorkinasen Atm, Atr, Chk2, Chk1 übertragen die DNA-Schadensignale auf Effektorproteine. (B) Diese wirken in unterschiedlichen Konstellationen in den verschiedenen Phasen des Zellzyklus und führen über die Hemmung der Cyclin-abhängigen Kinasen (CdKs) zum Zellzyklusarrest.

Phosphoryliertes Cdc25a wird verstärkt ubiquitiniert und im Proteasom abgebaut, somit inaktiviert. Dadurch wird die Cdc25a-vermittelte aktivierende Dephosphorylierung der Cdk2 verhindert, der aktiven Komponente im Cyclin E-Cdk2- und Cyclin A-Cdk2-Komplex. Der Übergang zur S-Phase und die DNA-Replikation sind damit blockiert. Die Phosphorylierungen von p53 und der Ubiquitinligase Mdm2, die normalerweise einen raschen Abbau von p53 bewirkt, führen zu einer Stabilisierung und Akkumulation von p53 und zur Steigerung dessen Aktivität als Transkriptionsfaktor. Der für den Zellzyklusstopp zentrale Effektor von p53 ist dann der Cdk-Inhibitor p21 (Waf1, Cip1). p21 blockiert vor allem den Cyclin D-Cdk4- und den Cyclin E-Cdk2-Komplex, verhindert darüber dann auch die Rb-abhängige Aktivierung von E2f und blockiert so ein Fortschreiten im Zellzyklus zur S-Phase.

Der Signalweg über Cdc25a wirkt im Vergleich zum p53-Weg wesentlich schneller, denn es finden dabei nur Protein-Protein-Wechselwirkungen statt. p53 dagegen stimuliert als Transkriptionsfaktor die Neusynthese von Proteinen, was mehr Zeit beansprucht (Lukas et al. 2004). Beide Wege ergänzen sich, da der Weg über Cdc25a den Zellzyklus nur vorübergehend für einige Stunden aufhalten kann, der p53-Weg, wenn auch verzögert, dagegen den Zellzyklus länger und sogar dauerhaft anhält. Interessanterweise entspricht der Zustand der Seneszenz einem dauerhaften Zellzyklusstopp, denn die Telomerveränderungen in seneszenten Zellen ähneln DNA-Doppelstrangbrüchen und lösen auch eine entsprechende Kontrollpunktantwort aus.

### **Intra-S-Kontrollpunkt**

Der Intra-S-Kontrollpunkt (auch Replikationskontrollpunkt genannt) hemmt in der S-Phase die DNA-Replikation bei neu auftretenden DNA-Schäden oder solchen, die dem G1-S-Kontrollpunkt entgangen sind. Er kann die DNA-Replikation nur vorübergehend aufhalten, hauptsächlich durch die Inhibierung noch nicht gestarteter Replikationsursprünge (Bartek et al. 2004, Kastan et al. 2004, Sancar et al. 2004). Der Intra-S-Kontrollpunkt ist unabhängig von p53, jedoch wurde eine Abhängigkeit von Delta-p53, einer p53-Isoform, gezeigt. Der Signalweg verläuft analog zu p53 über Delta-p53, p21, Cyclin A-Cdk und scheint spezifisch für den intra-S-Kontrollpunkt zu sein (Rohaly et al. 2005). Die weiteren am Intra-S-Kontrollpunkt beteiligten Signalwege sind noch nicht detailliert geklärt, aber es scheinen mindestens zwei verschiedene Wege involviert zu sein (Bartek et al. 2004). Zum einen wird die Cdk2, deren Aktivität für die

DNA-Replikation nötig ist, gehemmt über den Atm/Atr-Chk2/Chk1-Cdc25a-Weg, so wie beim G1-S-Kontrollpunkt beschrieben, insbesondere über Chk2 nach ionisierender Strahlung (Falck et al. 2001b). Zum anderen sind Atm, Nbs1 (Teil des MRN-Komplexes) und Smc1 in einen Signalweg involviert (Falck et al. 2002), (**Abbildung 8**). Offenbar phosphoryliert Atm Nbs1 und Nbs1-abhängig Smc1. Beide Phosphorylierungen sind erforderlich für eine intakte Kontrollpunktantwort. Welche Vorgänge daraufhin ausgelöst werden ist jedoch unklar. Weiterhin beteiligt am Intra-S-Kontrollpunkt sind 53Bp1, Brca1, Fancd2 und Mdc1, die neben ihrer Rolle als Mediatoren eventuell noch über weitere Mechanismen zur Kontrollpunktantwort beitragen. Noch zu klären ist, wie gestörte und gestoppte Replikationsgabeln wieder flott gemacht werden.

Ein gestörter Intra-S-Kontrollpunkt ist assoziiert mit dem Phänomen der **Strahlungs-resistenten DNA-Synthese** (RDS, radio-resistant DNA synthesis). Normale Zellen halten bei ionisierender Strahlung unverzüglich die DNA-Replikation an, Zellen mit gestörtem Intra-S-Kontrollpunkt tun dies nicht. Der RDS-Phänotyp ist zum Teil, aber nicht immer mit einer erhöhten Sterblichkeit der bestrahlten Zellen verbunden. RDS wurde zuerst beschrieben für Zellen von Patienten mit Ataxia telangiectasia (Painter et al. 1980), bei denen Atm mutiert ist. Seitdem wurde RDS auch in Zellen mit Defekten in zahlreichen anderen am Intra-S-Kontrollpunkt beteiligten Genen beobachtet, dazu gehören Atr, Chek1, Chek2 (die Chk1- bzw. Chk2-kodierenden Gene), Cdc25a, Brca1, Brca2, Fancd2, 53Bp1, Mre11, Nbs1 und andere (Überblick in: Bartek et al. 2004).

### **G2-M-Kontrollpunkt**

Der G2-M-Kontrollpunkt (oder G2-Kontrollpunkt) verhindert eine Mitose mit geschädigter DNA. Die während der S-Phase ansteigende Cyclin-A-Cdk2-Aktivität erreicht ihren Höhepunkt in der späten G2-Phase und kontrolliert den Übergang zur Mitose, insbesondere durch die Kontrolle der Cyclin B-Cdk1-Aktivierung (Lindqvist et al. 2009). Die Cyclin-B-Cdk1-Aktivität vermittelt dann den Mitoseeintritt (Lindqvist et al. 2009) und stellt den Angriffspunkt für mehrere sich ergänzende schnelle und langsame Signalwege dar (**Abbildung 8**) (Kastan et al. 2004, Sancar et al. 2004).

Über Atm/Atr-Chk2/Chk1 wird die Phosphatase Cdc25c phosphoryliert. Cdc25c wird dadurch an 14-3-3-Proteine gebunden und aus dem Kern exportiert und kann damit nicht die Cdk1 dephosphorylieren und aktivieren, der Eintritt in die Mitose wird behindert. Wahrscheinlich sind aber dazu noch weitere Proteine wie Plk1 und Plk3

(polo-like kinases) an der Regulation von Cdc25c und des Cyclin B-Cdk1-Komplexes beteiligt. Außerdem regulieren neben Cdc25c auch Cdc25a und Cdc25b die Cdk1-Aktivität am G2-M-Kontrollpunkt. Für Cdc25a geschieht dies sehr wahrscheinlich auf die gleiche Weise wie im G1-S-Kontrollpunkt, die Rolle von Cdc25b ist dagegen unklar, hier scheint die Kinase p38 beteiligt zu sein.

Ein weiterer Signalweg, der einen andauernden Zellzyklusstopp in G2 bewirken kann, ist der Atm/Atr-Chk2/Chk1-p53-Weg, ähnlich dem G1-S-Kontrollpunkt. An der Hemmung des Cyclin B-Cdk1-Komplexes sind hier neben p21 weitere p53-Effektoren beteiligt, so Gadd45 und 14-3-3-Proteine. Letztere führen zum Export des Cyclin B-Cdk1-Komplexes aus dem Zellkern. Allerdings sammeln sich auch viele p53-defiziente Zelltypen nach DNA-Schäden in G2 an, was darauf hinweist, dass weitere Mechanismen beteiligt sind, beispielsweise die Brca1-stimulierte Expression von p21 und Gadd45.

### **Weitere Kontrollpunkte**

Erwähnt sei hier noch der so genannte **S-M-Kontrollpunkt** (auch **Replikationskontrollpunkt**, nicht zu verwechseln mit dem Intra-S-Kontrollpunkt), der den Eintritt in die Mitose erst bei abgeschlossener DNA-Replikation zulässt. So wird eine vorzeitige Trennung der Chromosomen bei inkompletter oder blockierter DNA-Replikation beispielsweise durch blockierte Replikationsgabeln verhindert (Sancar et al. 2004). Die Details sind noch nicht vollständig geklärt, involviert sind der auch am G2-M-Kontrollpunkt beteiligte Atr-Chk1-Cdc25c-Weg, aber auch davon unabhängige Pfade (Brown 2003).

In der Mitose sorgt sodann der **Spindelanheftungs-Kontrollpunkt** dafür, dass die Schwesterchromatiden erst getrennt werden, wenn alle Chromosomen ordnungsgemäß an der Mitosespindel angeheftet sind. Er reagiert auf nicht angeheftete Kinetochore und führt zur Hemmung des Cdc20-APC-Komplexes (Castro et al. 2005, May et al. 2006, Diaz-Martinez et al. 2009).

### 2.2.4 Relevanz von Chk2 und Chk1 für die Kontrollpunktfunktion

Studien mit Chk2-defizienten Mäusen ergaben widersprüchliche Ergebnisse. In einem Modell zeigten Chk2-defiziente Mauszellen einen gestörten G2-M-Arrest nach ionisierender Strahlung (Hirao et al. 2000), aber keinen gestörten G1-S-Arrest (Jack et al. 2002). In anderen Chk2-defizienten Mausmodellen trat nach ionisierender Strahlung zwar eine Störung im G1-S-Kontrollpunkt, aber keine Störung im G2-M- oder S-Kontrollpunkt auf (Hirao et al. 2002, Takai et al. 2002). Es ist insgesamt unklar, inwieweit Chk2 für einen Zellzyklusarrest erforderlich ist, obwohl es fraglos in die Zellzykluskontrolle involviert ist.

Knockdown von Chk1 in humanen Zellen durch RNAi zeigte die Notwendigkeit von Chk1 zum einen in der normalen S-Phase und zum anderen für den S- und G2-M-Kontrollpunkt nach Einwirkung ionisierender Strahlung (Sorensen et al. 2003, Zhao et al. 2002, Gatei et al. 2003) und einiger DNA-schädigender Chemikalien (Xiao et al. 2003).

### 2.2.5 Chk2 und Seneszenz

Seneszenz ist ein Zellzustand permanenten Zellzyklusstopps und damit Ausdruck der Zellalterung. Neben der Unfähigkeit zur Vermehrung treten starke Veränderungen in Morphologie, Genexpression und Metabolismus der Zelle auf (Übersichten zur Seneszenz in: Ben-Porath et al. 2004, Campisi 2005, Shay et al. 2005).

#### Replikative Seneszenz

Differenzierte menschliche Zellen, beispielsweise Fibroblasten, stellen in Kultur nach ca. 30-100 Zellteilungen die Proliferation ein, dies nennt man replikative Seneszenz (Hayflick et al. 1961). Es wurde gezeigt, dass dieser Vorgang viele Gemeinsamkeiten mit der zellulären Schadenantwort auf DNA-Doppelstrangbrüche hat und abhängig ist von Chk2 und p53 (d'Adda di Fagagna et al. 2003, Gire et al. 2004, Shay et al. 2005). Es kommt bei der replikativen Seneszenz durch Inaktivität des Enzyms Telomerase zur zunehmenden Verkürzung und Strukturveränderung der Chromosomenenden, der Telomere. Wahrscheinlich löst eine dann auftretende Exposition der Chromosomenenden über Aktivierung der DNA-Schadenkontrollpunkte vergleichbar einem DNA-Doppelstrangbruch die Seneszenz aus. Stamm- und Vorläuferzellen

exprimieren im Gegensatz zu differenzierten Zellen Telomerase und unterliegen nicht der replikativen Seneszenz. Ist durch Mutationen die Seneszenz blockiert, so teilen sich auch differenzierte Zellen immer weiter, bis es schließlich bei stark verkürzten Telomeren zur genomischen Krise kommt, einem Zustand mit zahllosen chromosomalen Aberrationen und Chromosomenfusionen und massivem Zellsterben.

### **Stress-induzierte Seneszenz**

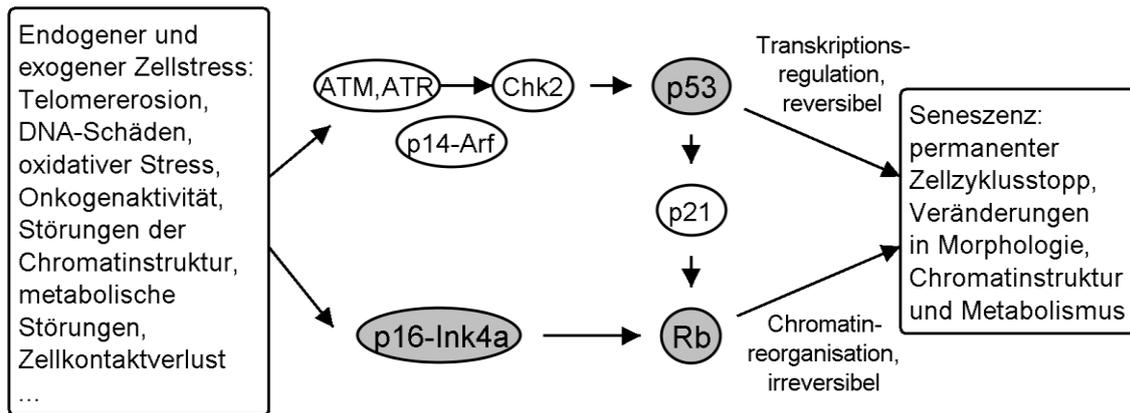
Seneszenz lässt sich in kultivierten Zellen auch durch eine Vielzahl von Stressarten induzieren (Lloyd 2002), dazu gehören DNA-Schädigungen, oxidativer Stress, Onkogenüberexpression, Störung der Chromatinstruktur und verschiedene metabolische Störungen. Verschiedene Stresssignale kumulieren dabei in ihrer Wirkung, und es tritt keine Telomerverkürzung auf. Die genauen Mechanismen sind noch unklar, aber dies geschieht sowohl p53-abhängig als auch -unabhängig. Man betrachtet replikative und Stress-induzierte Seneszenz zunehmend als zwei Varianten eines Prozesses.

### **Zwei Signalwege**

Zwei Signalwege sind zentral in der Vermittlung der Seneszenz, zum einen der Weg über p53 und zum anderen der über p16-Ink4a und Rb (**Abbildung 9**) (Ben-Porath et al. 2004, Campisi 2005, Shay et al. 2005). p53 und Rb sind beides Transkriptionsregulatoren mit zahlreichen Effektoren. Die Details der Signalwege sind bisher nicht geklärt. Der p53-Weg scheint vorwiegend durch Telomererosion, DNA-Schäden und Onkogenaktivierung aktiviert zu werden, und zwar zum einen durch den DNA-Schadensignalweg über Atm/Atr-Chk2/Chk1 (bei Telomererosion, DNA-Schäden) und zum anderen durch p14-Arf (bei Onkogenaktivität und anderen Stressarten). Der Rb-Weg wird bei vielen verschiedenen zellulären Stressarten stimuliert, darunter Chromatinschäden, Onkogenaktivierung und Zellkontaktverlust. Die Aktivierung geschieht durch p16-Ink4a über Hemmung des CdK4/6-Cyclin D-Komplexes. Der p53-Effektor p21 kann auch Rb aktivieren, somit besteht eine Quervernetzung der beiden Signalwege.

P53-vermittelte Seneszenz kann nicht durch physiologische Stimuli, aber in einigen Fällen durch Inaktivierung von p53 oder p21 rückgängig gemacht werden. Dies führt dann nach einer Anzahl von Zellteilungen zur Krise. Auch die gemeinsame Inaktivierung von ATM und ATR oder Chk1 und Chk2 kann die replikative Seneszenz rückgängig

machen (d'Adda di Fagagna et al. 2003). P16-Ink4a/Rb-vermittelte Seneszenz ist irreversibel, sie kann weder durch Inaktivierung von Rb oder p53 oder beiden oder p16-Ink4a umgekehrt werden. Man nimmt an, dass bei diesem Weg die Chromatinstruktur verändert wird, es zu Ausbildung von Heterochromatin und damit zu Inaktivierung zahlreicher Gene kommt.



**Abbildung 9: Seneszenz als Stressantwortprogramm**

Verschiedene zelluläre Stressarten wie Telomererosion und DNA-Schäden bewirken Seneszenz, den permanenten Zellzyklusstopp. Die verschiedenen Auslöser stimulieren verschiedene zelluläre Signalwege, die schließlich p53, Rb oder beide aktivieren.

## Die Bedeutung der Seneszenz

Die meisten bisherigen Ergebnisse beruhen auf Beobachtungen in vitro, die Bedeutung von Seneszenz in vivo ist unklar. Es handelt sich offenbar um ein kontrolliertes zelluläres Schadenantwortprogramm, dass bei verschiedenen Stressarten permanenten Zellzyklusstopp auslösen kann und damit die Proliferation geschädigter Zellen verhindert, ohne dass diese sterben müssen (Ben-Porath et al. 2004, Campisi 2005). Allerdings wird damit der Pool proliferationsfähiger Zellen im Gewebe vermindert. Überdies stören seneszente Zellen über ein verändertes Sekretionsmuster die Gewebearchitektur. Man diskutiert, dass Seneszenz an der Alterung von Geweben und des Gesamtorganismus beteiligt ist.

Da seneszente Zellen sich nicht weiter teilen können, versteht man Seneszenz als natürliche Abwehr gegen Onkogenese. Maligne Zellen müssen auf jeden Fall der

Seneszenz entgehen. Dies kann geschehen durch Telomeraseaktivierung oder durch Inaktivierung von p53, Chk2 oder anderer beteiligter Gene. Jedoch kann selbst in malignen Zellen oft noch Seneszenz induziert werden etwa durch exogene Einflüsse wie Strahlentherapie oder Chemotherapeutika. Es wurde zudem gezeigt, dass eine erzwungene Chk2-Überexpression in humanen Tumorzelllinien sowohl Seneszenz und Apoptose induzieren kann (Chen et al. 2005). Ein Stopp des Tumorwachstums durch Induktion von Seneszenz könnte eine künftige Therapiemöglichkeit bieten, kann sich aber auch negativ auswirken, falls die Zelle dadurch den therapiebedingten Zelltod abwenden und später die Seneszenz verlassen kann.

### **2.2.6 Chk2 und DNA-Reparatur**

Chk2 beeinflusst über Brca1 beide bekannten Varianten der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen, die homologe Rekombination (fehlerfrei) und die nichthomologe Endverbindung (teils fehlerhaft, mit zunehmenden Hinweisen auf einen präziseren, fehlerärmeren Subtyp). Beide Mechanismen werden durch Brca1 wesentlich reguliert und durch Chk2 über Brca1 beeinflusst (Lee et al. 2000, Zhang et al. 2004, Wang et al. 2006, Zhuang et al. 2006). Weiterhin phosphoryliert Chk2 den Transkriptionsfaktor Foxm1, was dessen Stabilität erhöht und zu verstärkter Transkription von Xrcc1 und Brca2 führt, die beide bei der DNA-Reparatur eine Rolle spielen (Tan et al. 2007).

### **2.2.7 Chk2 und Zelltod durch Apoptose oder Mitotische Katastrophe**

Bei starken DNA-Schäden, die die Kapazitäten der Zelle zur Reparatur und Erholung übersteigen, wird Apoptose ausgelöst. Eine zentrale Rolle dabei spielt p53, das sowohl durch Chk2 als auch Chk2-unabhängig aktiviert wird. Chk2 phosphoryliert p53 in seiner N-terminalen Aktivierungsdomäne an Ser20 und Thr18 (Chehab et al. 2000, Shieh et al. 2000, Hirao et al. 2000, Takai et al. 2002). p53 wird dadurch stabilisiert und aktiviert, und reguliert über seine zahlreichen Effektoren dann außer Zelltod auch DNA-Reparatur und Zellzyklus. Bei Chk2-defizienten Mauszellen ist die p53-abhängige Apoptose nach ionisierender Strahlung gestört (Hirao et al. 2000, Hirao et al. 2002, Jack et al. 2002, Takai et al. 2002). Es existieren aber auch p53-unabhängige Wege der Apoptosevermittlung durch Chk2 über Pml (Yang et al. 2002) und den

Transkriptionsfaktor E2f1, der die p53-Familienmitglieder p63 und p73 aktiviert, die dann ähnlich wie p53 die Transkription verschiedener Bcl-2-Proteine beeinflussen (Roos et al. 2006, Schmitt et al. 2007, Graupner et al. 2011). Auch sind noch weitere Chk2-Zielmoleküle wie Plk3 an der Apoptosevermittlung beteiligt. Die erzwungene Überexpression von Chk2 in humanen Tumorzellen kann sowohl Apoptose als auch Seneszenz induzieren (Chen et al. 2005). Chk2 hat in diesem Sinne eine proapoptotische Wirkung.

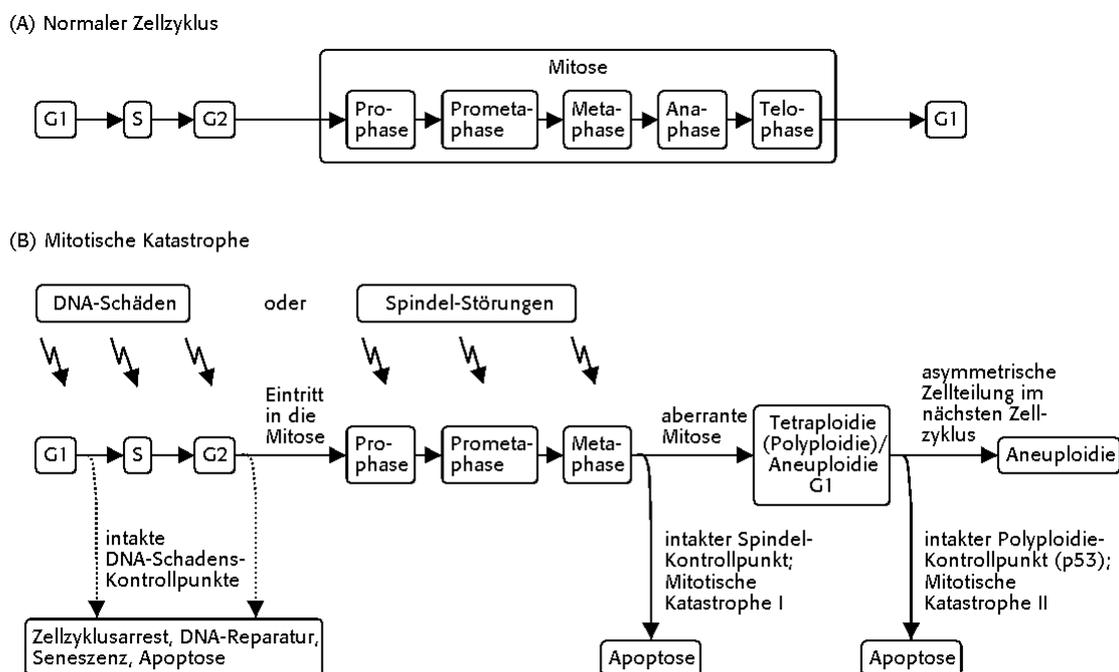
Allerdings findet sich nach ionisierender Strahlung in Tumorzellen auch bei Inhibition von Chk2 eine erhöhte Apoptoserate (Yu et al. 2001). Da Tumorzellen bereits Kontrollpunktdefekte aufweisen, führt der zusätzliche Verlust der Chk2-Kontrollfunktion zu einem Übermaß an irreparablen DNA-Schäden und infolgedessen zum Zelltod. Eine Erklärung dafür bietet das Konzept der Mitotischen Katastrophe, eine Variante des Zelltodes, die der Apoptose sehr ähnelt und während einer misslungenen Mitose stattfindet.

### **Zelltod durch Mitotische Katastrophe**

Die Mitotische Katastrophe ist ein Zelltod, der während der Mitose bei DNA- oder Mitosespindelschäden eintritt und dem Schutz der genetischen Integrität der Zelle dient (Übersichten in: Castedo et al. 2004a, Okada et al. 2004). Es gibt trotz grundlegender Unterschiede viele Überschneidungen mit der Apoptose, die genauen Vorgänge sind noch nicht geklärt. An der Kontrolle der Mitotischen Katastrophe sind viele Zellzyklusmoleküle der Mitose beteiligt. Dazu zählen die Cdk1, die Plk- (polo-like kinases, Polo-ähnliche Kinasen) Familie (Plk 1, 2, 3), die Aurora-Kinasenfamilie (Aurora A, B, C), Bub und Bub1, die NIMA-Familie (Nek1 bis 11). Außerdem sind Survivin, Mitglieder der Bcl2-Familie, p53, Caspasen und Kontrollpunktproteine, auch Chk2, beteiligt. Defekte all dieser Gene finden sich oft in Tumoren. Normalerweise verhindert bei DNA-Schäden der G2-M-Kontrollpunkt die Aktivierung der Cdk1 und damit den Eintritt in die Mitose. Es ist daher nicht überraschend, dass die Schädigung dieses Kontrollpunktes durch Inaktivierung beteiligter Gene verstärkt zu Mitotischer Katastrophe führt. Dies wurde gezeigt für Chk2 (Castedo et al. 2004b), Atm, Atr, Chek1 (Chen et al. 2003), p53 (Bunz et al. 1998) und 14-3-3- $\sigma$  (Chan et al. 1999).

Innerhalb der Mitotischen Katastrophe führen zwei Wege zum Zelltod (**Abbildung 10**). Der erste löst während oder nahe der Metaphase Zelltod aus, ist p53-unabhängig und

beinhaltet Caspase-2-Aktivierung. Diese Variante tritt unter anderem bei Chk2-Inaktivierung auf (Castedo et al. 2004a, Castedo et al. 2004b). Der zweite Weg löst Zelltod in G1 aus, wenn die Mitose fehlschlug und die Trennung der Chromatiden und des Zellkörpers nicht korrekt vollzogen wurde. Dies geschieht vor allem bei Spindelschädigung, z. B. experimentell durch den Mikrotubulushemmer Paclitaxel. Die Zellen beenden die Mitose dann tetraploid und stoppen oder sterben p53-abhängig. Es handelt sich offenbar um einen p53-abhängigen Polyploidie-Kontrollpunkt in G1, bei dem bei Tetra- oder Polyploidie Zellzyklusstopp oder Zelltod vermittelt wird.



**Abbildung 10: Mitotische Katastrophe**

(A) normaler Zellzyklus. (B) Mitotische Katastrophe. Die Mitotische Katastrophe ist ein Zelltod während der Mitose bei DNA- oder Spindelschäden. Es existieren zwei Subtypen: Zellen sterben entweder nahe der Metaphase (bei defektem G2-M-Kontrollpunkt) oder führen eine inkomplette Mitose durch, die zu Tetraploidie führt, und sterben dann p53-abhängig in G1. Störungen der Mitotischen Katastrophe begünstigen die Entstehung aneuploider Zellen.

## 2.3 Die molekulare Struktur und Aktivierung von Chk2

Chk2 (das Chk2-kodierende Gen, vollständiger Name: Chk2 checkpoint homolog, *S. pombe*) erstreckt sich über 50 Kilobasen auf Chromosom 22, Abschnitt 22q12.1, und enthält in der vorherrschenden Transkriptvariante 14 Exons, die zusammen 1632 Basen

umfassen und 543 Aminosäuren kodieren (**Tabelle 5**), die Gensequenz ist im Anhang aufgeführt (Matsuoka et al. 1998, Brown et al. 1999, Blasina et al. 1999, siehe auch Datenbanken: UniProt 2008, Gene 2008, Ensembl 2008, UniProt-Consortium 2007, CCDS 2012, Maglott et al. 2007, Hubbard et al. 2007, Pruitt et al. 2009).

**Tabelle 5: Übersicht über die 14 Chek2-Exons**

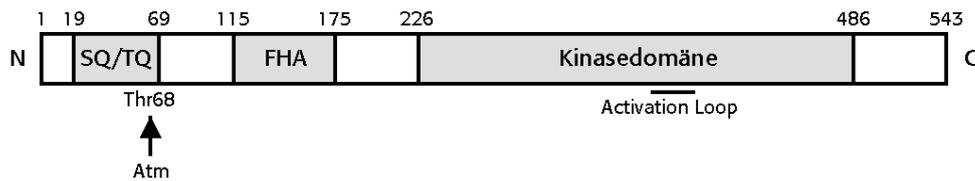
Exon	Position auf Chromosom 22	Position im Chek2-Transkript (bp)	Länge (bp)
1	29130391 - 29130709	001 - 319	319
2	29121231 - 29121355	320 - 444	125
3	29120965 - 29121112	445 - 592	148
4	29115383 - 29115473	593 - 683	91
5	29107897 - 29108005	684 - 792	109
6	29105994 - 29106047	793 - 846	54
7	29099493 - 29099554	847 - 908	62
8	29095826 - 29095925	909 - 1008	100
9	29092889 - 29092975	1009 - 1095	87
10	29091698 - 29091861	1096 - 1259	164
11	29091115 - 29091230	1260 - 1375	116
12	29090020 - 29090105	1376 - 1461	86
13	29085123 - 29085203	1462 - 1542	81
14	29083885 - 29083974	1543 - 1632	90

Quellen siehe Text.

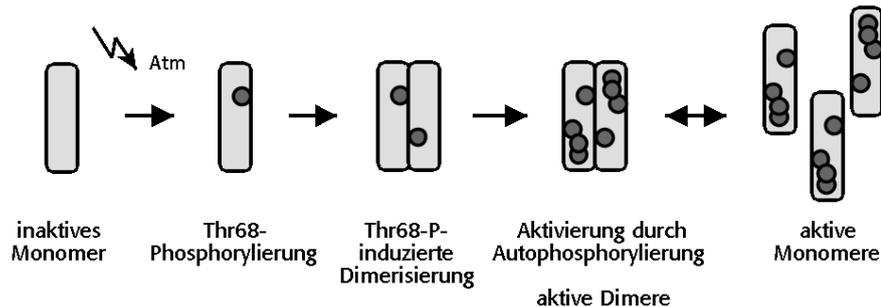
Es wurden in Tumorzellen noch weitere Splice-Varianten von Chek2 mit fehlenden oder auch zusätzlichen Exons beschrieben (Staalesen et al. 2004). Außer dem funktionellen Gen auf Chromosom 22 existieren mehrere hochgradig homologe, aber nicht funktionelle Pseudogene auf anderen Chromosomen, die die Mutationsanalyse komplizieren (Sodha et al. 2000).

Das Chk2-Protein besteht aus drei funktional verschiedenen Domänen (**Abbildung 11 (A)**), einem SQ/TQ-Motiv, einer forkhead-assoziierten (FHA) Domäne und einer Ser/Thr-Kinasedomäne (Bartek et al. 2003, Ahn et al. 2004).

## (A) Struktur des Chk2-Proteins



## (B) Chk2-Aktivierung auf molekularer Ebene

**Abbildung 11: Chk2-Struktur und -Aktivierung**

(A) Das humane Chk2-Protein besteht aus drei Domänen, dem SQ/TQ-Motiv, der FHA-Domäne und der Kinasedomäne. Die Zahlen bezeichnen die Aminosäurenummern. (B) Die molekularen Vorgänge bei der Aktivierung von Chk2.

Das am N-Terminus gelegene SQ/TQ-reiche Motiv hat regulatorische Funktionen. Es enthält fünf SQ- und zwei TQ-Gruppen (Serin bzw. Threonin gefolgt von Glutamin), dies sind bevorzugte Stellen für die Phosphorylierung durch Atm und Atr. Die FHA-Domäne dient dynamischen Protein-Protein-Interaktionen, vor allem zwischen Chk2 und dessen Regulatoren und Effektoren, aber möglicherweise auch innerhalb des Chk2-Proteins selbst. Durch die Kinasedomäne werden die Chk2-Zielproteine an Serin oder Threonin phosphoryliert.

In inaktiver Form liegt Chk2 als Monomer vor. Der initiale Schritt der Aktivierung ist die Phosphorylierung durch Atm an Thr68 im SQ/TQ-Motiv. Auch Atr kann nach starken DNA-Schäden Chk2 phosphorylieren und wahrscheinlich auch die DNA-abhängige Proteinkinase (DNA-PK) (Li et al. 2005a). Chk2 bildet daraufhin Dimere (Ahn et al. 2002, **Abbildung 11 (B)**), in denen es zu multiplen intermolekularen Phosphorylierungen kommt, darunter an Thr383 und Thr387 in der Aktivierungsschleife (activation loop) der Kinasedomäne, wodurch die Kinasefunktion aktiviert wird. Zur

vollen Aktivierung ist die Autophosphorylierung an Ser516 nötig. Die Chk2-Moleküle dissoziieren wieder voneinander und liegen sodann als aktive Monomere vor.

Interaktionen mit anderen Kontrollpunktproteinen, insbesondere den Mediatoren, modulieren die Chk2-Aktivität, die funktionelle Bedeutung dieser Wechselwirkungen ist aber zum großen Teil noch nicht geklärt. Beispielsweise bindet Mdc1 selektiv an Thr68-phosphoryliertes Chk2. Plk1 (polo-like kinase 1) kann Chk2 an verschiedenen Stellen phosphorylieren, inklusive Thr68, auch Plk3 interagiert mit Chk2 und es wurden gegenseitige Phosphorylierungen von Plk3 und Chk2 beobachtet (Tsvetkov 2004). Weiterhin spielen ebenfalls 53Bp1, der MRN-Komplex und Nbs1 eine Rolle bei der Chk2-Aktivierung. Ein detailliertes Verständnis dieser vielfältigen Interaktionen wird in Zukunft sehr hilfreich sein.

### **Die Aktivierung von Chk1**

Das funktionell, aber nicht strukturell mit Chk2 verwandte Chk1 wird durch Phosphorylierung in seiner SC-reichen C-terminalen Region aktiviert, hauptsächlich durch Atr, aber auch durch Atm (Bartek et al. 2003, Dai et al. 2010). Diese Phosphorylierungen führen anscheinend direkt zur Aktivierung von Chk1. Für eine optimale Aktivierung ist die Mitwirkung weiterer Faktoren nötig, darunter Brca1, Claspin und der 9-1-1-Komplex mit seinem Kofaktor Rad17.

## **2.4 Chk2 in niederen Organismen**

Das zuerst identifizierte Mitglied der Familie der Chk2-verwandten Kontrollpunktkinasen war Rad53, 1994 identifiziert in der Sprosshefe als an vielen Kontrollpunktantworten beteiligte Kinase (Allen et al. 1994). Homologe von Rad53 wurden dann in der Spaltheife *Schizosaccharomyces pombe* (genannt Cds1, Murakami et al. 1995) und höheren Eukaryoten gefunden (Oishi et al. 1998, Guo et al. 2000, Higashitani et al. 2000, MacQueen et al. 2001, Oishi et al. 2001). Das humane Homologe, genannt Chk2, wurde 1998/99 durch mehrere Labore identifiziert (Matsuoka et al. 1998, Blasina et al. 1999, Brown et al. 1999, Chaturvedi et al. 1999, Tominaga et al. 1999). Die generelle Struktur der Chk2-homologen Proteine ist in allen Eukaryoten ähnlich, inklusive *Caenorhabditis elegans* und *Drosophila melanogaster*. In einigen Organismen übt Chk2 zum Teil Funktionen aus, die sich nicht im Menschen und der Maus finden.

Beispielsweise ist das Chk2-Homologe in *C. elegans*, Cds, essenziell für die Rekombination während der Meiose (Oishi et al. 2001), eine Funktion, die in anderen Organismen nicht auftritt.

## **2.5 Defekte im Atm-Chk2-Signalweg in humanen Tumoren**

Wie im Folgenden ausgeführt sind Störungen des Atm-Chk2-Signalwegs in allen Signalweg-Abschnitten bedeutsam für die Onkogenese.

### **2.5.1 Atm-Keimbahnmutationen verursachen Ataxia-Telangiectasia und erhöhen leicht das Brustkrebsrisiko**

Defekte von Atm, dem wichtigsten Aktivator von Chk2, sind mit Tumorerkrankungen assoziiert. So liegen der Ataxia-Telangiectasia biallele Defekte im Atm-Gen zugrunde (Savitsky et al. 1995, OMIM 2088a). Klinische Zeichen dieser autosomal-rezessiv vererbten Erkrankung sind progrediente zerebelläre und extrapyramidal-motorische Störungen, Teleangiectasien, Immundefekte mit IgG- und IgA-Mangel und eine Prädisposition zu Tumoren. Häufig treten dabei Lymphome und lymphatische Leukämien auf, aber auch solide Tumoren wie Medulloblastome und Gliome kommen vor. Die Zellen sterben auffällig leicht durch ionisierende Strahlung, ihre DNA-Synthese ist dabei abnorm resistent gegen die Inhibition durch ionisierende Strahlung. Beides ist durch eine gestörte Kontrollpunktfunktion von Atm gut erklärbar.

Atm-Mutationen, die biallel auftretend die Ataxia-Telangiectasia hervorrufen, erhöhen bei monoallelen Trägern das Brustkrebsrisiko moderat, etwa um den Faktor 2 bis 5 (Swift et al. 1987, Thompson et al. 2005, Renwick et al. 2006).

### **2.5.2 Atm-Mutationen bei sporadischen Tumoren**

Somatische Atm-Mutationen werden bei sporadischen Tumoren gefunden, im Wesentlichen bei Leukämien und Lymphomen. So bei T-Pro-Lymphozytenleukämien (TPLL, Vorechovsky et al. 1997), B-Non-Hodgkin-Lymphomen (BNHL, Vorechovsky et

al. 1997), Mantelzell-Lymphomen (MCL, Schaffner et al. 2000, Stilgenbauer et al. 1999) und B-Zell-chronisch-lymphatischen Leukämien (B-CLL, Schaffner et al. 1999).

### **2.5.3 Viele Chk2-Effektoren sind tumorkritische Gene**

Auch viele der Chk2-Effektoren sind als tumorkritische Gene bekannt, beispielsweise Mdm2 und Cdc25A als Proto-Onkogene und p53, Brca1, E2f1 und Pml als Tumorsuppressorgene (Bartek et al. 2003, Motoyama et al. 2004, Stolz et al. 2011).

### **2.5.4 Kongenitale Chk2-Varianten: Bedeutung für Li-Fraumeni-Syndrom, Mammakarzinom und weitere Tumorarten**

#### **Li-Fraumeni-Syndrom**

Das Li-Fraumeni-Syndrom (LFS) ist ein familiäres Tumorsyndrom, bei dem vor allem Brustkrebs und Sarkome auftreten. Beim LFS finden sich typischerweise p53-Keimbahnmutationen (OMIM 2008f). Die bei einigen Familien mit LFS oder LFS-Varianten und p53-Wildtyp gefundene 1100delC-Keimbahnmutation in Chek2 (Bell et al. 1999, Vahteristo et al. 2001, OMIM 2008g) wurde anfangs als krankheitsverursachend für diese Fälle angenommen. Allerdings tritt diese Genvariante mit einer Häufigkeit von ca. 1,1 bis 1,4% auch in der Allgemeinbevölkerung auf (Vahteristo et al. 2002, Meijers-Heijboer et al. 2002) und kann damit nicht die Hauptursache für das sehr penetrant vererbte LFS bzw. dessen Varianten sein. Auch andere Chek2-Mutationen wurden beim LFS gefunden (Lee et al. 2001), die geringe gemeinsame Segregation mit Tumoren in den betroffenen Familien spricht auch da gegen eine wesentliche krankheitsverursachende Bedeutung (Sodha et al. 2002).

#### **Mammakarzinom**

Die Chek2-1100delC-Mutation erhöht das Brustkrebsrisiko zwei- bis dreifach, bei familiärem Brustkrebs sogar bis fünffach, damit stellt Chek2 ein Brustkrebs-Risikogen moderater Penetranz dar (Metaanalyse in Weischer et al. 2008). Das kodierte Chk2-Protein ist dabei verkürzt, die Kinasedomäne und damit Aktivität fehlen (Wu et al. 2001). Neben 1100delC werden auch andere Chek2-Mutationen gehäuft bei

Brustkrebspatientinnen gefunden (Shuen et al. 2011, Zhang et al. 2011). Für eine ausführliche Diskussion der Bedeutung von Chek2 für das Brustkrebsrisiko bei Frauen und auch Männern siehe Kapitel 6.4.1.

### **Andere Tumorarten**

Bei Prostatakarzinomen wurden neben sporadischen auch verschiedene Keimbahnmutationen von Chek2 gehäuft nachgewiesen (Dong et al. 2003, Seppala et al. 2003, Cybulski et al. 2004). Inzwischen wurde für weitere Tumorarten eine Assoziation mit Chek2-Keimbahnmutationen beschrieben, so für Tumoren von Blase (Zlowocka et al. 2008), Kolon/Rektum (Cybulski et al. 2004, Kilpivaara et al. 2006), Ovar (Szymanska-Pasternak et al. 2006), Nieren und Schilddrüsen (Cybulski et al. 2004).

### **2.5.5 Chk2-Mutationen bei sporadischen Tumoren**

Mutationen des Chek2-Gens werden in geringer Häufigkeit bei vielen verschiedenen Tumorarten gefunden, so bei Karzinomen von Brust (Sullivan et al. 2002, Meijers-Heijboer et al. 2002), Lunge (Haruki et al. 2000, Miller et al. 2002), Prostata (Dong et al. 2003), Kolon (Ingvarsson et al. 2002), Ovar (Miller et al. 2002, Ingvarsson et al. 2002) und Vulva (Reddy et al. 2002), sowie bei Lymphomen (Tort et al. 2002) und Osteosarkomen (Miller et al. 2002). Chek2-Mutationen werden dabei stets in deutlich weniger als zehn Prozent der Fälle gefunden, im Mittel bei 4 bis 5 Prozent. Meist liegen Missense- oder verkürzende Mutationen vor, betroffen sind alle drei Domänen von Chk2.

### **2.5.6 Chk1-Defekte in Tumoren**

Chk1-Defekte werden in Tumoren extrem selten gefunden (Bartek et al. 2003). Aufgrund der vitalen Bedeutung von Chk1 auch für den normalen Ablauf des Zellzyklus sind Zellen mit gestörter Chk1-Funktion wahrscheinlich meist nicht lebensfähig.

### 3 Fragestellung

Die Zellzyklus-Kontrollpunktkinase Chk2 ist ein zentraler Signalverteiler der DNA-Schadenkontrollpunkte. Aktiviert hauptsächlich durch Atm reguliert Chk2 über verschiedene Substrate die Zellantwort auf DNA-Schäden, die Zellzyklusarrest, DNA-Reparatur oder auch Apoptose bedeuten kann.

Störungen der DNA-Schadenkontrollpunkte begünstigen die Onkogenese. Der Chk2-Aktivator Atm und viele der Chk2-Effektoren sind als tumorkritische Gene bekannt. Auch Chek2 (das Chk2-kodierende Gen) ist ein tumorkritisches Gen, denn eine gestörte Chk2-Funktion wird in sporadischen Tumoren vieler verschiedener Gewebe gefunden, zudem erhöhen angeborene Chek2-Veränderungen das Brustkrebsrisiko.

In dieser Arbeit sollte daher das Chek2-Gen in einer Reihe humaner Tumorzelllinien auf Mutationen analysiert werden. Zum einen sollten hierdurch Erkenntnisse zur Bedeutung von Chk2 in der Onkogenese und Tumorbologie gewonnen werden. Zum anderen war das Ziel, Erkenntnisse über die analysierten Zelllinien zu gewinnen, da diese in der Tumorforschung häufig als Modellsysteme eingesetzt werden und die Kenntnis ihres Chek2-Mutationsstatus für die Erklärung Zelllinien-spezifischer Effekte hilfreich sein kann.

Untersucht wurden Zelllinien von Kolonkarzinomen, Mammakarzinomen, Leukämien und Lymphomen und einigen anderen Tumorarten. Besonderes Interesse galt dabei den Lymphomen und Leukämien, da Mutationen des unmittelbaren Chk2-Aktivators Atm besonders mit diesen Tumoren assoziiert sind.

## 4 Material und Methoden

### 4.1 Überblick

Es wurde nach Mutationen im Chek2-Gen in 47 humanen Tumorzelllinien gesucht. Die Zelllinien umfassten hämatologische Tumoren, Kolonkarzinome, Mammakarzinome und andere. Nach Extraktion der genomischen DNA aus den vorliegenden Zellpellets wurden die interessierenden Genabschnitte durch Polymerasekettenreaktion (PCR) amplifiziert und mittels Single-Strand Conformation Polymorphism Analyse (SSCP-Analyse) auf Mutationen gescreent. Auffällige Proben wurden dann sequenziert, um Mutationen zu bestätigen und zu spezifizieren.

Die 1632 bp umfassende Vergleichssequenz für Chek2 und entsprechende Referenzen finden sich im Anhang. Die Zelllinie DU 145 diente als Wildtypkontrolle bei SSCP-Analyse und Sequenzierung. Das Chek2-Gen erstreckt sich über 50 Kilobasen auf Chromosom 22, Abschnitt 22q12.1, und umfasst 14 Exons, die jeweils einzeln amplifiziert wurden. Da außer dem funktionellen Gen auf Chromosom 22 mehrere nicht funktionelle, aber hochgradig homologe Pseudogene auf verschiedenen Chromosomen existieren (Sodha et al. 2000) muss ein Weg gefunden werden zu vermeiden, dass diese Pseudogene aufgrund der hohen Homologie mit der Mutationsanalyse interferieren. Die Primer für die PCR wurden deshalb so gewählt, dass sie ausschließlich an das funktionelle Chek2-Gen auf Chromosom 22 binden. Dies war problemlos möglich für die Exons 1 bis 9, jedoch nicht für die Exons 11 bis 14. Auf deren Analyse musste verzichtet werden. Für Exon 10 konnte ein Primerpaar gefunden werden, das mit ausreichender Spezifität an das funktionelle Gen bindet, da in allen Pseudogenen die Bindungsstellen für den forward-Primer in mindestens 1 Base und für den reverse-Primer in mindestens 2 Basen von der richtigen Sequenz abweichen. Dafür musste der reverse-Primer innerhalb des Exons positioniert werden, so dass nur der erste Teil von Exon 10 mit einer Länge von 91 Basen in die Analyse einbezogen werden konnte. Die oft für Chek2 beschriebene Mutation 1100delC liegt in diesem Abschnitt in Exon 10 und konnte somit in die Analyse einbezogen werden.

Die gesamte kodierende Frequenz von Chek2 umfasst 1632 Basen. Die in dieser Arbeit analysierten Abschnitte umfassen davon die Basen 1 bis 1187. Der Ausschluss des

restlichen Teils aus der Mutationsanalyse ist eine bedeutende Einschränkung. Es existieren Verfahren, das Problem homologer Pseudogene zu umgehen, zum Beispiel mit einer nested-PCR (einer verschachtelten PCR mit zwei Primerpaaren und zwei aufeinander folgenden Durchläufen, wobei die zweite PCR das Ziel aus dem Produkt der ersten PCR amplifiziert), darauf wurde im Rahmen dieser Arbeit verzichtet.

Die Intron-Exon-Übergänge wurden mit amplifiziert und gingen mit in die SSCP-Analyse ein, aber bei der Sequenzierung auffälliger Proben wurden ausschließlich die Sequenzen der Exons analysiert, angrenzende Intron-Bereiche blieben unberücksichtigt.

Die Expression und Funktion eines Gens kann durch Mutationen in verschiedenen Bereichen verändert werden. Dazu gehören neben den Exons, die die Information für die Proteinsequenz kodieren, auch genregulatorische DNA-Regionen und Intronsequenzen, die das Spleißen steuern. In dieser Arbeit wurden ausschließlich die Exons analysiert.

## 4.2 Analysierte Tumorzelllinien

Es wurden 47 humane Tumorzelllinien analysiert (**Tabelle 6**), die meisten davon hämatologische Tumoren, Kolonkarzinome oder Mammakarzinome. Angegeben sind bekannte p53- und andere Mutationen. Zu den drei Mammakarzinomlinien MATU, MT-1 und MT-3 konnten die davon abgeleiteten therapieresistenten Unterlinien MATU/ADR, MT-1/ADR und MT-3/ADR ebenfalls in die Analyse eingeschlossen werden (Stein et al. 1997). Von der Kolonkarzinomlinie HCT-116 wurden zwei vorhandene Versionen (a) und (b) analysiert. DLD-1 und HCT-15 sind zwei syngene Linien, gewonnen vom selben Kolonkarzinom. Die Zelllinien wurden ursprünglich bezogen von: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) GmbH, Braunschweig, Deutschland.

Tabelle 6: Analyisierte Zelllinien

Zelllinie	Tumorart	Erstbeschreibung	p53- und weitere bekannte Mutationen (Exon; Codon)
<b>Leukämien und Lymphome</b>			
CTV-1	AML	Chen et al. 1984	
EHEB	B-CLL, EBV-pos.	Saltman et al. 1990	
HD-MY-Z	Hodgkin-Lymphom	Bargou et al. 1993	
HL-60	AML	Gallagher et al. 1979	p53-Ms. (7;248) (O'Connor et al. 1997)
JVM-2	B-CLL (B-PLL)	Melo et al. 1986	
JVM-3	B-CLL (B-PLL)	Melo et al. 1986	
K-562	CML in Blastenkrise	Lozzio et al. 1975	p53-Ins. (5;136): Stopp bei Cod. 148 (Neubauer et al. 1993)
KASUMI-1	AML	Asou et al. 1991	
KU-812	CML in Blastenkrise	Kishi 1985	p53-Ms. (5;132) (Jia et al. 1997)
L-591	Hodgkin-Lymphom	Diehl et al. 1985	
LAMA-87	CML in Blastenkrise	Champelovier et al. 1994	
MOLT-3	T-ALL	Minowada et al. 1972	
MOLT-4 (MOLT-4 pcDNA3)	T-ALL	Minowada et al. 1972	p53-Ms. (7;248) (Rodrigues et al. 1990)
NALM-6	B-ALL	Hurwitz et al. 1979	
PLB-985	AML	Tucker et al. 1987, Subklon von HL-60 (Drexler et al. 2003)	
RAJI	Burkitt-Lymphom (B-Non-Hodgkin-Lymphom)	Pulvertaft 1964	p53-Ms. (7;234 und 6;213) (Farrell et al. 1991, Duthu et al. 1992)
REH	B-ALL	Rosenfeld et al. 1977	
SKW-3	T-CLL	Hirano et al. 1979	
U-937	histiozytisches Lymphom	Sundstrom et al. 1976	p53-Del. (5;172): Stopp bei Cod. 231 (Sugimoto et al. 1992)
<b>Kolonkarzinome</b>			
DLD-1	Kolonkarzinom, vom selben Tumor wie HCT-15	Dexter et al. 1979	p53-Ms. (7;241) (Rodrigues et al. 1990), Chek2-Ms. (2;145 und 5;247) (Grigorova et al. 2004)

Zelllinie	Tumorart	Erstbeschreibung	p53- und weitere bekannte Mutationen (Exon; Codon)
HCT-15	Kolonkarzinom, vom selben Tumor wie DLD-1	Dexter et al. 1979	p53-Ms. (7;241 und 5;153) (Cottu et al. 1996, O'Connor et al. 1997), Chek2-Ms. (2;145 und 5;247) (Bell et al. 1999, Lee et al. 2001)
HCT-116 (a) HCT-116 (b) (2 Versionen)	Kolonkarzinom	Brattain et al. 1981	hMLH1-Mutation homozygot (Papadopoulos et al. 1994), Ras-Mutation Cod. 13 (Jiang et al. 1989)
LOVO	Kolonkarzinom	Drewinko et al. 1976	
LS-174T	Kolonkarzinom	Tom et al. 1976	
SW-48	Kolonkarzinom	Leibovitz et al. 1976	p53-Ms. (7;248) (Yoshikawa et al. 1999)
SW-480	Kolonkarzinom	Leibovitz et al. 1976	p53-Ms. (8;273 und 9;309), Ras-Mutation Cod. 12 (Nigro et al. 1989, Rodrigues et al. 1990)
SW-620	Kolonkarzinom	Leibovitz et al. 1976	p53-Ms. (8;273) (Rodrigues et al. 1990)
<b>Mammakarzinome</b>			
BT-20	Mammakarzinom	Lasfargues et al. 1958	p53-Ms. (5;132) (Bartek et al. 1990)
BT-549	Mammakarzinom	Coutinho et Lasfargues 1978, nicht publiziert (Lacroix et al. 2004)	p53-Ms. (7;249) (Bartek et al. 1990)
DU-4475	Mammakarzinom	Langlois et al. 1979	
HBL-100	Mammakarzinom	Gaffney 1982	
MATU	Mammakarzinom	Widmaier et al. 1974, Hambly et al. 1997, HELA-kontaminiert (MacLeod et al. 1999)	
MATU/ADR	Mammakarzinom, multiresistente MATU-Unterlinie	Stein et al. 1997	
MCF-7	Mammakarzinom	Soule et al. 1973	
MDA-MB-231	Mammakarzinom	Cailleau et al. 1974	p53-Ms. (8;280) (Bartek et al. 1990)
MT-1	Mammakarzinom	Naundorf et al. 1992, Hambly et al. 1997, HELA-kontaminiert (MacLeod et al. 1999)	
MT-1/ADR	Mammakarzinom, multiresistente MT-1-Unterlinie	Stein et al. 1997	
MT-3	Mammakarzinom	Naundorf et al. 1992, Hambly et al. 1997	

Zelllinie	Tumorart	Erstbeschreibung	p53- und weitere bekannte Mutationen (Exon; Codon)
MT-3/ADR	Mammakarzinom, multiresistente MT-3-Unterlinie	Stein et al. 1997	
T-47D	Mammakarzinom	Keydar et al. 1979	p53-Ms. (6;194) (Nigro et al. 1989)
<b>Sonstige</b>			
293 (HEK-293)	Embryonale Nierenzelllinie, Adenovirus-Typ-5-transformiert	Graham et al. 1977	
DU-145 (DU145bax#7)	Prostatakarzinom	Stone et al. 1978	p53-Ms. (6;223 und 8;274) (Isaacs et al. 1991)
EPG-85-257	Magenkarzinom	Dietel et al. 1990	
RCC-AB	Klarzellkarzinom Niere	nicht publiziert, siehe CLS: <a href="http://www.cell-lines-service.de">www.cell-lines-service.de</a>	
SAOS-2	Osteogenes Sarkom	Fogh 1975, Fogh et al. 1977	
U-2-OS	Osteosarkom	Ponten et al. 1967	

47 humane Tumorzelllinien wurden analysiert. Zu den drei Mammakarzinomlinien MATU, MT-1 und MT-3 wurden ebenfalls die davon abgeleiteten therapieresistenten Unterlinien MATU/ADR, MT-1/ADR und MT-3/ADR untersucht. Von der Kolonkarzinomlinie HCT-116 wurden zwei Versionen (a) und (b) analysiert. DLD-1 und HCT-15 sind zwei vom selben Tumor gewonnene syngene Kolonkarzinomlinien. Ms. = Missense, Ins. = Insertion, Del. = Deletion. Zahlen in Klammern geben die Nummern des betroffenen Exons und Codons an. Cod. = Codon, ALL = Akute Lymphatische Leukämie, CLL = Chronische Lymphatische Leukämie, PLL = Prolymphozyten-Leukämie, AML = Akute Myeloische Leukämie, CML = Chronische Myeloische Leukämie.

## 4.3 Methoden

### 4.3.1 Extraktion der genomischen DNA

Die genomische DNA wurde aus bereits gewaschenen Zellpellets mit dem Invisorb Spin Cell Mini Kit der Firma Invitex nach dem Protokoll des Herstellers extrahiert:

- 1. Lyse der Zellen:** Zugabe von 500 µl Lysepuffer D und Inkubation bei Raumtemperatur für 5 Minuten, dabei wiederholtes Vortexen.
- 2. DNA-Bindung:** Zugabe von 10 µl der gut durchmischten Trägersuspension B und 200 µl Bindungspuffer HL. Kurzes Mischen und Übertrag der Suspension auf einen Spin Filter in einem 2.0 ml Reaktionsgefäß. Inkubation für 2 Minuten, dann Zentrifugation für 3 Minuten bei 12000 U/min und Verwerfen des Filtrats.

3. **Waschen:** Zugabe von 550 µl Waschpuffer, Zentrifugation für 1 Minute bei 12000 U/min und Verwerfen des Filtrats. Wiederholung dieses Schritts. Danach Zentrifugation für 3 Minuten bei 12000 U/min zur Entfernung des restlichen Ethanols.
4. **Elution:** der DNA: Überführen des Spin-Filters in ein neues 1.5 ml Reaktionsgefäß, Zugabe von 200 µl auf 70 °C vorgewärmten Elutionspuffers D und Inkubation für 2 Minuten. Zentrifugation bei 10000 U/min für 2 Minuten.
5. **Aliquotierung und Lagerung** der DNA bei -20 °C.

### 4.3.2 Polymerasekettenreaktion

Mit der Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR) wurden die interessierenden Bereiche der extrahierten DNA vervielfältigt, um ausreichend Material für die weiteren Analysen zur Verfügung zu haben. Bei der PCR, eingeführt 1985 (Saiki et al. 1985, Mullis et al. 1986), definieren zwei Oligonukleotide (Primer) durch ihre Basensequenzen Start- bzw. Endpunkt des zu vervielfältigenden DNA-Abschnittes. Sie werden in ihrer Sequenz so gewählt, dass sie sich spezifisch an jeweils einen der beiden komplementären DNA-Einzelstränge anlagern. In jedem Reaktionszyklus synthetisiert die eingesetzte DNA-Polymerase beginnend an den Primern komplementäre Kopien der vorliegenden DNA-Stränge. Diese dienen dann im nächsten Zyklus selbst als Vorlage für weitere Kopien, so dass sich im Idealfall die Anzahl der DNA-Kopien pro Zyklus verdoppelt. Diese exponentielle Amplifikation erzeugt in etwa 30 bis 35 Zyklen ausreichend DNA-Material für die weiteren Analysen. Jeder PCR-Zyklus besteht aus den drei Teilprozessen Trennung der DNA-Doppelstränge (Denaturierung), Primer-Anlagerung (Annealing) und DNA-Neusynthese (Elongation). Die Abfolge der Schritte wird durch die Reaktionstemperatur gesteuert, dies wird möglich durch die hohe Arbeitstemperatur der eingesetzten Taq-DNA-Polymerase von ca. 70 °C.

#### Die PCR der Chek2-Exons

Die Exons 2 bis 9 von Chek2 wurden inklusive der Intron-Exon-Übergänge mit je einem Primerpaar amplifiziert. Für das längere Exon 1 wurden zwei überlappende Fragmente

generiert, da die SSCP-Analyse kurze DNA-Stränge erfordert. Von Exon 10 konnte aufgrund der existierenden homologen Pseudogene wie oben beschrieben nur der vordere Teil amplifiziert werden. Die verwendeten Primer und die Charakteristika der Amplifikate sind in **Tabelle 7** dargestellt. Die in der PCR benutzten Annealing-Temperaturen und Magnesium-Konzentrationen sind in **Tabelle 8** aufgeführt. Durchgeführt wurde die PCR auf verschiedenen Thermocyclern (siehe Abschnitt Geräte) mit dem in **Tabelle 9** gezeigten standardisierten Programm. Den Reaktionsansatz gibt **Tabelle 10** wieder.

**Tabelle 7: PCR-Primer**

Exon	Primersequenz 5' - 3'	Exonlänge	Fragment-position	Fragmentlänge
1a	f: AAGTCTTGTGCCTTGAAAC r: AGAGCTGGAGTGAGAGGAC	319 bp	-57 -> ex171	228 bp
1b	f: CAGCACGATGCCAAACTC r: TCTGAACAAAACGTGATACTATACA		ex129 -> +39	230 bp
2	f: GAAATTCAACAGCCCTCTGATG r: CAGCTCTCCTAGATAACATGGGTATT	125 bp	-40 -> +35	200 bp
3	f: GAGCTGGTAATTTGGTCATTG r: CCATATTCTGTAAGGACAGGACA	148 bp	-89 -> +86	323 bp
4	f: CAGTGATCGCCTCTTGTGAAT r: CAGAAATGAGAAACCACCAATC	91 bp	-59 -> +73	223 bp
5	f: CATTGAGACAATCACTATCTTTGTT r: GTGTTAATAAAAAGGTGATCAGCC	109 bp	-36 -> +39	184 bp
6	f: CAGCCTTGAGTCAACTGAGTTT r: CTGAAAGGCTTTATACTCTTCTCA	54 bp	-92 -> +72	218 bp
7	f: TGGGAGTTTCTCACTACTTTCC r: AAGGCAAGCCTACATTAGATTC	62 bp	-45 -> +83	190 bp
8	f: AGGAATGAACCCCTTGCCCTT r: AGCTGTCAAAAAGAATTGAGGGC	100 bp	-35 -> +31	166 bp
9	f: CTGCATGAATCTGAGGGTCAT r: CTACAGGAATAGCCACATACAGAA	87 bp	-39 -> + 38	164 bp
10a	f: AGAAACTGATCTAGCCTACGTGT r: GAACTTCAGGCGCCAAGT	164 bp	-102 -> ex91	193 bp

f: forward-Primer, r: reverse-Primer. Bei der Positionsangabe bezeichnet -1 die letzte Base des vorangehenden Introns, +1 die erste Base des nachfolgenden Introns und ex1 die erste Base im Exon. Exon 1 wurde in zwei überlappenden Teilen 1a und 1b amplifiziert, von Exon 10 wurde nur ein Teil analysiert.

**Tabelle 8: PCR-Reaktionsbedingungen**

<b>Exon</b>	<b>Annealing-Temperatur</b>	<b>Magnesiumkonzentration</b>
1a	55 °C	2,0 mM
1b, 2 bis 8	55 °C	1,5 mM
9	55 °C	2,5 mM
10a	60 °C	2,5 mM

**Tabelle 9: PCR-Programm**

<b>Reaktionsschritt</b>	<b>Temperatur</b>	<b>Dauer</b>
Initiale Denaturierung	94°C	5 min
35 Zyklen Amplifikation:	Denaturierung	94°C
	Primer-Annealing	siehe Tabelle 8
	Elongation	72°C
Finale Elongation	72°C	7 min
Pause	10°C	Pause

Beim Design der Primer halfen folgende Programme (siehe auch unter 4.4.1): BLAT (University of California Santa Cruz, USA), LALIGN (Swiss EMBnet, Swiss Institute of Bioinformatics, Schweiz) und Web Primer (Saccharomyces Genome Database, Stanford University, USA). Die Primer wurden synthetisiert durch die Firma BioTeZ, Berlin.

Die Ergebnisse der PCR wurden mittels Agarosegelelektrophorese überprüft. Dabei bestand die Gellösung je nach Größe der aufzutrennenden Fragmente aus 1 bis 2 % Agarose in TAE-Puffer. Zum Anfärben der DNA wurden vor dem Erstarren zu 100 ml Agaroselösung 1 µl Ethidiumbromidlösung (5 mg/ml) zugegeben. Als Ladungspuffer für

den Probenauftrag diente der Agarosegel-Ladungspuffer der Firma Sigma-Aldrich. Die Elektrophorese erfolgte dann mit TAE-Puffer bei 100 V in der Elektrophoresekammer Agagel Midi-Wide der Firma Biometra. Die Fragmentlängen konnten durch den Vergleich mit einer DNA-Leiter abgeschätzt werden. Zur Dokumentation der Gele dienten das System Gel Doc mit UV-Transilluminator der Firma Bio-Rad und die Software Quantity One 4.0.2 Macintosh.

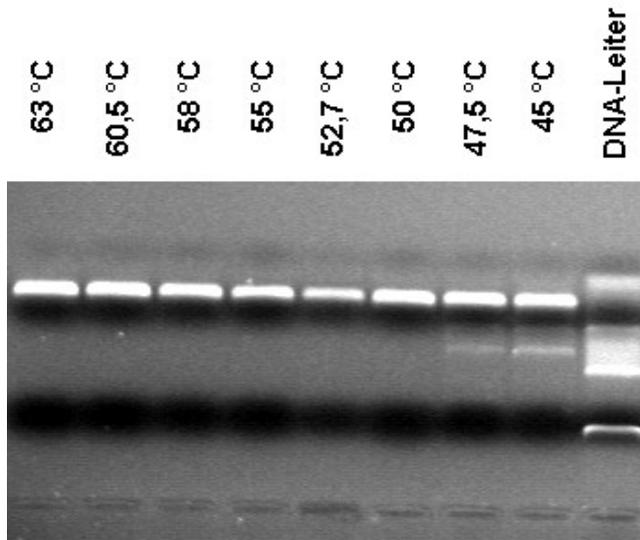
**Tabelle 10: PCR-Ansatz, Gesamtvolumen 50 µl**

---

PCR-10x-Puffer (500 mM Tris-HCl, 160 mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 0,1 % Tween 20, pH 8,8)	5 µl
dNTPs (je 12,5 mM)	je 0,4 µl (je 100 µM im Ansatz)
Primer (je 50 µM)	je 0,5 µl (je 25 pmol)
Taq-DNA-Polymerase (5 U/µl)	0,3 µl (1,5 U)
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	1,5 - 2,5 µl (entsprechend Tabelle 8)
DNA	0,5 - 1,0 µl
PCR-Aqua dest.	bis zu einem Gesamtvolumen von 50 µl

---

Magnesium-Konzentration und Annealing-Temperatur für die PCR wurden in Versuchsreihen optimiert. Die Primerpaare der Exons 1b, 2 bis 9 funktionierten sehr gut ohne unspezifische Banden über einen weiten Bereich, etwa von 47 °C bis 60 °C. Für Exon 1a und 9 waren Veränderungen der Magnesiumkonzentration nötig, um gute Amplifikationen zu erreichen. **Abbildung 12** zeigt für Exon 9 die hohe Spezifität des Primerpaares über einen großen Temperaturbereich. Die Primer für Exon 1a arbeiten spezifisch in einem ähnlich breiten Temperaturbereich, die für Exon 1b bis 8 in einem noch breiteren. Die höhere Annealing-Temperatur von 60 °C beim Exon 10a ist nötig, um die bei niedrigen Temperaturen stattfindende Primer-Bindung an Pseudogene zu vermeiden.



**Abbildung 12: Die Primer für Exon 9 arbeiten spezifisch über einen weiten Temperaturbereich**

Exon 9 wurde bei verschiedenen Temperaturen amplifiziert und die Produkte auf einem Agarosegel aufgetrennt. Zur Größeneinordnung wurde auf der Bahn ganz rechts eine DNA-Leiter (eine Mischung aus DNA-Stücken definierter Länge) aufgetragen. Man sieht, dass zwischen 50 °C und 63 °C nur ein Produkt entstand, unter 50 °C zusätzliche weitere Produkte durch unspezifische Primerbindung an anderen DNA-Stellen. Die dunklen Banden entstanden durch Zusätze im Laufpuffer der Agarosegelelektrophorese.

### 4.3.3 Single-Strand Conformation Polymorphism (SSCP) Analysis

Die single strand conformation polymorphism analysis (SSCP-Analyse, Einzelstrang-Konformations-Polymorphismus-Analyse) ist eine einfache und effektive Methode zum Screening auf Mutationen in vorliegenden DNA-Abschnitten, erstmals beschrieben von Orita et al. (Orita et al. 1989a, 1989b). Die durch die PCR amplifizierte, doppelsträngige DNA wird bei hohen Temperaturen denaturiert, es bilden sich DNA-Einzelstränge. Durch schnelles Abkühlen (bei nicht denaturierenden Bedingungen) falten diese Einzelstränge sich zurück in eine Konformation, die durch ihre Basensequenz bestimmt ist. Diese Konformation und damit die Basensequenz bestimmen bei der anschließenden elektrophoretischen Auftrennung in einem nicht denaturierenden Polyacrylamid-Gel die Mobilität. Sequenzunterschiede führen so zu unterschiedlichen Bandenmustern. Die DNA wird nach der Elektrophorese zur Auswertung durch eine geeignete Färbemethode sichtbar gemacht, in dieser Arbeit durch Silberfärbung. Durch den Vergleich des Bandenmusters mit einer Referenzprobe kann eine Mutation erkannt werden und eventuell auf Homo-, Hemi- oder Heterozygotie geschlossen werden. Da

sich keine Rückschlüsse auf die Position und Art der Mutation ziehen lassen, ist die Sequenzierung auffälliger Proben notwendig.

Bei DNA einer identischen Sequenz entstehen zwei Banden, da jeder der beiden komplementären Einzelstränge eine Bande erzeugt, Mutationen führen zu verschobenen Banden. Beim gleichzeitigen Vorliegen mehrerer genetischer Varianten, zum Beispiel durch heterozygote Mutation oder im Gemisch mehrerer Zellen, treten Kombinationen mehrerer Bandenmuster auf. Auch bei reiner DNA können mehr als zwei Banden entstehen wenn ein Einzelstrang mehrere mögliche Konformationen annehmen kann. Zudem bildet sich stets eine zusätzliche Bande durch verbliebene ungetrennte Doppelstrang-DNA.

Die SSCP-Analyse kann Mutationen bis zum Austausch einer einzigen Base detektieren. Allerdings nimmt die Sensitivität mit steigender Länge der untersuchten DNA-Fragmente ab. Sie wird für Fragmente bis 200 bp mit ca. 70-95% angegeben und sinkt für Fragmente über 400 bp auf unter 50% (Grompe 1993). Eine andere Untersuchung gibt die SSCP-Sensitivität für Fragmente bis 200 bp mit 90% und für 300-350 bp mit 80% an (Hayashi et al. 1993). Durch mehrfache SSCP-Analysen mit variierten Bedingungen, insbesondere durch Variation von Elektrophoresetemperatur und Glycerolgehalt des Gels, kann die Sensitivität deutlich erhöht werden und steigt bei fünf kombinierten Analysebedingungen auf praktisch 100% (Buzin et al. 2000).

### **Die SSCP-Analyse für Chek2**

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die SSCP-Analyse in 10%-igen Polyacrylamid-Gelen in TBE-Puffer durchgeführt. Die Elektrophorese für die Exons 2, 3, 4 und 6 lief bei 10°C, für die restlichen Exons 1a, 1b, 5, 7, 8, 9 und 10a bei 22°C. Alle weiteren Elektrophoresebedingungen und die Gelzusammensetzung waren für alle Exons gleich. Mehrfache Analysen durch Variation der Bedingungen wurden nicht durchgeführt. Pro Gel wurden 5 ml 40%-ige Acrylamid-Bisacrylamid (29:1)-Stammlösung, 4 ml 5xTBE-Puffer und 11 ml Aqua bidest. gemischt, 125 µl 10%-iges APS und 25 µl TEMED hinzugefügt um die Polymerisation einzuleiten, und das Gel im Format 26 cm x 12,5 cm x 1 mm auf einer Trägerfolie zwischen zwei Glasplatten gegossen.

Anhand des Agarosegelbildes wurde der DNA-Gehalt der PCR-Produkte abgeschätzt. 2 bis 12 µl pro Probe wurden mit 6 µl SSCP-Ladungspuffer gemischt, für 5 Minuten auf 96 °C erhitzt, 5 Minuten auf Eis abgekühlt und auf das Gel aufgetragen. Die Auftrennung

erfolgte in der Gelelektrophoresekammer Multiphor II von Amersham Pharmacia Biotech mit angeschlossener Temperaturregelung bei 800 V über 1 bis 2 Stunden.

### **Silberfärbung der SSCP-Gele**

Die Silberfärbung zur Visualisierung der DNA-Fragmente wurde mit dem Plus One DNA Silver Staining Kit und dem Hoefer Automated Gelstainer der Firma Amersham Biosciences nach folgendem Protokoll durchgeführt:

1. **Fixieren:** 250 ml Fixierlösung (Benzensulfonsäure 0,6 % w/v in 24 % v/v Ethanol) für 30 Minuten.
2. **Färben:** 250 ml Färbelösung (Silbernitrat 0,2 % w/v, Benzensulfonsäure 0,07 % w/v) für 30 Minuten.
3. **Spülen:** 250 ml Aqua dest. für 3 Minuten.
4. **Entwicklung:** 250 ml Entwicklerlösung (Natriumcarbonat 2,5 % w/v, Formaldehyd 0,037 % w/v, Natriumthiosulfat 0,002 % w/v) für 3 bis 8 Minuten.
5. **Stopp:** Stopplösung (Essigsäure 1 % v/v, Natriumacetat 5 % w/v, Glycerol 10 % v/v) für mindestens 30 Minuten.

Anschließend wurden die Gele luftgetrocknet und in Folie archiviert.

### **4.3.4 Sequenzierung**

Die DNA-Sequenzierung ermittelt die genaue Basenfolge eines DNA-Abschnittes. Das Kettenabbruchverfahren nach Sanger et al. (Sanger et al. 1977) ist dafür eine effiziente Methode. Ähnlich der PCR werden in einem Reaktionsansatz von dem zu sequenzierenden DNA-Einzelstrang mit einer Polymerase komplementäre Kopien hergestellt. Man benutzt jedoch nur einen Primer und zusätzlich zu den vier Desoxyribonukleotiden (dNTPs) dATP, dTTP, dGTP, dCTP deren Didesoxyformen (ddNTPs). Der zufällige Einbau eines ddNTPs statt eines dNTPs in die entstehende Kette führt zum Kettenabbruch. So entsteht ein Gemisch mit DNA-Fragmenten unterschiedlicher Länge, deren jeweils letztes Nukleotid durch ein ddNTP gebildet wurde. Da die vier ddNTPs durch vier Fluoreszenzfarbstoffe mit verschiedenen Wellenlängenmaxima gekennzeichnet sind, lässt sich durch elektrophoretische

Auftrennung und Fluoreszenzmessung für jede Fragmentlänge ermitteln, welches der vier ddNTPs angehängt wurde. So erhält man die Base, die an der Position im ursprünglichen DNA-Abschnitt steht, die der Fragmentlänge entspricht. Aus den Informationen über alle Fragmente erhält man die Sequenz der eingesetzten DNA-Probe. Da es bei dem Kettenabbruchverfahren zu keiner exponentiellen Vervielfältigung kommt, muss in der Sequenzierreaktion ausreichend DNA eingesetzt werden.

### **Proben**

Alle in der SSCP-Analyse auffälligen Proben wurden sequenziert. Bei den ersten Proben wurde durch eine zweite PCR das Produkt der ersten PCR weiter vervielfältigt, um genügend Material für die Sequenzierung zu erzeugen. Im Verlauf der Arbeiten stellte sich heraus, dass die Produktmenge der ersten PCR zur Sequenzierung ausreichte (aus Zelllinien kann die DNA weitaus besser extrahiert werden als zum Beispiel aus konservierten Gewebeproben) und so konnte im Folgenden auf eine zweite PCR verzichtet werden.

### **Aufreinigen der Proben**

Vor der eigentlichen Sequenzierreaktion ist eine Aufreinigung der DNA nötig, um Reste von Salzen, Primern, Nukleotiden und Polymerase zu entfernen. Zum Einsatz kamen zwei verschiedene Methoden:

**A)** Auftrennen der PCR-Produkte auf einem Agarosegel, Ausschneiden der interessierenden Banden und Aufreinigung mit dem Qiaquick Gel Extraction Kit nach folgendem Protokoll:

1. **Ausschneiden** der Banden aus dem Gel mittels Skalpell, Überführen in ein Reaktionsgefäß. Wiegen und Zugabe der dreifachen Menge Puffer QX1. Inkubation bei 50 °C für 10 Minuten mit häufigem Vortexen. Das Gel löst sich auf.
2. **DNA-Bindung:** Abhängig vom enthaltenen pH-Indikator eventuell Senken des pH-Wertes unter 7,5 mit 3 M Na-Acetat, pH 5,0. Zugabe eines Gelvolumens Isopropanol und Mischen. Überführen auf eine in ein Reaktionsgefäß eingesetzte Säule und Zentrifugation bei 13000 U/min für 1 Minute. Verwerfen des Filtrats.
3. Zugabe von 0,5 ml Puffer QX1 und Zentrifugation bei 13000 U/min für 1 Minute zum Entfernen aller Agarosereste.

4. **Waschen:** Zugabe von 0,75 ml Puffer PE und Zentrifugation bei 13000 U/min für 1 Minute. Verwerfen des Filtrats und erneute Zentrifugation bei 13000 U/min für 1 Minute zur Entfernung des restlichen Ethanol.
5. **Elution:** Überführen der Säule in ein neues Reaktionsgefäß. Zugabe von 50 µl Elutionspuffer (10 mM Tris-Cl, pH 8,5). Nach 1 Minute Zentrifugation bei 13000 U/min für 1 Minute.
6. **Lagerung** der gereinigten DNA bei -20 °C.

**B)** Wesentlich einfacher und schneller ist das direkte Aufreinigen der PCR-Produkte mit dem Qiaquick PCR-Purification Kit:

1. **DNA-Bindung:** Zugabe der dreifachen Menge Puffer PB zur PCR-Probe. Überführen auf eine in ein Reaktionsgefäß eingesetzte Säule und Zentrifugation bei 13000 U/min für 1 Minute. Verwerfen des Filtrats.
2. Weiter wie unter A) ab Schritt 4.

Die Bestimmung des DNA-Gehalts der gereinigten Proben erfolgte zum einen durch Vergleich der Agarosegel-Bandenstärken mit einer mit aufgetragenen DNA-Leiter und zum anderen photometrisch durch Messung bei 260 und 280 nm. Die Werte lagen bei 2 bis 30 ng/µl. Auf diese Weise konnte die bei der Sequenzierreaktion einzusetzende Probenmenge festgelegt werden.

### **Sequenzierreaktion**

Die Sequenzierreaktion erfolgte mit dem ABI Prism Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit 2.0 von Applied Biosystems gemäß den Angaben des Herstellers in einem iCycler Thermal Cycler der Firma Bio-Rad. Für jede Probe wurde mit dem forward- und dem reverse-Primer je eine Reaktion angesetzt. Damit wurde in beide Richtungen sequenziert und die Sequenz sicher über die gesamte Probenlänge ermittelt. Reaktionsansatz und -programm sind in **Tabelle 11** und **Tabelle 12** wiedergegeben.

**Tabelle 11: 10 µl - Ansatz der Sequenzierreaktion**


---

gereinigte DNA (3 - 10 ng)	0,2 - 3 µl
Primer (5 µM)	1 µl (5 pmol)
Big Dye 2.0 aus Sequenzier-Kit	2 µl
hochreines Aqua dest. (HPLC-Wasser)	bis zu einem Gesamtvolumen von 10 µl

---

**Tabelle 12: Programm der Sequenzierreaktion**


---

30 Zyklen:	Denaturierung	96°C	10 sec
	Primer-Annealing	50 °C	5 sec
	Elongation	60°C	4 min
Pause		4°C	Pause

---

### Ethanol-fällung

Die Ethanol-fällung dient der Konzentrierung und Aufreinigung der in der Sequenzierreaktion gewonnenen DNA-Produkte vor dem elektrophoretischen Auftrennen. Gearbeitet wurde mit folgendem Protokoll:

1. Aufnahme des Reaktionsprodukts in 40 µl hochreines Aqua dest. (HPLC-Wasser). Zugabe von 5 µl 3 M Na-Acetat und 130 µl Ethanol-Dextranblau-Mischung (auf 1ml Ethanol abs. 4 µl Dextranblau 20 µg/µl). Mischen und Inkubation bei Raumtemperatur für 15 Minuten.
2. Zentrifugation bei 14000 U/min für 20 Minuten. Vorsichtiges Abziehen des Überstandes.
3. Waschen des DNA-Pellets mit 250 µl 70 %-igem Ethanol. Erneute Zentrifugation bei 14000 U/min für 20 Minuten und vorsichtiges Abziehen des Überstandes. Trocknen des Pellets bei 37 °C für 5 Minuten.

4. Lösen des Pellets in 20 µl HiDi (hochreines Formamid) bei 37 °C für 10 Minuten im Thermomixer.

### **Automatisierte DNA-Sequenzierung und Sequenzauswertung**

Die elektrophoretische Auftrennung und Fluoreszenzmessung erfolgte automatisiert mit dem Kapillar-Sequenziergerät 310 ABI Prism Genetic Analyser der Firma Applied Biosystems.

Die Auswertung der Sequenzkurven erfolgte mit dem Programm Sequencher Version 3.0 Macintosh der Firma Gene Codes Corporation.

Es wurden ausschließlich die Exons analysiert, die angrenzenden Intron-Bereiche blieben unberücksichtigt.

## **4.4 Materialien und Geräte**

### **4.4.1 Software**

<b>Anwendung</b>	<b>Bezeichnung</b>	<b>Firma / Internetadresse</b>
Agarosegel-Fotos	Quantity One 4.0.2 Macintosh	Bio-Rad
Sequenzdaten-analyse	Sequencher Version 3.0 Macintosh	Gene Codes Corporation
DNA-Sequenzsuche (online)	BLAT (BLAST-Like Alignment Tool)	University of California Santa Cruz (UCSC), USA, Bioinformatics Site, <a href="http://genome.cse.ucsc.edu/cgi-bin/hgBlat">http://genome.cse.ucsc.edu/cgi-bin/hgBlat</a>
DNA-Sequenzvergleich (online)	LALIGN	Swiss EMBnet (Swiss Institute of Bioinformatics), <a href="http://www.ch.embnet.org/software/LALIGN_form.html">http://www.ch.embnet.org/software/LALIGN_form.html</a>
Primerdesign (online)	Web Primer	Saccharomyces Genome Database (SGB), Stanford University, USA, <a href="http://seq.yeastgenome.org/cgi-bin/web-primer">http://seq.yeastgenome.org/cgi-bin/web-primer</a>

#### 4.4.2 Puffer und Lösungen

Puffer / Lösung	Zusammensetzung
EDTA (pH 8,0)	0,5 M EDTA, NaOH, Aqua bidest.
PCR-10-fach-Reaktionspuffer pH 8,8 (Firma Invitek)	500 mM Tris-HCL, 160 mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 0,10 % Tween 20
TAE-Puffer (Tris-Acetat-EDTA-Puffer)	40 mM Trishydroxymethylaminomethan, 20 mM Eisessig, 1,0 mM EDTA (pH 8,0), Aqua bidest.
TBE-Puffer (Tris-Borat-EDTA-Puffer)	89 mM Trishydroxymethylaminomethan, 89 mM Borsäure, 2,0 mM EDTA (pH 8,0), Aqua bidest.
SSCP-Ladungspuffer	90 % Formamid, 10 % Bromphenol Blue Xylene Cyanole Dye Solution (Firma Sigma, 0.5% Bromphenol Blue, 0.5% Xylene Cyanole), 10 mM NaOH, 10 mM EDTA (pH 8,0)

#### 4.4.3 Komplett Kits

Anwendung	Bezeichnung	Firma
DNA-Extraktion	Invisorb Spin Cell Mini Kit	Invitek
DNA-Reinigung	Qiaquick Gel Extraction Kit	Qiagen
	Qiaquick PCR-Purification Kit	Qiagen
Färbung der SSCP-Gele	Plus One DNA Silver Staining Kit	Amersham Biosciences
Sequenzierreaktion	ABI Prism Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit v.2.0	Applied Biosystems

#### 4.4.4 Geräte

Beschreibung	Firma	Typenbezeichnung
<b>Agarosegel-Elektrophorese:</b>		
Elektrophoresekammer	Biometra	Biometra Agagel Midi-Wide
Stromquelle	Bio-Rad	Power Pac 300
Gel-Dokumentationssystem	Bio-Rad	Gel Doc
<b>SSCP:</b>		
SSCP-Gel-Trägerfolien	Amersham Pharmacia Biotech	GelBond PAGfilm (124 x 258 mm)
Glasplatten	Amersham Pharmacia Biotech	260 x 125 mm mit U-Rahmen

Beschreibung	Firma	Typenbezeichnung
Klemmen für Glasplatten	Amersham Pharmacia Biotech	Flexiclamps
Elektrophoresekammer	Amersham Pharmacia Biotech	Multiphor II
Filterpapierstreifen	Munktell	Filter Paper Grade 1F (104 x 253 mm)
Stromquelle	Amersham Pharmacia Biotech	Electrophoresis Power Supply EPS 1000
Umwälzthermostat	Amersham Pharmacia Biotech	MultiTemp III
Färbegerät für SSCP-Gele	Amersham Pharmacia Biotech	Hoefer Automated Gel Stainer
50 ml-Röhrchen	BD Biosciences	BD Falcon Tubes 50 ml
96 well-Platten	TPP	
Dispenser-Pipette	Eppendorf	
Magnetrührgerät	Faust	Faust Monotherm
Mikrowelle	Panasonic	
Multipipette	HTL	Multi Mate 5 - 50 ml
PCR-Reaktiongefäße, 8er-Streifen und einzeln	Simport	
pH-Meter	Schott	pH-Meter CG 825
Photometer	Beckman	DU 640 Spectrophotometer
Pipetten	Eppendorf, Gilson	
Pipettenspitzen	Roth	
Pipettenspitzen mit Filter	ART	Aerosol Resistant Tips
	Sorenson	MultiGuard
Plastikpipetten	Greiner Bio-One	
Reaktionsgefäße 0,5, 1,5, 2 ml	Eppendorf	
Sequenzier	Applied Biosystems	310 ABI Prism Genetic Analyser
Thermoblock	Grant Instruments	QBT 2
Thermo-Cycler	Applied Biosystems	GeneAmp 9700, GeneAmp 2400
	Bio-Rad	iCycler Thermal Cycler
	Biometra	TGradient Thermocycler
Thermomixer	Eppendorf	Thermomixer compact
Tischzentrifuge	Eppendorf	Centrifuge 5415 C
Vortexer	Scientific Industries	Vortex-Genie 2
Waagen	Sartorius	BP 3100 S, BP 210 S

#### 4.4.5 Reagenzien

Bezeichnung	Firma
Acryl-Bisacrylamid-Lösung 40%, 29:1	Roth
Agarose (Agarose LE)	SeaKem
Agarosegel Ladungspuffer (Gel Loading Solution)	Sigma-Aldrich
APS, Ammoniumpersulfat	Roth
Aqua ad iniectabilia	Braun
Borsäure	Roth
Bromphenol Blue-Xylene Cyanole Dye Solution	Sigma-Aldrich
Dextranblau, Molekulargewicht 2 000 000	Sigma-Aldrich
DNA-Ladder (High Mass)	Gibco
dNTP-Mastermix (dATP, dGTP, dTTP, dCTP je 12,5 mM)	Invitak
EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)	Roth
Essigsäure 100% (Eisessig)	Merck
Ethanol 99,8% abs., 96%, 70%	Merck
Ethidiumbromid 0,5%	Sigma-Aldrich
Formamid	Sigma-Aldrich
HCl	AppliChem
HiDi (hochreines Formamid)	Applied Biosystems
hochreines Wasser (HPLC-Wasser)	Merck
Magnesiumchlorid 50 mM	Invitak
Natriumacetat	Roth
Natriumchlorid	AppliChem
Natriumhydroxid	Roth
PCR-Reaktionspuffer (10-fach, pH 8,8)	Invitak
Primer, auch HPLC-gereinigte	BioTeZ
Taq DNA Polymerase 5 U/ml	Invitak
TEMED (N,N,N-Tetramethylethylendiamin)	Fluka BioChemika
TRIS (Trishydroxymethylaminomethan)	Roth
TRIS-HCl (Trishydroxymethylaminomethan-Hydrochlorid)	Roth

#### 4.4.6 Firmenübersicht

Firma	Ort	Internetadresse
AB Applied Biosystems	Foster City, CA, USA	<a href="http://www.appliedbiosystems.com">www.appliedbiosystems.com</a>
Amersham Biosciences, Amersham Pharmacia Biotech	Freiburg, D	<a href="http://www.amershambiosciences.com">www.amershambiosciences.com</a>
AppliChem	Darmstadt, D	<a href="http://www.applichem.de">www.applichem.de</a>
BD Biosciences	San Jose, CA, USA	<a href="http://www.bdbiosciences.com">www.bdbiosciences.com</a>
Beckman Coulter	Fullerton, CA, USA	<a href="http://www.beckman.com">www.beckman.com</a>
Biometra	Göttingen, D	<a href="http://www.biometra.de">www.biometra.de</a>
Bio-Rad	München, D	<a href="http://www.bio-rad.com">www.bio-rad.com</a>
BioTeZ Berlin Buch	Berlin, D	<a href="http://www.biotez.de">www.biotez.de</a>
Braun	Melsungen, D	<a href="http://www.bbraun.de">www.bbraun.de</a>
Cambrex	Rockland, ME, USA	<a href="http://www.cambrex.com">www.cambrex.com</a>
Eppendorf	Hamburg, D	<a href="http://www.eppendorf.de">www.eppendorf.de</a>
Faust Laborbedarf	Schaffhausen, Schweiz	<a href="http://www.faust.ch">www.faust.ch</a>
Fluka BioChemika (Sigma- Aldrich)	Buchs, Schweiz	<a href="http://www.sigmaaldrich.com/fluka">www.sigmaaldrich.com/fluka</a>
Gene Codes Corporation	Ann Arbor, Michigan, USA	<a href="http://www.genecodes.com">www.genecodes.com</a>
Gibco (Invitrogen)	Karlsruhe, D	<a href="http://www.invitrogen.com">www.invitrogen.com</a>
Gilson	Middleton, WI, USA	<a href="http://www.gilson.com">www.gilson.com</a>
Grant Instruments	Cambridge, GB	<a href="http://www.grant.co.uk">www.grant.co.uk</a>
Greiner Bio-One	Kremsmünster, Österreich	<a href="http://www.gbo.com">www.gbo.com</a>
High Tech Lab, HTL	Warschau, Polen	<a href="http://www.htl.com">www.htl.com</a>
Invitex	Berlin, D	<a href="http://www.invitek.de">www.invitek.de</a>
Invitrogen	Karlsruhe, D	<a href="http://www.invitrogen.com">www.invitrogen.com</a>
Merck	Darmstadt, D	<a href="http://www.merck.de">www.merck.de</a>
Molecular BioProducts	San Diego, CA, USA	<a href="http://www.mbpinc.com">www.mbpinc.com</a>
Munktell Filter	Grycksbo, Schweden	<a href="http://www.munktell.se">www.munktell.se</a>
Panasonic	Hamburg, D	<a href="http://www.panasonic.de">www.panasonic.de</a>
Qiagen	Hilden, D	<a href="http://www.qiagen.com">www.qiagen.com</a>
Roth	Karlsruhe, D	<a href="http://www.carl-roth.de">www.carl-roth.de</a>
Sartorius	Göttingen, D	<a href="http://www.sartorius.de">www.sartorius.de</a>
Schott Instruments	Mainz, D	<a href="http://www.schott-instruments.com">www.schott-instruments.com</a>
Scientific Industries	Bohemia, NY, USA	<a href="http://www.scientificindustries.com">www.scientificindustries.com</a>
Sigma-Aldrich	München, D	<a href="http://www.sigmaaldrich.com">www.sigmaaldrich.com</a>
Simport	Beloeil, Kanada	<a href="http://www.simport.com">www.simport.com</a>
Sorenson BioScience	Salt Lake City, UT, USA	<a href="http://www.sorbio.com">www.sorbio.com</a>
TPP	Trasadingen, Schweiz	<a href="http://www.tpp.ch">www.tpp.ch</a>

## 5 Ergebnisse

### 5.1 Überblick

Bei den 47 humanen Tumorzelllinien wurden 1169 bp der 1632 bp umfassenden kodierenden Sequenz von Chek2, dem Chk2-kodierendem Gen, untersucht. Exon 1 bis 9 wurden komplett analysiert, wobei Exon 1 in zwei überlappende Bereiche unterteilt wurde. Von Exon 10 wurde der erste Teil analysiert, in dem auch die mehrfach beschriebene Mutation 1100delC liegt. Der Rest von Exon 10 und die Exons 11 bis 14 konnten aufgrund der existierenden homologen Pseudogene nicht untersucht werden.

Wenn bei der SSCP-Analyse ein auffälliges Bandenmuster auftrat wurde das entsprechende Fragment sequenziert, um die Mutation auf Sequenzebene nachzuweisen. Bei der Sequenzierung wurden ausschließlich die Sequenzen der Exons analysiert, angrenzende Intron-Bereiche blieben unberücksichtigt.

Es ist bekannt, dass Chek2 in humanen Tumoren eher selten mutiert ist. Dementsprechend wurden in dieser Arbeit nur wenige Veränderungen des Gens gefunden:

- Es ließ sich die Missense- (Aminosäure-austauschende) Mutation L355P in den beiden Versionen (a) und (b) der Kolonkarzinomlinie HCT-116 und in der Mammakarzinomlinie MATU identifizieren. Sie liegt im Exon 9 in der Kinasedomäne von Chek2. HCT-116 (a) zeigt außerdem die Deletion einer Base mit konsekutivem Frameshift im Exon 8, HCT-116 (b) zeigt diese Deletion nicht.
- Die beiden bereits bekannten Aminosäure-austauschenden Mutationen in den syngen Kolonkarzinomlinien HCT-15 und DLD-1 in Exon 2 und Exon 5 wurden bestätigt. Allerdings war für Exon 5 die SSCP-Analyse der beiden Zelllinien unauffällig, nur die gezielte Sequenzierung zeigte die Mutation.
- Der bekannte stille Polymorphismus im Codon 84 in Exon 1 trat in vier Zelllinien auf.

**Tabelle 13** zeigt eine Übersicht der Ergebnisse, **Tabelle 14** listet die übrigen Zelllinien auf, die in der Chek2-Mutationsanalyse unauffällig blieben (siehe auch **Tabelle 6**). Im Folgenden werden die gefundenen Varianten im Einzelnen beschrieben.

Tabelle 13: Ergebnisse von Chek2-SSCP-Analyse und -Sequenzierung: auffällige Zelllinien

Exon	SSCP-auffällige Zelllinien	Ergebnis der Sequenzierung
1a	-	
1b	U2OS	Stiller Polymorphismus in Codon 84
	SW-480,	Stiller Polymorphismus in Codon 84
	SAOS-2	Stiller Polymorphismus in Codon 84
	SW-620	Stiller Polymorphismus in Codon 84
2	HCT-15 (Kolonkarzinom)	Missense-Mutation R145W, heterozygot
	DLD-1 (Kolonkarzinom)	Missense-Mutation R145W, heterozygot
3	-	
4	-	
5	HCT-15 (Kolonkarzinom)	Missense-Mutation A247D, heterozygot
	DLD-1 (Kolonkarzinom)	Missense-Mutation A247D, heterozygot
6	-	
7	-	
8	HCT-116 (a) (Kolonkarzinom)	Deletion eines G im Bereich Base 8 bis 12 im Exon 8 und Frameshift, heterozygot
9	HCT-116 (a), HCT-116 (b) (Kolonkarzinome)	Missense-Mutation L355P, heterozygot
	MATU (Mammakarzinom)	Missense-Mutation L355P, heterozygot
10a	-	

Sequenziert wurden alle in der SSCP-Analyse auffälligen Proben, außerdem Exon 5 von HCT-15 und DLD-1. Bei diesen Zelllinien war das SSCP-Bandenmuster zwar unauffällig, aber eine Mutation bekannt. Als Wildtypkontrolle diente DU 145, für das sämtliche Exons 1a bis 10a sequenziert wurden.

**Tabelle 14: Zelllinien mit unauffälliger Chek2-Mutationsanalyse**

---

**Leukämien und Lymphome**

CTV-1, EHEB, HD-MY-Z, HL-60, JVM-2, JVM-3, K-562, KASUMI-1, KU-812, L-591, LAMA-87, MOLT-3, MOLT-4 (MOLT-4 pcDNA3), NALM-6, PLB-985, RAJI, REH, SKW-3, U-937

**Kolonkarzinome**

LOVO, LS-174T, SW-48

**Mammakarzinome**

BT-20, BT-549, DU-4475, HBL-100, MATU/ADR, MCF-7, MDA-MB-231, MT-1, MT-1/ADR, MT-3, MT-3/ADR, T-47D

**Sonstige**

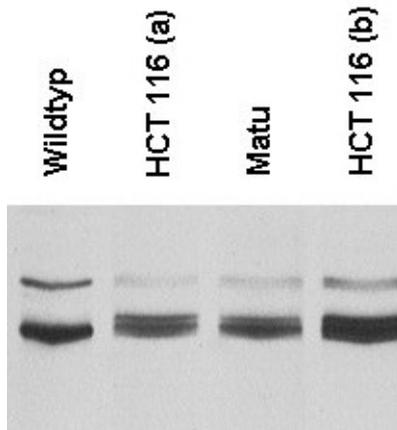
293 (HEK-293), DU-145 (DU145bax#7), EPG-85-257, RCC-AB

---

Diese Zelllinien blieben in der Chek2-SSCP-Analyse unauffällig und wurden daher auch nicht sequenziert.

## **5.2 Heterozygote Missense-Mutation L355P in Exon 9 in HCT-116 (a), HCT-116 (b) und MATU**

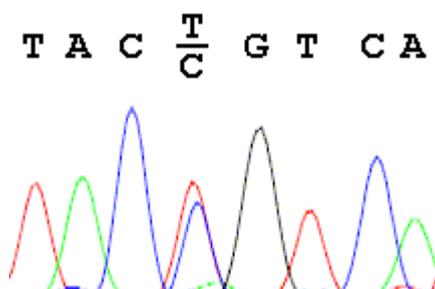
Die SSCP-Analyse für Exon 9 zeigt in den beiden Versionen (a) und (b) der Zelllinie HCT-116 und in MATU eine zusätzliche Bande (**Abbildung 13**). In der Sequenzierung zeigt sich für alle drei Zelllinien ein heterozygoter Basenaustausch von T zu C an Position 1064 von Chek2 (**Abbildung 14, Abbildung 15, Abbildung 16**). Damit verändert sich Codon 355 von CTG zu CCG und kodiert statt Leucin nun Prolin. Die Vergleichszelllinie DU 145 zeigt die reine Wildtypsequenz (**Abbildung 17**). Das betroffene Codon 355 liegt in der Kinasedomäne von Chk2.



**Abbildung 13: SSCP-Analyse von Exon 9 der Zelllinien HCT-116 (a), MATU, HCT-116 (b)**

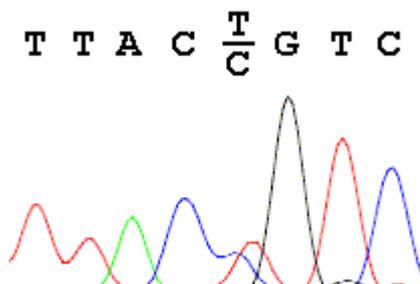
Die Zelllinien HCT-116 (a), MATU und HCT-116 (b) zeigen im Vergleich zum Wildtyp eine zusätzliche Bande unmittelbar über der unteren Bande.

Im Gegensatz zu MATU fand sich in der SSCP-Analyse der MATU-Unterlinie MATU/Adr kein Anhalt für eine Chek2-Mutation. Wie im Weiteren beschrieben ist in HCT-116 (a) außerdem eine Base in Exon 8 heterozygot deletiert. Welches der homologen Chromosomen jeweils betroffen ist und ob noch ein normales Chek2-Gen in HCT-116 (a) existiert wurde in dieser Arbeit nicht untersucht.



**Abbildung 14: 5'-3'-Sequenz Exon 9 HCT-116 (a)**

An der markierten Stelle finden sich sowohl T und C. Geht man von identischen Zellen in der Probe aus, so liegt Heterozygotie vor.



**Abbildung 15: 5'-3'-Sequenz Exon 9 HCT-116 (b)**

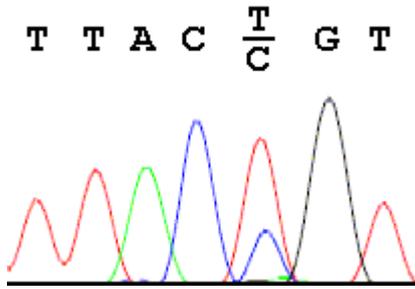


Abbildung 16: 5'-3'-Sequenz Exon 9 MATU

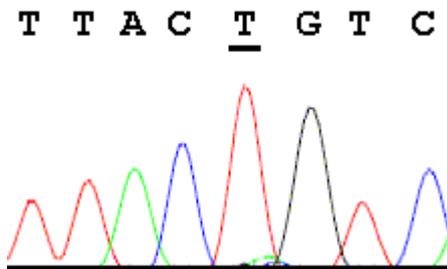


Abbildung 17: Zum Vergleich die Wildtypsequenz des Abschnitts von Exon 9 in DU 145

Die entsprechende Position ist unterstrichen.

### 5.3 Heterozygote Basendeletion mit Frameshift in Exon 8 in HCT-116 (a)

In der SSCP-Analyse für Exon 8 fällt bei HCT-116 (a) eine stark ungleiche Färbung der Banden auf (**Abbildung 18**).

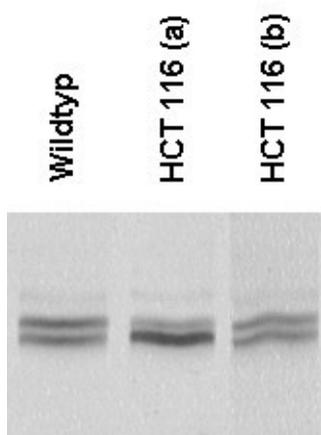


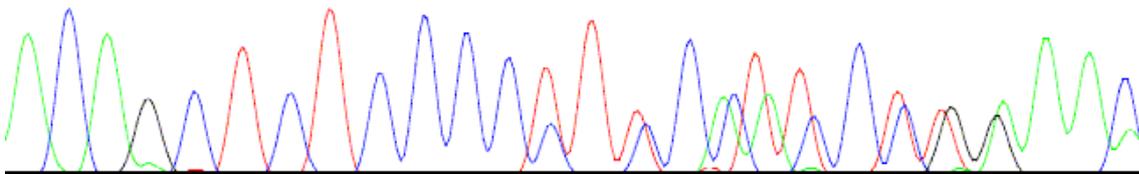
Abbildung 18: SSCP-Analyse von Exon 8 der Zelllinien HCT-116 (a), HCT-116 (b)

Die Sequenzierung (**Abbildung 19**) zeigt ab einer bestimmten Position überlagerte Kurven. Bei eingehender Analyse wird deutlich, dass dies durch die heterozygote Deletion einer Base entsteht. Es wurde eines von fünf G am Anfang des Exons 8 deletiert, an Position 916 bis 920 von Chek2. HCT-116 (b) zeigt diese Veränderung nicht (**Abbildung 20**).

```

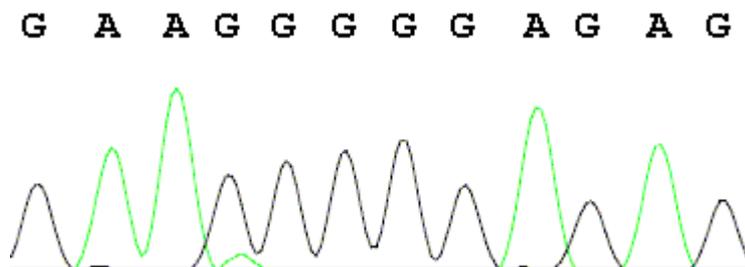
T G T C G A G A G G G G G A A G G T A G g a c t t t
A C A G C T C T C C C C C T T C C A T C c t g a a a
                +T T C C A T C c t g a a a c

```



**Abbildung 19: 3'-5'-Sequenz Exon 8 in HCT-116 (a): heterozygote Deletion eines G**

Links sind die Sequenzkurven sauber, rechts gibt es Überlagerungen. Bei genauer Analyse sieht man, dass sich die Wildtypsequenz mit sich selbst um eine Base versetzt überlagert. Auch in dem nicht mit abgebildeten übrigen Teil trifft dies zu. Eines der fünf markierten G wurde deletiert. Man beachte die umgekehrte Sequenzdarstellung in 3'-5'-Richtung (der abgebildete Ausschnitt liegt am 5'-Ende des Exons und ließ sich daher nur in der Sequenzierung in 3'-5'-Richtung sauber darstellen). Obere Zeile: Wildtypsequenz (3'-5', d.h. rückwärts), mittlere Zeile: Wildtypsequenz (3'-5' und komplementär), untere Zeile: um eine Base versetzte Wildtypsequenz. Exon in großen, Intron in kleinen Buchstaben, Farbkodierung: Guanin schwarz, Cytosin blau, Thymin rot, Adenin grün.



**Abbildung 20: HCT-116 (b) zeigt dagegen die Wildtypsequenz (5'-3'-Richtung) in Exon 8.**

## 5.4 Heterozygote Missense-Mutation R145W in Exon 2 in HCT-15 und DLD-1

In der SSCP-Analyse von Exon 2 zeigt sich bei HCT-15 und DLD-1 eine zusätzliche Bande (**Abbildung 21**), die Sequenzierung bestätigt die schon beschriebene (Bell et al. 1999, Grigorova et al. 2004) Mutation (**Abbildung 22, Abbildung 23**). An Position 433 des Gens ist C durch T ersetzt, Codon 145 verändert sich von CGG zu TGG und kodiert nun statt für Arginin für Tryptophan. Die Mutation liegt heterozygot vor.

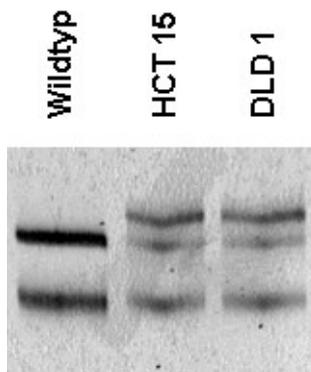


Abbildung 21: SSCP-Analyse Exon 2 der Zelllinien HCT-15, DLD-1

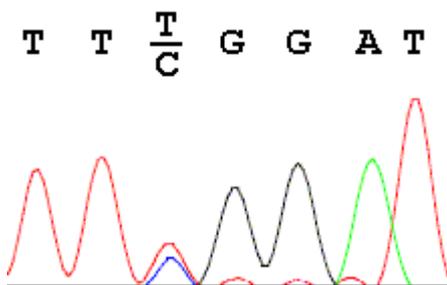


Abbildung 22: 5'-3'-Sequenz Exon 2 HCT-15

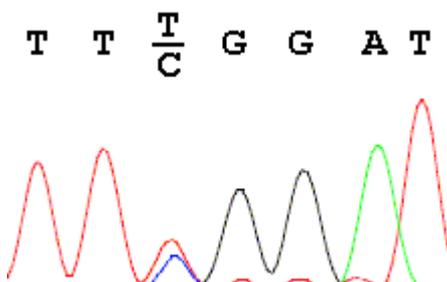


Abbildung 23: 5'-3'-Sequenz Exon 2 DLD-1

## 5.5 Heterozygote Missense-Mutation A247D in Exon 5 in HCT-15 und DLD-1

Auch die Mutation A247D von Chek2 in HCT-15 und DLD-1 war bereits bekannt (Lee et al. 2001, Grigorova et al. 2004). Allerdings wies die SSCP-Analyse überhaupt keine Auffälligkeiten im Bandenmuster auf (**Abbildung 24**) - eine Demonstration der begrenzten Sensitivität dieser Methode. Die Sequenzierung zeigte dann aber die Mutation (**Abbildung 25, Abbildung 26**). Bei HCT-15 und DLD-1 ist an Position 740 in Exon 5 ein C zu A ausgetauscht. Im Codon 247 steht anstelle von GCC nun GAC und es kodiert statt für Alanin nun für Asparagin. Die Mutation liegt heterozygot vor.

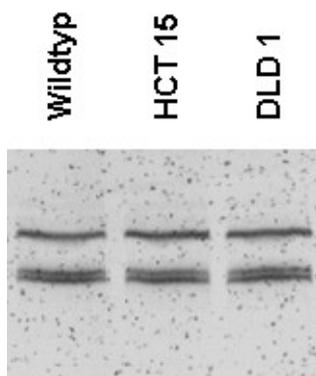


Abbildung 24: SSCP-Analyse Exon 5 der Zelllinien HCT-15, DLD-1

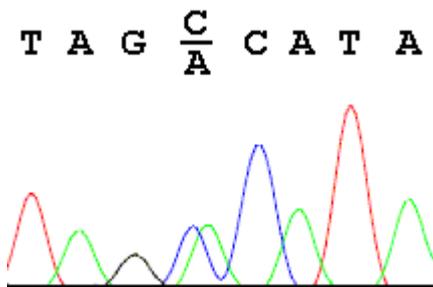


Abbildung 25: 5'-3'-Sequenz Exon 5 HCT-15

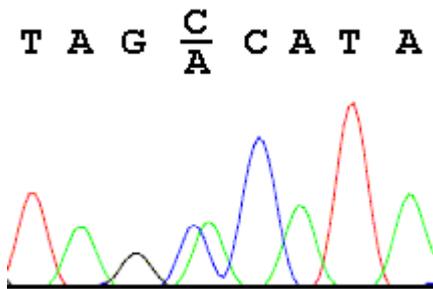


Abbildung 26: 5'-3'-Sequenz Exon 5 DLD-1

## 5.6 Stiller Polymorphismus im Codon 84, Exon 1b

Bei vier Zelllinien trat in der SSCP-Analyse von Exon 1b ein auffälliges Bandenmuster auf (**Abbildung 27**). Bei SW 480 und SW 620 liegen im Vergleich zum Wildtyp verschobene Banden vor, was auf eine homozygot oder hemizygot vorliegende Veränderung schließen lässt (Letzteres bei Verlust einer der beiden homologen Genkopien). Dagegen zeigen SAOS 2 und U2OS sowohl verschobenes als auch normales Bandenmuster und tragen daher eine heterozygote Veränderung.

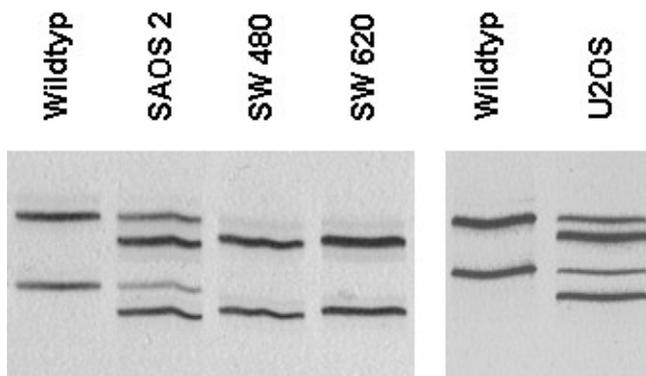
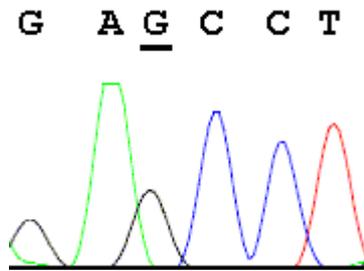


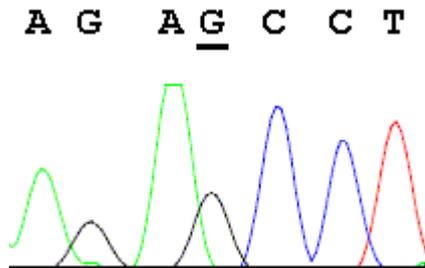
Abbildung 27: SSCP-Analyse Exon 1b der Zelllinien SAOS 2, SW 480, SW 620, U2OS

Auf Sequenzebene (**Abbildung 28**, **Abbildung 29**, **Abbildung 30**, **Abbildung 31**) zeigt sich bei allen vier Linien der Austausch eines A zu einem G an Position 252 im Gen. Dies bedeutet eine Veränderung des Codons 84 von GAA zu GAG. Beide Varianten kodieren Glutamin und somit liegt ein stiller Polymorphismus vor. Wie erwartet findet sich bei SW 480 und SW 620 ausschließlich die Variation, bei SAOS 2 und U2OS dagegen Heterozygotie.



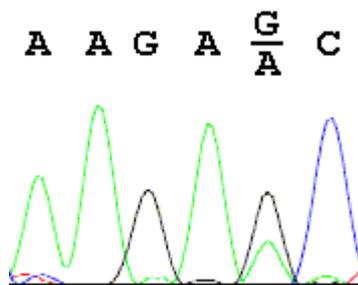
**Abbildung 28: 5'-3'-Sequenz Exon 1b SW 480**

Statt des markierten G steht im Wildtyp ein A. Es entsteht ein Codonwechsel von GAA zu GAG, beide Varianten kodieren Glutamin, somit handelt es sich um einen stillen Polymorphismus. Entweder liegt Homozygotie (beide homologe Chromosomen 22 betroffen) oder Hemizygotie (eine der homologen Kopien ging verloren) vor.



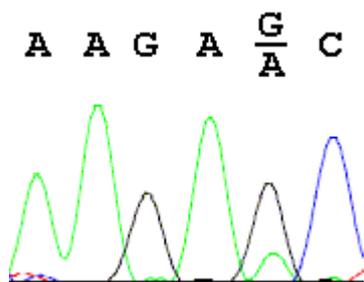
**Abbildung 29: 5'-3'-Sequenz Exon 1b SW 620**

Gleiches Bild wie bei Abbildung 28 (SW 480).



**Abbildung 30: 5'-3'-Sequenz Exon 1b SAOS 2**

An der markierten Stelle finden sich A und G. Geht man von identischen Zellen in der Probe aus, so liegt Heterozygotie vor.



**Abbildung 31: 5'-3'-Sequenz Exon 1b U2OS**

Gleiches Bild wie Abbildung 30 (SAOS 2).

## 6 Diskussion

### 6.1 Gefundene Chk2-Mutationen

In 47 humanen Tumorzelllinien wurde die genomische DNA auf Mutationen in Chk2, dem Chk2-kodierenden Gen, untersucht. Die Zelllinien umfassten vorwiegend hämatologische Malignome, Kolonkarzinome und Mammakarzinome sowie einzelne Linien weiterer Tumorarten. Von den 14 Chk2-Exons wurden Exon 1 bis 9 und ein Teil von Exon 10 untersucht, die übrigen konnten aufgrund der Existenz hochgradig homologer Pseudogene nicht analysiert werden. Somit wurden 1169 bp der 1632 kodierenden bp von Chk2 analysiert. Die Introns wurden nicht analysiert, auch eventuelle epigenetische Veränderungen wurden nicht untersucht. Mittels PCR und anschließender Single Strand Conformation Polymorphism Analyse (SSCP) wurden die Proben auf Chk2-Mutationen gescreent und auffällige Proben anschließend sequenziert. Gefunden wurden folgende Veränderungen:

#### 6.1.1 Heterozygote Missense-Mutation L355P in HCT-116 (a), (b) und MATU, sowie heterozygote Deletion mit Frameshift in HCT-116 (a)

In den untersuchten Versionen (a) und (b) der Kolonkarzinomlinie HCT-116 sowie in der Mammakarzinomlinie MATU zeigte sich ein heterozygoter Basenaustausch von T zu C an Position 1064 von Chk2 in Exon 9. Codon 355 wechselt damit im Vergleich zum Wildtyp von CTG zu CCG und kodiert so statt für Leucin nun für Prolin. Diese Missense-Mutation L355P betrifft die Kinasedomäne von Chk2. Eine Auswirkung auf die Funktionalität von Chk2 ist daher denkbar, dies wurde im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht untersucht. Da keine DNA zugehöriger normaler Zellen untersucht werden konnte, bleibt unklar, ob es sich bei den gefundenen Veränderungen um Keimbahn- oder somatische Mutationen handelt. Diese Mutation wurde bisher nicht beschrieben und ist auch nicht als SNP (single nucleotide polymorphism) bekannt, recherchiert in: Database of Single Nucleotide Polymorphisms (dbSNP 2012).

## **Mammakarzinomlinie MATU**

Zu insgesamt drei Mammakarzinomlinien (MATU, MT-1 und MT-3) konnten die davon abgeleiteten multipel-medikamentenresistenten Unterlinien (MATU/ADR, MT-1/ADR und MT-3/ADR) mit in die Analyse eingeschlossen werden. Die Resistenzen waren durch Exposition der Zelllinien gegenüber dem Anthrazyklin Adriamycin in ansteigenden Konzentrationen induziert worden und führten zu Kreuzresistenzen auch gegenüber anderen Chemotherapeutika (Stein et al. 1997). Die chemotherapeutische Wirkung von Adriamycin (Doxorubicin) wie auch anderer Anthrazykline beruht auf DNA-Interkalierung, Topoisomerase-II-Hemmung sowie Bildung reaktiver Radikale, es kommt in der Folge zu DNA-Doppelstrangbrüchen (Mutschler et al. 2008, Nitiss 2009) und einer entsprechenden DNA-Schadenantwort mit ATM-Chk2-Signalwegaktivierung und Zellzyklusarrest, insbesondere durch Aktivierung des G2-M- und Intra-S-, aber auch des G1-S-Kontrollpunktes (Kurz et al. 2004, Agner et al. 2005, Ho et al. 2005). Chek2-Mutationen in Mammakarzinomen sind assoziiert mit Resistenz gegen Epirubicin, ein dem Adriamycin verwandtes Anthrazyklin (Chrisanthar et al. 2008, Chrisanthar et al. 2011). Chek2-Mutationen könnten demzufolge auch zur Adriamycin-Resistenz in Tumorzelllinien beitragen, jedoch dürften sie die zelluläre Antwort auf DNA-Schäden nicht derart stark beeinträchtigen, dass die Zellen ihre Überlebensfähigkeit verlieren, etwa durch verstärkte mitotische Katastrophe (siehe auch Kapitel 6.5.1 zur Tumortherapie mittels Chk2-Inhibitoren).

Die Missense-Mutation L355P fand sich allerdings nur in der SSCP-Analyse der Linie MATU, nicht in der resistenten Unterlinie MATU/ADR, was für eine erst in vitro aufgetretene Chek2-Alteration in MATU spricht. Es fand sich auch keine Chek2-Mutation in einer der anderen Mammakarzinomlinien bzw. Adriamycin-resistenten Unterlinien. Die Ursache für die hier vorliegende Adriamycin-Resistenz ist das sogenannte Phänomen der multiplen Medikamentenresistenz (multi-drug resistance), das bei vielen Tumorarten beobachtet wird und auf der Überexpression von transmembranösen Transportproteinen beruht, die für ein schnelles Ausschleusen verschiedenster toxischer Substanzen sorgen. Dieser Resistenzmechanismus ist völlig unabhängig von Chk2-vermittelten Signalen und offenbar wesentlich wahrscheinlicher zu induzieren als die Auslese Chek2-veränderter Zellen. Drei Gene der Abc-(ATP-binding cassette, ATP-bindende Kasette) Familie sind für die Mehrheit der bekannten multiplen Medikamentenresistenzen bei Tumorzellen verantwortlich, dies sind

Abcb1/Pgp/Mdr1, Abcc1/Mrp1, und Abcg2/Mxr/Bcrp (Dean 2002, Sharom 2008). Diese Transporter dienen normalerweise dazu, gesundes Gewebe vor toxischen Fremdstoffen und Metaboliten zu schützen. In MATU/ADR ist die Überexpression von Mdr1 die Ursache der multiplen Medikamentenresistenz (Stein et al. 2008).

### **Kolonkarzinomlinie HCT-116**

Beide untersuchte Versionen (a) und (b) der Kolonkarzinomlinie HCT-116 weisen in Chek2 die oben charakterisierte heterozygote Missense-Mutation L355P in Exon 9 auf. Nur HCT-116 (a), nicht aber HCT-116 (b) zeigt zusätzlich die heterozygote Deletion einer Base im Exon 8. Eines von fünf G an Position 916 bis 920 von Chek2 fehlt. Durch diesen Frameshift entsteht ab Codon 307, also in der Kinasedomäne, eine stark veränderte Nonsense-Sequenz mit vorzeitigem Stoppcodon in Codon 319. Dem von 543 auf 318 Aminosäuren stark verkürzten Protein fehlt damit der größte Teil der Kinasedomäne inklusive der Aktivierungsschleife (activation loop), eine Funktionalität ist damit unwahrscheinlich. Diese Deletion wurde ebenfalls bisher nicht beschrieben und ist nicht als SNP (single nucleotide polymorphism) bekannt, recherchiert in: Database of Single Nucleotide Polymorphisms (dbSNP 2012).

Die beiden verschiedenen Mutationen liegen in HCT-116 (a) heterozygot vor. Es kann nicht entschieden werden, ob jeweils eine Mutationen auf einem der beiden homologen Chromosomen auftritt (compound heterozygot) oder beide Mutationen dasselbe Chromosom betreffen. Im letzteren Fall würde noch ein normales Chek2-Gen auf dem anderen Chromosom existieren. Ein bereits publiziertes Chek2-Mutationsscreening in HCT-116 fand die Variante L355P nicht (Bell et al. 1999). Dies kann bedingt sein durch die eingesetzte Screeningmethode DHPLC (denaturing high-performance liquid chromatography) oder Ausdruck einer genetischen Alteration dieser Linie sein.

Bei HCT-116 ist eine defekte DNA-Fehlpaarungsreparatur (mismatch repair) bekannt (Umar et al. 1994) aufgrund homozygoter Mutation von hMLH1 (Papadopoulos et al. 1994). Die Fehlpaarungsreparatur sorgt für die Korrektur von fehlerhaften Insertionen, Deletionen sowie Fehlpaarungen von Basen, welche während der DNA-Replikation und -Rekombination auftreten können (Larrea et al. 2010). Defekte in der Fehlpaarungsreparatur sind mit dem Phänomen der Mikrosatellit-Instabilität assoziiert und werden häufig bei kolorektalen Karzinomen gefunden. So weisen circa 15% der sporadischen, nicht-familiären kolorektalen Karzinome eine Mikrosatellit-Instabilität auf,

die fast immer auf einen Defekt des MLH1-Gens zurückzuführen ist (Bellizzi et al. 2009). Auch das hereditäre nicht-polypöse Kolonkarzinom (HNPCC, Lynch-Syndrom) wird durch Defekte in Genen der Fehlpaarungsreparatur hervorgerufen, namentlich MSH2 oder MLH1 (OMIM 2008h, Bellizzi et al. 2009). Es ist daher denkbar, dass die beiden gefundenen Chk2-Mutationen in HCT-116 - Basenaustausch und Basendeletion - auf die defekte Fehlpaarungsreparatur dieser Zelllinie zurückzuführen sind.

Die DNA-Schadenantwort wurde in HCT-116 schon eingehend untersucht, dabei ergab sich kein Anhalt für einen Chk2-Defekt. HCT-116 zeigte eine Chk2-Aktivierung nach ionisierender Strahlung (Yu et al. 2002) sowie intakte G1- und G2-Kontrollpunkte nach DNA-Schädigung (Waldman et al. 1995). Ein mutiertes Chk2 in HCT-116 mit auch nur geringfügig veränderter Funktionalität hätte jedoch eine besondere Relevanz, da HCT-116 als Modelllinie in zahlreichen Studien zu den DNA-Schadenkontrollpunkten und zur Funktion von Chk2 eingesetzt wurde und wird (beispielsweise Yu et al. 2002, Jallepalli et al. 2003, Carrassa et al. 2004, Castedo et al. 2004b, Wang et al. 2004, Takemura et al. 2006, Huang et al. 2008, Jin et al. 2008, Tao et al. 2008). Es ist nicht bekannt, ob die dabei benutzten HCT-116-Linien ebenfalls die in dieser Arbeit gefundenen Mutationen aufwiesen. HCT-116 wurde als eine von drei differenten Zelllinien aus einem Kolonkarzinom gewonnen (Brattain et al. 1981). Möglicherweise sind verschiedene Subtypen dieser Linie im Umlauf. Zu empfehlen sind daher Untersuchungen zur Auswirkung der hier beschriebenen Mutationen auf die Chk2-Funktionalität sowie vergleichende Mutationsanalysen von Chk2 in den HCT-116-Linien, die in anderen Studien eingesetzt werden.

### **6.1.2 Heterozygote Missense-Mutationen R145W und A247D in HCT-15 und DLD-1**

In den syngen Kolonkarzinomlinien HCT-15 und DLD-1 (sie stammen beide vom selben Tumor) wurden die bereits beschriebenen Missense-Mutationen R145W in Exon 2 und A247D in Exon 5 (Bell et al. 1999, Lee et al. 2001, Grigorova et al. 2004) bestätigt.

An Position 433 ist in Exon 2 das C durch T ersetzt, Codon 145 verändert sich dadurch von CGG zu TGG und kodiert statt Arginin nun Tryptophan, die Mutation liegt heterozygot vor und betrifft die forkhead-assoziierte (FHA) Domäne. Diese Mutation R145W wurde als Keimbahnmutation bei einigen Personen mit Li-Fraumeni-Syndrom beschrieben (Lee et al. 2001), die geringe gemeinsame Segregation mit Tumoren in den betroffenen Familien sprach dabei allerdings gegen eine wesentliche krankheitsverursachende Bedeutung (Sodha et al. 2002). Siehe auch Database of Single Nucleotide Polymorphisms (dbSNP 2012): Eintrag rs137853007.

An Position 740 steht in Exon 5 statt C ein A, Codon 247 ändert sich damit von GCC zu GAC und kodiert statt Alanin nun Asparagin, die Veränderung liegt ebenfalls heterozygot vor und betrifft die Kinasedomäne. Diese Mutation A247D ist kein bekannter SNP (single nucleotide polymorphism), recherchiert in: Database of Single Nucleotide Polymorphisms (dbSNP 2012).

HCT-15 und DLD-1 wurden beide vom selben Originaltumor gewonnen (Dexter et al. 1979), unterscheiden sich jedoch stark in den chromosomalen Veränderungen (Chen et al. 1995). Dies spricht für ein frühes Auftreten dieser beiden Chek2-Veränderungen in der Tumorentstehung, möglicherweise handelt es sich auch um Keimbahnmutationen.

### **6.1.3 Stiller Polymorphismus in Codon 84**

Ein bekannter stiller Polymorphismus im Codon 84 in Exon 1 trat in den vier Zelllinien U2OS, SW 480, SAOS 2 und SW 620 auf. An Position 252 steht statt eines A ein G. Sowohl das ursprüngliche Codon GAA als auch das veränderte Codon GAG kodieren Glutamin, somit gibt es keine Auswirkungen auf das Chk2-Protein. Es handelt sich um einen bekannten SNP (single nucleotide polymorphism), siehe Database of Single Nucleotide Polymorphisms (dbSNP 2012): Eintrag rs1805129.

## **6.2 Methodik**

Das 14 Exons umfassende Chek2-Gen erstreckt sich über 50 Kilobasen auf Chromosom 22, Abschnitt 22q12.1. In dieser Arbeit wurde mittels PCR-SSCP-Analyse

(polymerase chain reaction - single strand conformation polymorphism analysis) nach Mutationen ausschließlich in den Exons gesucht. Wie im Folgenden erläutert wird, sind auch bei Zelllinien mit unauffälliger Mutationsanalyse Veränderungen in der Funktionalität des Chek2-Gens oder des Chk2-Proteins möglich. Gründe sind zum einen prinzipielle Grenzen der Methode sowie ihre zwar gute, aber begrenzte Sensitivität. Da das Ziel dieser Arbeit war, Tumorzelllinien mit vertretbarem Aufwand, aber nicht erschöpfend auf Chek2-Veränderungen zu untersuchen, wurden diese Einschränkungen bewusst in Kauf genommen.

### **6.2.1 Prinzipielle Grenzen der Methodik**

Da außer dem funktionellen Chek2-Gen auf Chromosom 22 mehrere nicht funktionelle, aber hochgradig homologe Pseudogene auf verschiedenen Chromosomen existieren (Sodha et al. 2000), konnten mit der verwendeten Methodik trotz geschickten PCR-Primerdesigns nur Exon 1 bis 9 sowie ein Teil von Exon 10 analysiert werden. Somit konnte ein nicht unerheblicher Teil des insgesamt 14 Exons umfassenden Chek2-Gens nicht in die Analyse einbezogen werden. Es gibt Möglichkeiten, dieses Problem zu überwinden, beispielsweise mittels einer long-distance-PCR. Diese Techniken standen jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht zur Verfügung.

Selbstverständlich beeinflussen auch Mutationen in DNA-Bereichen außerhalb der Exons die Aktivität und Funktionalität eines Gens. Dazu gehören Intronsequenzen, die das Spleißen steuern, und genregulatorische DNA-Abschnitte, die die Transkriptionsaktivität beeinflussen. Mutationsanalysen solcher DNA-Abschnitte sind schwierig, da die relevanten DNA-Bereiche oft unbekannt sind. Auch mögliche Duplikationen des Chek2-Gens oder einzelner Exons können die Funktionalität von Chek2 verändern. Solche Veränderungen können durch die PCR-SSCP-Analyse prinzipiell nicht erfasst werden. Weiterhin können auch epigenetische Veränderungen die Aktivität und Funktionalität eines Gens beeinflussen, beispielsweise Silencing durch Promotor-Methylierung, DNA-Umstrukturierung zu Heterochromatin oder posttranskriptionelle Einflüsse (Alberts et al. 2004). Um diesen Faktoren nachzugehen wären Untersuchungen der Chek2-mRNA-Konzentrationen oder der direkte immunologische Proteinnachweis mittels Western-Blot-Analyse geeignete Verfahren. Diese Arbeit beschränkte sich auf die beschriebene genomische Mutationssuche.

## 6.2.2 Sensitivität der Mutationsanalyse

Da reine Zelllinien und somit reine Tumor-DNA untersucht wurden, trat von vornherein nicht das Problem der Analyse von Zellmischungen und damit Misch-DNA auf, wie es bei der Analyse von Tumorgewebsproben der Fall gewesen wäre. Denn diese enthalten neben verschiedenen Tumorzellentitäten immer auch Normalgewebe, beispielsweise Blutgefäße, Bindegewebe usw. Ist dann der Anteil der Tumorzellen und damit der Tumor-DNA eher klein, können bei der Analyse Mutationen übersehen werden.

Die SSCP-Analyse (single strand conformation polymorphism analysis, Einzelstrang-Konformations-Polymorphismus-Analyse) in Verbindung mit der PCR ist eine einfache und effektive Screeningmethode auf Mutationen in genomischer DNA, erstmals beschrieben von Orita et al. (Orita et al. 1989a, 1989b). Sie ist gut geeignet selbst Veränderungen nur einer Base aufzuspüren. Ihre Sensitivität nimmt mit steigender Länge der untersuchten DNA-Fragmente ab. Sie wird für Fragmente bis 200 bp mit ca. 70-95% angegeben und sinkt für Fragmente über 400 bp auf unter 50% (Grompe 1993). Eine andere Untersuchung gibt die SSCP-Sensitivität für Fragmente bis 200 bp mit 90% und für 300-350 bp mit 80% an (Hayashi et al. 1993). Durch mehrfache SSCP-Analysen mit variierten Bedingungen, insbesondere durch Variation von Elektrophoresetemperatur und Glycerolgehalt des Gels, kann die Sensitivität deutlich erhöht werden und steigt bei fünf kombinierten Analysebedingungen auf praktisch 100% (Buzin et al. 2000).

Für die Zelllinien HCT-15 und DLD-1 waren bereits Chek2-Mutationen in Exon 2 und 5 bekannt. Die SSCP-Analyse zeigte für beide Zelllinien in Exon 2, nicht aber in Exon 5 auffällige Bandenmuster. Bei der Sequenzierung wurden dann in beiden Exons die bekannten Mutationen bestätigt. Die durchgeführte SSCP-Analyse übersah demnach die Mutation in Exon 5.

In dieser Arbeit wurde für jedes Exon je ein Set von SSCP-Analysebedingungen verwendet, das in Vorversuchen so optimiert wurde, dass sich die Einzelstränge des jeweiligen Exons gut auftrennten. Eine mehrfache Analyse mit verschiedenen Analysebedingungen wurde nicht durchgeführt. Die Länge der untersuchten DNA-Fragmente betrug für das mit Abstand längste Fragment 323 bp, für alle anderen

zwischen 164 bp und 230 bp. Für diese Untersuchung kann daher von einer Sensitivität von ungefähr 70-95 % ausgegangen werden.

### 6.3 Zelluläre Funktionen von Chk2

Die Akkumulation genetischer Veränderungen bildet die Grundlage der Transformation gesunder Zellen in Tumorzellen und gesunden Gewebes in malignes Gewebe. Die Ansammlung von Schäden in tumorkritischen Genen und eine natürliche Selektion genetischer Varianten ermöglichen die Onkogenese und beeinflussen die Resistenz von Malignomen gegenüber Radio- und Chemotherapie. Fehlerhafte DNA-Schadenreparaturprogramme fördern die genetische Instabilität. Eine funktionierende zelluläre DNA-Schadenantwort stellt eine wichtige Barriere gegen genetische Instabilität und Tumorentstehung dar (Hoeijmakers 2001, Khanna et al. 2001, Kastan et al. 2004, Bartkova et al. 2005, Gorgoulis et al. 2005, Bartek et al. 2007a). Die Signalnetzwerke der Zellzyklus-Kontrollpunkte organisieren die verschiedenen Antworten der Zelle auf DNA-Schäden und anderen zellulären Stress. Die aktivierten Kontrollpunkte stoppen den Zellzyklus, entweder temporär, um Zeit für die Reparatur bereitzustellen, oder dauerhaft, um durch Seneszenz eine weitere Proliferation stark geschädigter Zellen zu verhindern. Sie veranlassen und koordinieren DNA-Reparatur, Chromatinrestrukturierung, Veränderungen im Transkriptionsprofil und Zellmetabolismus oder gar den Zelltod durch Apoptose, um den Organismus vor Tumoren zu schützen (Zhou et al. 2000, Kastan et al. 2004, Motoyama et al. 2004).

Die Kontrollpunktkinase Chk2 (**checkpoint kinase 2**) spielt dabei eine zentrale Rolle in der Signalübertragung und -verteilung. Chk2 und das strukturell verschiedene, jedoch funktionell überlappende Chk1 übertragen durch Phosphorylierungen ihrer Zielproteine Signale von den proximalen Kontrollpunktkinasen Atm und Atr auf distale Effektoren, die dann die genannten Zellreaktionen vermitteln (für Übersichtsartikel zu Chk2 siehe: Bartek et al. 2001, Bartek et al. 2003, Ahn et al. 2004, Antoni et al. 2007).

Je nach Typ eines DNA-Schaden kommt es zur Aktivierung verschiedener Pfade der Kontrollpunkt signalwege (Kastan et al. 2004, Li et al. 2005b). Doppelstrangbrüche (durch ionisierende Strahlung oder radiomimetische Substanzen) sowie Telomererosion aktivieren vor allem Atm, das hauptsächlich Chk2 stimuliert (Iliakis et al. 2003). Viele

andere DNA-Schäden aktivieren dagegen überwiegend Atr, welches vorwiegend auf Chk1 wirkt, darunter UV-Licht, viele chemische Substanzen, DNA-Einzelstrangbereiche und blockierte Replikationsgabeln (Paulsen et al. 2007, Dai et al. 2010). Atm und Atr phosphorylieren neben Chk2 und Chk1 auch viele Mediator- und Effektorproteine, so phosphoryliert Atm auch Brca1, 53Bp1, Nbs1, H2ax, Fancd2, p53, Mdm2 und Smc1 (Kastan et al. 2004). Die Signalwege sind äußerst komplex, die Anzahl der involvierten Moleküle und ihrer Wechselwirkungen untereinander ist hoch. So fand eine Studie über 700 Proteine, die möglicherweise Atm- oder Atr-abhängig phosphoryliert werden (Matsuoka et al. 2007). Einfache Aussagen über die Funktionen der beteiligten Moleküle sind daher nicht möglich.

In den folgenden Abschnitten wird die Funktion von Chk2 innerhalb der einzelnen Zellprozesse diskutiert, danach wird auf Alterationen der Chk2-Signalwege in humanen Tumoren eingegangen um schließlich die Möglichkeiten einer therapeutischen Chk2-Inhibition bzw. -Aktivierung zu diskutieren.

### 6.3.1 Übersicht über die Chk2-Interaktionspartner

Siehe dazu Kapitel 2.2.2. Aktiviert wird Chk2 durch Phosphorylierung hauptsächlich durch Atm, aber auch durch Atr und eventuell die DNA-abhängige Proteinkinase (DNA-PK). Andere Kontrollpunktproteine, insbesondere Mediatoren, modulieren die Chk2-Aktivität (Bartek et al. 2003, Ahn et al. 2004, Reinhardt et al. 2009). Zu den durch Chk2 phosphorylierten Substraten zählen der Transkriptionsfaktor **p53** (Chehab et al. 2000, Hirao et al. 2000, Shieh et al. 2000), die Zellzyklus-regulierenden Phosphatasen **Cdc25a** (Falck et al. 2001b, Sorensen et al. 2003) und **Cdc25c** (Matsuoka et al. 1998, Blasina et al. 1999, Chaturvedi et al. 1999), das in der DNA-Reparatur bedeutsame **Brca1** (Lee et al. 2000, Zhang et al. 2004), der Zellzyklus regulierende und proapoptotisch wirkende Transkriptionsfaktor **E2f1** (Stevens et al. 2003) sowie die an der Apoptosevermittlung beteiligten Proteine **Pml** (Yang et al. 2002) und **Plk3** (Xie et al. 2002). Mögliche weitere Substrate von Chk2 sind Abl1, Bubr1, Bub1, Bub3, Psk-H1, Smc3, Plk1, Cdc25b, Dcamk1, Mre11, Pms1 und Xrcc9 (Seo et al. 2003).

### 6.3.2 Chk2 und Zellzyklusarrest

Man unterscheidet im Zellzyklus drei Kontrollpunkte, an denen der Zellzyklus bei DNA-Schäden angehalten oder verzögert werden kann: den G1-S-, den Intra-S- und den G2-M-Kontrollpunkt. Die drei Kontrollpunkte teilen sich viele proximale Komponenten (die Sensoren, Mediatoren, Transduktoren), ihre individuellen Effekte ergeben sich durch die unterschiedlichen beteiligten Effektorproteine (Übersichten in: Kastan et al. 2004, Lukas et al. 2004, Sancar et al. 2004). Chk2 ist als Signalvermittler an allen drei Kontrollpunkten beteiligt.

#### G1-S-Kontrollpunkt

Der G1-S-Kontrollpunkt (auch G1-Kontrollpunkt genannt) verhindert bei DNA-Schäden den Eintritt in die S-Phase und damit die DNA-Replikation (Kastan et al. 2004, Sancar et al. 2004). Über Atm, Atr und Chk2, Chk1 werden Cdc25a sowie p53 und der p53-Regulator Mdm2 phosphoryliert. Phosphoryliertes Cdc25a wird abgebaut und verhindert so eine Cdk2-Aktivierung. Aktiviertes p53 bewirkt einen Zellzyklusarrest hauptsächlich über den Cdk-Inhibitor p21 (Waf1, Cip1). Interessanterweise entspricht der Zustand der Seneszenz einem dauerhaften Zellzyklusstopp, denn die Telomerveränderungen in seneszenten Zellen ähneln DNA-Doppelstrangbrüchen und lösen auch eine entsprechende Kontrollpunktantwort aus.

#### Intra-S-Kontrollpunkt

Der Intra-S-Kontrollpunkt (auch Replikationskontrollpunkt genannt) hemmt in der S-Phase die DNA-Replikation bei neu auftretenden DNA-Schäden oder solchen, die dem G1-S-Kontrollpunkt entgangen sind (Bartek et al. 2004, Kastan et al. 2004, Sancar et al. 2004). Der Intra-S-Kontrollpunkt ist p53-unabhängig, jedoch abhängig von Delta-p53, einer p53-Isoform (Rohaly et al. 2005). Die Details sind noch nicht geklärt, involviert sind neben dem Signalweg Atm/Atr-Chk2/Chk1-Cdc25a-Cdk2 (wie beim G1-S-Kontrollpunkt) ein zweiter Weg über Atm, Nbs1 und Smc1 sowie weitere Moleküle wie beispielsweise 53Bp1, Brca1, Fancd2 und Mdc1.

Ein gestörter Intra-S-Kontrollpunkt ist assoziiert mit dem Phänomen der **Strahlungsresistenten DNA-Synthese** (RDS, radio-resistant DNA synthesis). Normale Zellen halten bei ionisierender Strahlung unverzüglich die DNA-Replikation an, Zellen mit gestörtem Intra-S-Kontrollpunkt tun dies nicht. RDS wurde in Zellen mit Defekten in

zahlreichen am Intra-S-Kontrollpunkt beteiligten Genen beobachtet, dazu gehören Atm, Atr, Chek1, Chek2, Cdc25a, Brca1, Brca2, Fancd2, 53Bp1, Mre11, Nbs1 und andere (Überblick in: Bartek et al. 2004). Der RDS-Phänotyp ist zum Teil mit einer erhöhten strahlenbedingten Sterblichkeit der Zellen verbunden.

### **G2-M-Kontrollpunkt**

Der G2-M-Kontrollpunkt (oder G2-Kontrollpunkt) verhindert eine Mitose bei geschädigter DNA. Es ergänzen sich mehrere Signalwege (Kastan et al. 2004, Sancar et al. 2004). Über Atm/Atr-Chk2/Chk1-Cdc25c wird die Cdk1 gehemmt, wahrscheinlich sind noch weitere Proteine wie Plk1 und Plk3 daran beteiligt. Die Cdk1-Aktivität wird auch über Cdc25a und Cdc25b reguliert. Für Cdc25a geschieht dies wahrscheinlich ebenfalls über Atm/Atr-Chk2/Chk1, die Rolle von Cdc25b ist dagegen unklar. Auch p53 ist über Atm/Atr-Chk2/Chk1 am G2-M-Kontrollpunkt beteiligt (wie beim G1-S-Kontrollpunkt), neben p21 sind weitere p53-Effektoren involviert.

### **6.3.3 Relevanz von Chk2: Ergebnisse aus Tiermodellen**

An allen drei Zellzyklus-Kontrollpunkten ist Chk2 beteiligt, aber auch andere Signalwege sind involviert. Viele Ergebnisse zur Chk2-Funktion stammen aus Studien an Tumorzellen, das heißt Zellen mit vorhandenen Defekten der Zellzykluskontrolle. Es stellt sich die Frage, inwieweit Chk2 in gesunden Zellen für eine intakte Kontrollpunktantwort erforderlich oder entbehrlich ist. Studien mit Chek2<sup>-/-</sup> (in beiden Allelen defizienten) Mäusen ergaben widersprüchliche Ergebnisse. In einem Modell zeigten Chek2-defiziente Mauszellen einen gestörten G2-M-Arrest nach ionisierender Strahlung (Hirao et al. 2000), aber keinen gestörten G1-S-Arrest (Jack et al. 2002). In anderen Chek2-defizienten Mausmodellen trat nach ionisierender Strahlung zwar eine Störung im G1-S-Kontrollpunkt, aber keine Störung im G2-M- oder S-Kontrollpunkt auf (Hirao et al. 2002, Takai et al. 2002). Chk2 ist offenbar teils entbehrlich für den Zellzyklusarrest, obwohl es zweifellos in die Zellzykluskontrolle involviert ist. Offenbar ist in ansonsten gesunden Zellen ein Chk2-Funktionsverlust in vielen Situationen ausgleichbar durch andere Signalwege.

Alle Studien stimmen jedoch darin überein, dass in Chek2-defizienten Mauszellen die Apoptose nach ionisierender Strahlung gestört ist (Hirao et al. 2000, Hirao et al. 2002, Jack et al. 2002, Takai et al. 2002).

Chek2-defiziente Mäuse zeigen keine Störung der körperlichen Entwicklung, der Fruchtbarkeit oder der Entwicklung des Immunsystems (Hirao et al. 2002, Takai et al. 2002). Anders als ATM<sup>-/-</sup> und p53<sup>-/-</sup> Mäuse entwickeln Chek2<sup>-/-</sup> Mäuse nicht spontan Tumoren, jedoch kommt es bei der Einwirkung karzinogener Substanzen zu einer vermehrten Tumorentstehung (Hirao et al. 2002). In einem weiteren Mausmodell, in dem Wildtyp-Chek2 durch die vom Menschen bekannte 1100delC-Variante ersetzt wurde, traten bei den Chek2-1100delC-homozygoten Mäusen häufiger spontane Tumoren auf (Bahassi et al. 2009).

Chk1 ist dagegen unabdingbar für die normale Entwicklung und Überlebensfähigkeit bei Säugern, so sterben Chek1-defiziente Mäuse bereits embryonal (Takai et al. 2000, Liu et al. 2000). Knockdown von Chek1 in humanen Zellen durch RNA-Interferenz zeigte die Notwendigkeit von Chk1 für die normale S-Phase und für den S- und G2-M-Kontrollpunkt nach Einwirkung ionisierender Strahlung (Sorensen et al. 2003, Zhao et al. 2002, Gatei et al. 2003) und einiger DNA-schädigender Chemikalien (Xiao et al. 2003).

#### **6.3.4 Chk2 und Seneszenz**

Seneszenz ist ein Zellzustand permanenten Zellzyklusstopps und damit Ausdruck der Zellalterung. Neben der Unfähigkeit zur Vermehrung treten starke Veränderungen in Morphologie, Genexpression und Metabolismus der Zelle auf (Übersichten zur Seneszenz: Ben-Porath et al. 2004, Campisi 2005, Shay et al. 2005).

##### **Replikative Seneszenz ist Chk2-abhängig**

In differenzierten menschlichen Zellen induzieren fortlaufende Zellteilungen über die dabei auftretenden Telomerosionen die so genannte replikative Seneszenz (Hayflick et al. 1961). Es wurde gezeigt, dass dieser Vorgang viele Gemeinsamkeiten mit der zellulären Schadenantwort auf DNA-Doppelstrangbrüche hat und abhängig ist von Chk2 und p53 (d'Adda di Fagagna et al. 2003, Gire et al. 2004, Shay et al. 2005). Es kommt

bei der replikativen Seneszenz durch Inaktivität des Enzyms Telomerase zur zunehmenden Verkürzung und Strukturveränderung der Chromosomenenden, der Telomere. Wahrscheinlich löst eine dann auftretende Exposition der Chromosomenenden über Aktivierung der DNA-Schadenkontrollpunkte vergleichbar einem DNA-Doppelstrangbruch die Seneszenz aus. Stamm- und Vorläuferzellen exprimieren im Gegensatz zu differenzierten Zellen Telomerase und unterliegen nicht der replikativen Seneszenz.

Ist durch Mutationen die Seneszenz blockiert, so teilen sich auch differenzierte Zellen immer weiter, bis es schließlich bei stark verkürzten Telomeren zur genomischen Krise kommt, einem Zustand mit zahllosen chromosomalen Aberrationen und Chromosomenfusionen und massivem Zellsterben. Die p53-vermittelte Seneszenz kann nicht durch physiologische Stimuli, aber in einigen Fällen durch Inaktivierung von p53 oder p21 rückgängig gemacht werden. Auch die gemeinsame Inaktivierung von ATM und ATR oder Chk1 und Chk2 kann die replikative Seneszenz rückgängig machen (d'Adda di Fagagna et al. 2003). Dies führt dann nach einer Anzahl von Zellteilungen zur Krise.

### **Stress-induzierte Seneszenz**

Seneszenz lässt sich in kultivierten Zellen auch durch eine Vielzahl von Stressarten induzieren (Lloyd 2002), dazu gehören DNA-Schädigungen, oxidativer Stress, Onkogenüberexpression, Störung der Chromatinstruktur und verschiedene metabolische Störungen. Verschiedene Stresssignale kumulieren dabei in ihrer Wirkung, und es tritt keine Telomerverkürzung auf. Die genauen Mechanismen sind noch unklar, aber dies geschieht sowohl p53-abhängig als auch -unabhängig. Man betrachtet replikative und Stress-induzierte Seneszenz zunehmend als zwei Varianten eines Prozesses.

### **Die Bedeutung der Seneszenz für die Onkogenese**

Die meisten bisherigen Ergebnisse beruhen auf Beobachtungen in vitro, die Bedeutung von Seneszenz in vivo ist unklar. Da seneszenten Zellen sich nicht weiter teilen können, versteht man Seneszenz als zelluläre Abwehr gegen Onkogenese (Ben-Porath et al. 2004, Campisi 2005). Maligne Zellen müssen auf jeden Fall der Seneszenz entgehen. Dies kann geschehen durch Telomeraseaktivierung oder durch Inaktivierung von p53, Chk2 oder anderer beteiligter Gene. Jedoch kann selbst in malignen Zellen oft noch

Seneszenz induziert werden etwa durch exogene Einflüsse wie Strahlentherapie oder Chemotherapeutika. Es wurde zudem gezeigt, dass eine erzwungene Chk2-Überexpression in humanen Tumorzelllinien sowohl Seneszenz und Apoptose induzieren kann (Chen et al. 2005). Ein Stopp des Tumorwachstums durch Induktion von Seneszenz könnte eine künftige Therapiemöglichkeit bieten, kann sich aber auch negativ auswirken, falls die Zelle dadurch den therapiebedingten Zelltod abwenden und später die Seneszenz verlassen kann.

### **6.3.5 Chk2 und DNA-Reparatur**

Chk2 beeinflusst über Brca1 beide bekannten Varianten der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen, die homologe Rekombination (fehlerfrei) und die nichthomologe Endverbindung (teils fehlerhaft, mit zunehmenden Hinweisen auf einen präziseren, fehlerärmeren Subtyp). Beide Mechanismen werden durch Brca1 wesentlich reguliert und durch Chk2 über Brca1 beeinflusst (Lee et al. 2000, Zhang et al. 2004, Wang et al. 2006, Zhuang et al. 2006).

Weiterhin phosphoryliert Chk2 den Transkriptionsfaktor Foxm1, was dessen Stabilität erhöht und zu verstärkter Transkription von Xrcc1 und Brca2 führt, die beide bei der DNA-Reparatur eine Rolle spielen (Tan et al. 2007).

### **6.3.6 Chk2 und Zelltod durch Apoptose oder Mitotische Katastrophe**

Bei starken DNA-Schäden, die die Kapazitäten der Zelle zur Reparatur und Erholung übersteigen, wird Apoptose ausgelöst. Eine zentrale Rolle dabei spielt p53, das sowohl durch Chk2 als auch Chk2-unabhängig aktiviert wird. Chk2 phosphoryliert p53 in seiner N-terminalen Aktivierungsdomäne an Ser20 und Thr18 (Chehab et al. 2000, Shieh et al. 2000, Hirao et al. 2000, Takai et al. 2002). p53 wird dadurch stabilisiert und aktiviert und reguliert über seine zahlreichen Effektoren dann außer Zelltod auch DNA-Reparatur und Zellzyklus. Bei Chk2-defizienten Mauszellen ist die p53-abhängige Apoptose nach ionisierender Strahlung gestört (Hirao et al. 2000, Hirao et al. 2002, Jack et al. 2002, Takai et al. 2002). Es existieren aber auch p53-unabhängige Wege der Apoptosevermittlung durch Chk2 über Pml (Yang et al. 2002) und den

Transkriptionsfaktor E2f1, der die p53-Familienmitglieder p63 und p73 aktiviert, die dann ähnlich wie p53 die Transkription verschiedener Bcl-2-Proteine beeinflussen (Roos et al. 2006, Schmitt et al. 2007, Graupner et al. 2011). Auch sind noch weitere Chk2-Zielmoleküle wie Plk3 an der Apoptosevermittlung beteiligt. Die erzwungene Überexpression von Chk2 in humanen Tumorzellen kann sowohl Apoptose als auch Seneszenz induzieren (Chen et al. 2005). Chk2 hat in diesem Sinne eine proapoptotische Wirkung.

Allerdings findet sich nach ionisierender Strahlung in Tumorzellen auch bei Inhibition von Chk2 eine erhöhte Apoptoserate (Yu et al. 2001). Da Tumorzellen bereits Kontrollpunktdefekte aufweisen, führt der zusätzliche Verlust der Chk2-Kontrollfunktion zu einem Übermaß an irreparablen DNA-Schäden und infolgedessen zum Zelltod. Eine Erklärung dafür bietet das Konzept der Mitotischen Katastrophe, eine Variante des Zelltodes, die der Apoptose sehr ähnelt und während einer misslungenen Mitose stattfindet (Übersichten in: Castedo et al. 2004a, Okada et al. 2004). Normalerweise verhindert bei DNA-Schäden der G2-M-Kontrollpunkt den Eintritt in die Mitose. Es ist daher nicht überraschend, dass die Schädigung dieses Kontrollpunktes durch Inaktivierung beteiligter Gene verstärkt zu Mitotischer Katastrophe führt. Dies wurde gezeigt für Chk2 (Castedo et al. 2004b), Atm, Atr, Chk1 (Chen et al. 2003), p53 (Bunz et al. 1998) und 14-3-3- $\sigma$  (Chan et al. 1999). Innerhalb der Mitotischen Katastrophe führen zwei Wege zum Zelltod. Der bei Chk2-Inaktivierung involvierte Weg löst p53-unabhängig während oder nahe der Metaphase Zelltod aus (Castedo et al. 2004a, Castedo et al. 2004b). Ein anderer Weg führt in G1 nach einer fehlgeschlagenen Mitose zum Zelltod und ist p53-abhängig.

### **6.3.7 Die Chk2-p53-Verbindung**

Sowohl Chk2 als auch p53 haben zentrale Rollen in der Vermittlung von Zellzyklusstopp und Apoptose. Viele Experimente haben gezeigt, dass p53 durch Chk2 in seiner N-terminalen Aktivierungsdomäne an Ser20 und Thr18 phosphoryliert wird (Chehab et al. 2000, Shieh et al. 2000, Hirao et al. 2000, Takai et al. 2002). p53 wird dadurch stabilisiert und aktiviert und reguliert dann über seine zahlreichen Effektoren DNA-Reparatur, Zellzyklus und Zelltod.

Allerdings warf die Verbindung zwischen Chk2 und p53 zwei wesentliche Fragen auf. So weist p53 um Ser20 nicht die reguläre Konsensussequenz L-X-R-X-X-S/T für Chk2-Substrate auf (O'Neill et al. 2002). Anders als Cdc25a, das die Chk2-Konsensussequenz enthält und dadurch auch als kurzes Peptid ein gutes Chk2-Substrat darstellt, sind zur Phosphorylierung von p53 an Ser20 und Thr18 offenbar Konformationsänderungen in Chk2 erforderlich. Diese werden durch Interaktion von Chk2 mit p53-Bereichen fern der eigentlichen Phosphorylierungsstelle induziert (Craig et al. 2003). p53 stellt damit ein Mitglied einer neuen Klasse von Chk2-Substraten dar, die durch allosterische Veränderungen von Chk2 dessen Kinaseaktivität auf sich lenken.

Die andere Frage betrifft die Relevanz des Chk2-p53-Signalwegs. Denn Chk2-Inaktivierung durch Knock-out des Chk2-Gens in Mäusen oder RNA-Interferenz führt zu nur partiellen oder keinen Störungen der DNA-Schaden-induzierten Phosphorylierung an murinem Ser23 (entspricht humanem Ser20) und Stabilisierung von p53 (Hirao et al. 2000, Hirao et al. 2002, Takai et al. 2002, Ahn et al. 2003, Jallepalli et al. 2003). Allerdings ist dabei die Transkriptionsaktivierung von p53-Zielen wie p21 und Noxa gestört. Chk2 moduliert offenbar die p53-Wirkung, ohne die Stabilisierung von p53 komplett zu verhindern, was auf Chk2-unabhängige Wege der p53-Stabilisierung verweist. Die Atm/Atr-Hipk2-abhängige p53-Aktivierung nach DNA-Schäden (Bitomsky et al. 2009, Puca et al. 2010) bietet dafür keine ausreichende Erklärung, da Hipk2 p53 an Ser46 phosphoryliert. Die Regulation von p53 ist komplex und noch nicht abschließend geklärt (Vousden et al. 2009).

### **6.3.8 Chk2 als räumlicher Verteiler des Signals**

DNA-Schäden wie beispielsweise Doppelstrangbrüche sind sehr lokalisierte Ereignisse, haben jedoch außer an den Schadenstellen auch Auswirkungen auf entfernte und weiträumig stattfindende Zellprozesse wie die DNA-Replikation, sogar extranukleäre Abläufe werden beeinflusst. Untersuchungen zur räumlich-zeitlichen Koordination der Kontrollpunktantwort in lebenden Zellen durch Darstellungstechniken mit fluoreszenzmarkierten Molekülen offenbarten nun für Chk2 eine wesentliche Rolle in der räumlichen Verteilung des DNA-Schadensignals. Viele der an der Schadenantwort beteiligten Sensor- und Mediatorproteine, darunter Brca1, 53Bp, Nbs1 und Pml,

konzentrieren sich nach Doppelstrangbrüchen an den Schadenstellen und verweilen dort, mikroskopisch darstellbar als Schadenfokusse (Sancar et al. 2004, Li et al. 2005b). Für aktiviertes Chk2 wurde dagegen eine rasche Neuverteilung im Zellkern innerhalb von Sekunden beobachtet, es kam zu keiner Anhäufung an den Schadenstellen (Lukas et al. 2003). Dabei fand die aktivierende Phosphorylierung von Chk2 durch Atm ausschließlich an den Schadenstellen statt. Dies spricht für eine Rolle als räumlicher Verteiler des Kontrollpunktsignals. Auch Chk1 zeigte eine gleiche räumliche Verteilung nach DNA-Schäden (Bartek et al. 2003), was einmal mehr auf analoge Funktionen dieser beiden Kinasen hinweist.

### **6.3.9 Vergleich von Chk1 und Chk2**

Die beiden Proteinkinasen Chk1 und Chk2 haben trotz ihrer unterschiedlichen chemischen Strukturen teils überlappende Funktionen, unterscheiden sich jedoch in grundlegenden Aspekten (Bartek et al. 2003, Ahn et al. 2004). Sie weisen mehrere gemeinsame Zielproteine auf, die sie meist - wenn auch nicht immer - auch an den gleichen Positionen phosphorylieren, darunter die wesentlich an Zellzyklusstopp und Apoptose beteiligten Proteine p53, Cdc25a und Cdc25c (Pommier et al. 2005). Andere Moleküle werden dagegen offenbar nur von einer der beiden Kinasen phosphoryliert, so wurde eine Wirkung auf Brca1, Pml und Ef21 nur für Chk2 nachgewiesen (Pommier et al. 2005).

Wie bereits ausgeführt führen verschiedene Typen von DNA-Schäden zur Aktivierung verschiedener Kontrollpunktsignalwege (Kastan et al. 2004, Li et al. 2005b). Doppelstrangbrüche (durch ionisierende Strahlung oder radiomimetische Substanzen) sowie Telomererosion aktivieren vor allem Atm und darüber Chk2 (Iliakis et al. 2003). Viele andere DNA-Schäden aktivieren dagegen überwiegend Atr und folgend Chk1, darunter UV-Licht, viele chemische Substanzen, DNA-Einzelstrangbereiche und blockierte Replikationsgabeln (Paulsen et al. 2007, Dai et al. 2010).

Relevante Unterschiede zwischen Chk1 und Chk2 erschließen sich jedoch auch aus einem anderen Blickwinkel. Das labilere Chk1-Protein (Halbwertszeit unter zwei Stunden) ist hauptsächlich in der S- und G2-Phase vorhanden. Es ist auch im normalen Zellzyklus aktiv (so bei der physiologischen Inaktivierung von Cdc25a) (Zachos et al.

2007) und wird bei DNA-Schäden und gestörter Replikation zusätzlich aktiviert. Bei Säugern ist Chk1 unentbehrlich für die frühe embryonale Entwicklung, so sterben Chk1-defiziente Mäuse in der Embryonalphase. Chk1 ist daher ein essenzielles Gen, dessen Funktion kaum ersetzt werden kann. Das erklärt auch die seltenen Funde von Chk1-Mutationen in Tumoren (Bartek et al. 2003).

Das stabile Chk2 dagegen (Halbwertszeit über sechs Stunden) wird in allen Phasen des Zellzyklus exprimiert und ist bei Abwesenheit von DNA-Schäden größtenteils inaktiv und für den normalen Zellzyklus nicht erforderlich. Chk2-defiziente Mäuse sind lebensfähig und fruchtbar und zeigen keine erhöhte Tumoranfälligkeit, außer sie sind der Wirkung von Karzinogenen ausgesetzt. Chk2 ist damit offenbar größtenteils entbehrlich für die Lebensfähigkeit der Zellen unter normalen Umständen.

### **6.3.10 Wie wichtig ist Chk2 für DNA-Schadenantwort und Onkogenese?**

In präkanzerösen Läsionen und in Malignomen findet sich häufig eine konstitutive Aktivierung der zellulären DNA-Schadenantwortprogramme, insbesondere auch des Atm-Chk2-p53-Signalweges (Bartkova et al. 2005, Gorgoulis et al. 2005, Bartek et al. 2007a). Vor allem bei Doppelstrangbrüchen und Telomererosion steuert Chk2 Signale zur Schadenantwort bei. Für die verschiedenen Zellantworten auf DNA-Schäden ist die Bedeutung eines intakten Chk2 jedoch unterschiedlich: Wie dargestellt ist die Apoptose bei Chk2-Verlust deutlich gestört. Auch ist ein intaktes Chk2 für einige DNA-Reparaturprozesse erforderlich. Dagegen ist die Relevanz von Chk2 für den Zellzyklusarrest unklar. Zwar ist Chk2 zweifellos in die Zellzykluskontrolle involviert, jedoch scheint es dabei in vielen Situationen entbehrlich zu sein. Dies trifft auch für den p53-vermittelten Zellzyklusarrest zu. Hingegen ist Chk2 nötig für die replikative Seneszenz.

Deutlich wird, dass Chk2 für die zelluläre DNA-Schadenantwort und Erhaltung der genomischen Integrität nur bedingt nötig ist. In ansonsten gesunden Zellen werden bei Ausfall von Chk2 dessen Funktionen teilweise durch andere Proteine redundant übernommen. Bei Tumoren mit vorhandenen Schäden in den Signalwegen hängen die Folgen eines Chk2-Funktionsverlustes vom jeweiligen zellulären Kontext und Mutationsstatus ab. Auch der Effekt einer therapeutischen Chk2-Beeinflussung durch

Inhibition oder Überaktivierung wird entscheidend vom konkreten Mutationsprofil des Tumors abhängen.

Die zahlreichen verschiedenen Funktionen von Chk2 und die enorme Komplexität der an der DNA-Schadenantwort beteiligten Signalwege lassen einfache Aussagen zur Bedeutung einzelner Komponenten nicht zu. Insgesamt ist die Bedeutung von Chk2 beziehungsweise Chk2-Verlust für die Onkogenese und Tumorprogression zweifellos vorhanden aber als Einzeleffekt doch sehr begrenzt. Dies zeigt sich auch darin, dass angeborene Chk2-Defekte gering zu Tumoren prädisponieren und sporadische Chk2-Mutationen in humanen Tumoren eher selten beobachtet werden. Dies wird im folgenden Abschnitt diskutiert.

## **6.4 Inaktivierung von Komponenten des Atm-Chk2-Signalwegs in humanen Tumoren**

### **6.4.1 Kongenitale Chk2-Varianten: Bedeutung für Li-Fraumeni-Syndrom, Mammakarzinom und weitere Tumorarten**

#### **Li-Fraumeni-Syndrom**

Beim Li-Fraumeni-Syndrom (LFS), einem familiären Tumorsyndrom mit Neigung vor allem zu Brustkrebs und Sarkomen, finden sich typischerweise p53-Keimbahnmutationen (OMIM 2008f). Die bei einigen Familien mit LFS oder LFS-Varianten und p53-Wildtyp gefundene 1100delC-Keimbahnmutation in Chk2 (Bell et al. 1999, Vahteristo et al. 2001, OMIM 2008g) wurde anfangs als krankheitsverursachend für diese Fälle angenommen. Allerdings tritt diese Genvariante mit einer Häufigkeit von ca. 1,1 bis 1,4% auch in der Allgemeinbevölkerung auf (Vahteristo et al. 2002, Meijers-Heijboer et al. 2002) und kann damit nicht die Hauptursache für das sehr penetrant vererbte LFS bzw. dessen Varianten sein. Auch andere Chk2-Mutationen wurden beim LFS gefunden (Lee et al. 2001), die geringe gemeinsame Segregation mit Tumoren in den betroffenen Familien spricht auch da gegen eine wesentliche krankheitsverursachende Bedeutung (Sodha et al. 2002).

## Mammakarzinom

Brustkrebs ist der häufigste Tumor bei Frauen in der westlichen Welt (Jemal et al. 2011). Trotz der identifizierten hoch penetranten Risikogene Brca1 und Brca2 und einigen seltenen Tumorsyndromen mit Mutationen in p53 und anderen Genen bleiben die Ursachen für familiäre Häufungen von Brustkrebs größtenteils unklar (Ripperger et al. 2009). Es wurden mehrere moderat penetrante Risikogene identifiziert, deren Mutationen das Brustkrebsrisiko zwar signifikant jedoch gering erhöhen, dazu gehört neben Atm, Brip1, Palb2 und Rad50 auch Chek2 (Ripperger et al. 2009). So erhöht die 1100delC-Mutation in Chek2 das Brustkrebsrisiko zwei- bis dreifach, bei familiärem Brustkrebs sogar bis fünffach (Metaanalyse in Weischer et al. 2008). Das kodierte Chk2-Protein ist dabei verkürzt, die Kinasedomäne und damit Aktivität fehlen (Wu et al. 2001). Allerdings variiert der Beitrag der Chek2-1100delC-Mutation sowie der anderen genetischen Veränderungen zum Tumorrisiko sehr in Abhängigkeit von der untersuchten ethnischen Population (Gronwald et al. 2009, Ripperger et al. 2009, Iniesta et al. 2010). Neben 1100delC werden auch andere Chek2-Mutationen gehäuft bei Brustkrebspatientinnen gefunden (Shuen et al. 2011, Zhang et al. 2011).

Brustkrebs bei Männern (Überblick in Ottini et al. 2010) ist viel seltener als bei Frauen, nur knapp 1% aller Brustkrebsfälle betreffen Männer, die Inzidenz beträgt etwa 1 pro 100 000 Personen pro Jahr (Nahleh et al. 2006). Wie bei Frauen wird auch Brustkrebs bei Männern wahrscheinlich durch hormonelle, Umwelt- und genetische Risikofaktoren verursacht (Brinton et al. 2008). Mit einigen Abweichungen weist Brustkrebs bei Männern und Frauen die selben genetischen Risikofaktoren auf. Von den beiden Hochrisikogenen Brca1 und Brca2 spielt das letztere eine bedeutsamere Rolle bei Männern (Ottini et al. 2010). Initial wurde über einen hohen Beitrag der Chek2-1100delC-Mutation für das Brustkrebsrisiko bei Männern berichtet (Meijers-Heijboer et al. 2002). Konkret wurde geschätzt, dass diese Mutation 9% aller männlichen Brustkrebsfälle verursacht sowie das Risiko bei Männern ohne Brca1- oder Brca2-Mutationen etwa zehnfach erhöht. Diese hohe Penetranz wurde in weiteren Untersuchungen nicht bestätigt, es fand sich keine Häufung der 1100delC-Mutation oder eine eher dem weiblichen Brustkrebs vergleichbare moderate Penetranz (Neuhausen et al. 2004, Syrjakoski et al. 2004, Weiss et al. 2005, Nevanlinna et al. 2006, Falchetti et al. 2008, Wasielewski et al. 2009). Wie auch bei Frauen variiert der Beitrag zum Tumorrisiko dabei sehr je nach untersuchter ethnischer Population.

## **Andere Tumorarten**

Bei Prostatakarzinomen wurden neben sporadischen auch verschiedene Keimbahnmutationen von Chek2 gehäuft nachgewiesen (Dong et al. 2003, Seppala et al. 2003, Cybulski et al. 2004). Inzwischen wurde für weitere Tumorarten eine Assoziation mit Chek2-Keimbahnmutationen beschrieben, so für Tumoren von Blase (Zlowocka et al. 2008), Kolon/Rektum (Cybulski et al. 2004, Kilpivaara et al. 2006), Ovar (Szymanska-Pasternak et al. 2006), Nieren und Schilddrüsen (Cybulski et al. 2004).

### **6.4.2 Chk2-Mutationen bei sporadischen Tumoren**

Mutationen des Chek2-Gens werden in geringer Häufigkeit bei vielen verschiedenen Tumorarten gefunden, so bei Karzinomen von Brust (Sullivan et al. 2002, Meijers-Heijboer et al. 2002), Lunge (Haruki et al. 2000, Miller et al. 2002), Prostata (Dong et al. 2003), Kolon (Ingvarsson et al. 2002), Ovar (Miller et al. 2002, Ingvarsson et al. 2002) und Vulva (Reddy et al. 2002), sowie bei Lymphomen (Tort et al. 2002) und Osteosarkomen (Miller et al. 2002). Der Anteil von Fällen mit Chek2-Mutationen beträgt in den genannten Studien stets deutlich weniger als zehn Prozent, im Mittel 4 bis 5 Prozent. Meist liegen Missense- oder verkürzende Mutationen vor, die alle drei Domänen von Chk2 betreffen. Einige der Mutationen wurden auf Proteinebene charakterisiert, dabei zeigten sich instabile Proteinvarianten (Lee et al. 2001, Matsuoka et al. 2001), Varianten mit verminderter oder fehlender Kinaseaktivität (Matsuoka et al. 2001, Wu et al. 2001) oder mit verminderter Effektorerkennung durch Defekte in der FHA-Domäne (Falck et al. 2001a, Falck et al. 2001b, Li et al. 2002). Einige Mutanten zeigen einen dominant-negativen Effekt auf das koexprimierte Wildtyp-Chk2, die anderen interferieren nicht mit dem verbliebenen Wildtyp-Chk2 und führen erst bei Verlust des Wildtyp-Allels, wie bei einigen Tumoren beobachtet, zu einem Funktionsverlust auf Proteinebene.

Bei einigen Tumoren ist die Konzentration des Chk2-Proteins stark vermindert oder gar nicht messbar, obwohl keine Mutation des Chek2-Gens vorhanden ist (Sullivan et al. 2002, Tort et al. 2002). Epigenetisches Silencing der Genexpression durch Promotor-Methylierung konnte in diesen Fällen ausgeschlossen werden und auch die mRNA-

Konzentrationen sind normal. Daher müssen posttranskriptionelle Einflüsse verantwortlich sein für die Downregulation von Chk2.

Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen die relative Seltenheit von Chk2-Mutationen in Tumoren, denn nur in vier der 47 untersuchten Zelllinien wurden Veränderungen gefunden: In den Kolonkarzinomlinien HCT-15 und DLD-1 (die vom selben Originaltumor stammen) wurden die schon bekannten Missense-Mutationen R145W und A247D bestätigt, in der Kolonkarzinomlinie HCT-116 sowie der Mammakarzinomlinie MATU zeigte sich die Missense-Mutation L355P und in der Variante HCT-116 (a) fand sich zusätzlich eine Nonsense-Deletion.

In keiner der untersuchten Leukämie- und Lymphomzelllinien konnte eine Chk2-Mutation ausgemacht werden. Da jedoch Mutationen des direkten Chk2-Aktivators Atm besonders mit Leukämien und Lymphomen assoziiert sind deutet dies darauf hin, dass bei Atm-Funktionsverlust nicht der Ausfall der Chk2-Aktiveringung für die Zelle relevant ist, sondern der Verlust einer der zahlreichen anderen Funktionen von Atm.

### **6.4.3 Mutationen von Atm und Chk1**

Der Ataxia-Telangiectasia, bei der eine Neigung zu Malignomen, insbesondere Lymphomen und lymphatischen Leukämien, auftritt, liegen biallele Keimbahndefekte im Atm-Gen zugrunde (Savitsky et al. 1995, OMIM 2008a). Monoallele Defekte des Atm-Gens erhöhen leicht das Brustkrebsrisiko (Swift et al. 1987, Thompson et al. 2005, Renwick et al. 2006). Auch bei sporadischen Tumoren, vor allem bei Leukämien und Lymphomen, findet man Atm-Mutationen (Vorechovsky et al. 1997, Schaffner et al. 1999, Stilgenbauer et al. 1999, Schaffner et al. 2000). Defekte des parallel zu Chk2 wirkenden Chk1 werden in Tumoren extrem selten gefunden (Bartek et al. 2003), wahrscheinlich aufgrund der vitalen Bedeutung von Chk1 auch für den normalen Zellzyklusablauf, so dass ein Defekt von Chk1 den Zellen meist die Überlebensfähigkeit nimmt.

## 6.5 Chk2 als Angriffspunkt der Chemotherapie

Herkömmliche Chemotherapeutika und Strahlentherapie wirken durch DNA-Schädigung. Erfahrungsgemäß kommt es dabei nicht selten zur Selektion besonders widerstandsfähiger Zellen und zu Resistenzen. Beispielsweise ist bekannt, dass bei Patienten mit B-CLL (B-Zell-chronisch-lymphatischer Leukämie) p53-Mutationen erst durch DNA-schädigende Chemotherapien hervorgerufen werden und dies dann mit einer partiellen Chemotherapieresistenz und schlechteren Prognose assoziiert ist (Sturm et al. 2003). Eine Kombination herkömmlicher Tumortherapien mit einer gezielten medikamentösen Beeinflussung von Signalwegen des Zellzykluskontrollsystems, der zellulären DNA-Schadenantwort oder der Apoptoseregulation eröffnet vielversprechende neue Strategien in der Tumortherapie (Übersichtsartikel: Senderowicz 2004, O'Connor et al. 2007, Burz et al. 2009, Garrett et al. 2011).

### 6.5.1 Chk2-Inhibition

Da Tumorzellen bereits Defekte der DNA-Schadenantwort und im Zellzykluskontrollsystem aufweisen, könnte durch eine therapeutische Inhibition weiterer Kontrollpunktmechanismen die Antwort der Tumorzellen auf DNA-Schäden so stark gestört werden, dass sie aufgrund überhand nehmender DNA-Schäden nicht mehr lebensfähig sind und durch Apoptose, Mitotische Katastrophe oder andere Mechanismen absterben. Normale Zellen mit mehreren möglichen Kontrollpunktmechanismen hätten dagegen bessere Überlebenschancen (O'Connor et al. 2007, Garrett et al. 2011). Auf etwas paradoxe Weise nutzt man also zur Tumortherapie die Hemmung von Signalwegen, die normalerweise als Barriere gegen die Tumorentwicklung dienen. Der Effekt einer Bestrahlung oder herkömmlicher DNA-schädigender Chemotherapeutika würde so erhöht werden. Im Idealfall wären diese zusätzlichen DNA-schädigenden Therapien gar nicht mehr nötig, da die in Tumorzellen generell erhöhte DNA-Schadenhäufigkeit bereits zum Zelltod führen könnte (O'Connor et al. 2007). Die schädigenden Nebenwirkungen auf gesundes Gewebe könnten so minimiert werden.

Die Kontrollpunktkinasen Chk1 und Chk2 sind in diesem Kontext als Regulatoren von Zellzyklusarrest und DNA-Reparatur bei DNA-Schäden hochinteressante potenzielle Chemotherapieziele. Es müssen grundlegend zwei Arten von Tumoren unterschieden werden: solche mit noch intakter Funktion von Chk1 bzw. Chk2 und jene, bei denen die jeweilige Funktion gestört ist. Bei ersteren kann eine Inhibition von Chk1 bzw. Chk2 von therapeutischem Nutzen sein, bei letzteren die Inhibition anderer Kontrollpunktsignalwege. Es sind verschiedene Chk1- und Chk2-Inhibitoren in der Entwicklung, von denen einige in Kombination mit herkömmlichen Chemotherapeutika bereits in klinischen Studien der Phasen I und II an Patienten getestet werden (ausführliche Übersichten in Janetka et al. 2007, Garrett et al. 2011). Drei verschiedene Aspekte sind dabei bei der Etablierung therapeutischer Strategien zu beachten und Gegenstand aktueller Forschung: Erstens, bei welchem konkreten genetischen Kontext bei welchen Tumorarten ist eine Therapie mit Kontrollpunktkinase-Inhibitoren sinnvoll? Insbesondere bei p53-defizienten Tumoren, bei denen der G1-Kontrollpunkt schon gestört ist, kann eine zusätzliche Inhibition von Chk2 oder anderer am G2-Kontrollpunkt beteiligter Kinasen von therapeutischem Nutzen sein (Kawabe 2004). Zweitens die Wahl optimaler, synergistisch wirkender Kombinationen von Kontrollpunktkinase-Inhibitoren mit anderen Chemotherapeutika bzw. Strahlentherapien inklusive sinnvoller zeitlich abgestimmter Applikationsschemata. Und drittens hemmen manche entwickelte Inhibitoren eher unselektiv sowohl Chk1 als auch Chk2 oder auch andere Kinasen, so dass die gefundenen Effekte nicht eindeutig der Chk1- bzw. Chk2-Inhibition zugeordnet werden können. Neue, selektive Chk1- bzw. Chk2-Inhibitoren sind jedoch in der Erprobung (Carlessi et al. 2007, Larson et al. 2007, Janetka et al. 2009, Lainchbury et al. 2011). Es sollte in diesem Zusammenhang auch nicht übersehen werden, dass einige Untersuchungen keinen Effekt der Chk2-Inhibition fanden und Chk1 als einzige für therapeutische Inhibition relevante Kontrollpunktkinase ansehen (Morgan et al. 2006, Xiao et al. 2006, Garrett et al. 2011).

Ähnliche Strategien verfolgen die Inhibition der ebenfalls an den Schadenkontrollpunkten beteiligten Kinasen Atm und Atr (O'Connor et al. 2007).

Ein weiterer Ansatz besteht darin, die Inhibition von Chk2 zum Schutz gesunden Gewebes vor Therapienebenwirkungen zu nutzen. Hintergrund ist die bekannte Resistenz von Chk2-defizienten Mäusen und vieler Chk2-defizienter Zelltypen gegenüber strahlungsinduzierter Apoptose (Hirao et al. 2000, Takai et al. 2002). So

könnte die chemische Chk2-Inhibition gesundes Gewebe vor den Nebenwirkungen einer Strahlentherapie oder Doppelstrangbruch-induzierenden Chemotherapie schützen. Mehrere Stoffe sind für diese Form der Radioprotektion in Erprobung und zeigten entsprechende Effekte an humanen T-Zellen (Arienti et al. 2005) und Maus-Thymozyten (Carlessi et al. 2007, siehe auch Garrett et al. 2011).

### **6.5.2 Chk2-Aktivierung**

Auch die Überaktivierung von Chk2 ohne weitere DNA-schädigende Therapien könnte therapeutisch hilfreich sein, da damit in Tumorzellen Seneszenz oder gar Apoptose induziert werden kann (Chen et al. 2005). Ähnlich kann die Überaktivierung von Chk2-Effektoren wirken, so wird beispielsweise die Wirkung des proapoptotischen Transkriptionsfaktors E2f1 durch Beta-Lapachone verstärkt (Li et al. 2003). Bisher gibt es nur wenige Studien zu diesem Thema. Ein Stopp des Tumorwachstums durch Induktion von Seneszenz kann sich aber auch negativ auswirken, falls die Zelle dadurch den therapiebedingten Zelltod abwenden und später die Seneszenz verlassen kann.

### **6.5.3 Der jeweilige zelluläre Kontext bestimmt die Wirksamkeit einer Therapie**

Es wird deutlich, dass die Wirksamkeit eines jeden Therapieansatzes vom genetischen Hintergrund des jeweiligen Tumors abhängt. Die therapeutische Strategie wird sich danach richten müssen, welche Signalwege von Zellzykluskontrollsystem und DNA-Schadenreparatur im jeweiligen Tumor intakt bzw. defekt sind und wie hoch die Rate endogener DNA-Schäden ist. So könnten auf den individuellen Tumor abgestimmte Therapien entstehen, die dann ausgewählte DNA-schädigende Therapien mit konkreten Eingriffen in Zellzykluskontrolle und DNA-Schadenantwort kombinieren. Aufgrund der enormen Komplexität der zellulären Signalwege mit hunderten beteiligten Proteinen sind keine einfachen Standardlösungen zu erwarten. Zudem müssen die Auswirkungen auf gesundes Gewebe und insbesondere das Risiko von späteren Zweitmalignomen evaluiert werden.

## 7 Schlussfolgerung

Die Proteinkinase Chk2 ist als Signalverteiler auf vielfältige Weise an der zellulären Antwort auf DNA-Schäden beteiligt. Sie trägt in unterschiedlichem Ausmaß zur Regulation von temporärem Zellzyklusarrest, DNA-Reparatur, Seneszenz und dem Zelltod durch Apoptose bei und unterstützt damit den Erhalt der genomischen Integrität der Zelle und verhindert Onkogenese. In dieser Arbeit wurden Mutationen in Chek2, dem Chk2-kodierenden Gen, in vier der 47 untersuchten humanen Tumorzelllinien gefunden. Damit bestätigt sich die bekannte relative Seltenheit von Chek2-Mutationen. Die Bedeutung von Chek2 als tumorkritisches Gen wurde in zahlreichen Studien für die verschiedensten Gewebearten belegt. Für sich allein haben Chek2-Mutationen jedoch nur eine geringe Bedeutung für die Onkogenese.

In der Kolonkarzinomlinie HCT-116 wurden Mutationen in der Kinasedomäne von Chek2 gefunden. HCT-116 wird in zahlreichen Studien zur Erforschung der DNA-Schadenantwort als Modelllinie eingesetzt, eine unbekannt Mutation mit Einfluss auf die Chk2-Funktionalität hätte dabei eine besondere Bedeutung. Zu empfehlen sind daher Untersuchungen zur Auswirkung der hier beschriebenen Mutationen auf die Chk2-Funktionalität sowie Mutationsanalysen der in anderen Studien verwendeten HCT-116-Linien.

Die sich aus der Vielzahl der beteiligten Proteine und deren Wechselwirkungen ergebende enorme Komplexität der Signalwege lässt einfache Aussagen zur Bedeutung einer einzelnen Komponente nicht zu. Welche Auswirkungen ein Defekt oder sonstige Funktionsveränderung hat hängt zudem immer vom konkreten genetischen Kontext, also dem Mutationsstatus anderer Signalwegkomponenten ab, für Chk2 betrifft dies insbesondere p53. Daher wird auch für die künstliche Beeinflussung von Chk2 in der Tumorthherapie die Analyse des genauen Mutationsprofils des jeweiligen Tumors eine entscheidende Rolle spielen.

## 8 Anhang

### 8.1 Basensequenz von Chk2

Nukleotidsequenz des Chk2-Gens auf Chromosom 22, Abschnitt 22q12.1 in 5'-3'-Richtung, 1632 bp umfassend (Transkript, d.h. nur die Exons, die erste und letzte Base jedes Exons sind unterstrichen). Siehe Matsuoka et al. 1998, Brown et al. 1999, Blasina et al. 1999, UniProt 2008, Gene 2008, Ensembl 2008, UniProt-Consortium 2007, CCDS 2012, Maglott et al. 2007, Hubbard et al. 2007, Pruitt et al. 2009.

```

1  atgtctcggg agtcggatgt tgaggctcag cagtctcatg gcagcagtgc ctgttcacag
61  ccccatggca gcgttaccca gtcccaggc tcctcctcac agtcccaggg catatccagc
121 tcctctacca gcacgatgcc aaactccagc cagtccctctc actccagctc tgggacactg
181 agctccttag agacagtgtc cactcaggaa ctctattcta tcctgagga ccaagaacct
241 gaggaccaag aacctgagga gcctaccctt gccccctggg ctcgattatg ggcccttcag
301 gatggatttg ccaatcttga atgtgtgaat gacaactact ggtttgggag ggacaaaagc
361 tgtgaatatt gctttgatga accactgctg aaaagaacag ataaataccg aacatacagc
421 aagaaacact ttcggatttt caggggaagtg ggtcctaaaa actcctacat tgcatacata
481 gaagatcaca gtggcaatgg aacctttgta aatacagagc ttgtagggaa aggaaaacgc
541 cgtcctttga ataacaattc tgaaattgca ctgtcactaa gcagaaataa agtttttgtc
601 ttttttgatc tgactgtaga tgatcagtca gtttatccta aggcatlaag agatgaatac
661 atcatgtcaa aaactcttgg aagtgggtgcc tgtggagagg taaagctggc tttcgagagg
721 aaaacatgta agaaagtagc cataaagatc atcagcaaaa ggaagtttgc tattggttca
781 gcaagagagg cagaccagc tctcaatggt gaaacagaaa tagaaatttt gaaaaagcta
841 aatcatcctt gcatcatcaa gattaaaaac ttttttgatg cagaagatta ttatattggt
901 ttggaattga tggaaggggg agagctgttt gacaaagtgg tggggaataa acgcctgaaa
961 gaagctacct gcaagctcta tttttaccag atgctcttgg ctgtgcagta cttcatgaa
1021 aacggtatta tacaccgtga cttaaagcca gagaatgttt tactgtcatc tcaagaagag
1081 gactgtctta taaagattac tgatthtggg cactccaaga ttttgggaga gacctctctc
1141 atgagaacct tatgtggaac cccacactac ttggcgctg aagttcttgt ttctgttggg
1201 actgctgggt ataaccgtgc tgtggactgc tggagttag gagttattct ttttatctgc
1261 cttagtgggt atccacctt ctctgagcat aggactcaag tgtcactgaa ggatcagatc
1321 accagtggaa aatacaactt cattcctgaa gtctgggcag aagtctcaga gaaagctctg
1381 gaccttgtca agaagttggt ggtagtggat ccaaaggcac gttttacgac agaagaagcc
1441 ttaagacacc cgtggcttca ggatgaagac atgaagagaa agtttcaaga tcttctgtct
1501 gaggaaaatg aatccacagc tctaccccag gttctagccc agccttctac tagtcgaaag
1561 cggccccgtg aaggggaagc cgaggggtgcc gagaccacaa agcgcccagc tgtgtgtgct
1621 gctgtgttgt ga

```

## 8.2 Abkürzungsverzeichnis

53bp1	p53 binding protein 1
A	Adenin
Abl1	c-abl oncogene 1, receptor tyrosine kinase
Akt	protein kinase AKT
Apaf1	apoptotic peptidase activating factor 1
APC	anaphase promoting complex
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
Atm	ataxia telangiectasia mutated
ATP	Adenosin-Triphosphat
Atr	ataxia telangiectasia and Rad3 related
Atrip	ATR interacting protein
Bad	BCL2-associated agonist of cell death
Bcl-2	B-cell CLL/lymphoma 2
Bclxl	Synonym für: Bcl2l1 (Bcl2-like 1)
Bid	BH3 interacting domain death agonist
Bik	BCL2-interacting killer (apoptosis-inducing)
Bim	BCL2-interacting mediator of cell death
bp	base pair, Basenpaar
Brca1 /2	breast cancer 1 /2, early onset
Brct domain	Brca1 C terminal repeat domain
Bub1 /3	budding uninhibited by benzimidazoles 1 /3 homolog
Bubr1	Synonym für: Bub1b (budding uninhibited by benzimidazoles 1 homolog beta)
C	Cytosin
CAK	CdK-activating kinase
Caspase	Cystein-haltige, an Aspartat schneidende Protease
Cdc20	cell division cycle 20 homolog
Cdc25a /b /c	cell division cycle 25 homolog A /B /C
CdK1 /2 /4 /6 /7	cyclin dependent kinase 1 /2 /4 /6 /7
Cdkn1a /b /c /2a /b /c /d	cyclin-dependent kinase inhibitor 1A /B /C /2A /B /C /D
Chek1 /2	checkpoint kinase 1 /2, Kontrollpunktkinase 1 /2
Chk1 /2	checkpoint kinase 1 /2, Kontrollpunktkinase 1 /2
Cip	CDK-interaction protein
CTP	Cytidin-Triphosphat
dATP /CTP /GTP /NTP /TTP	Desoxy-ATP /CTP /GTP /NTP /TTP
Dcamk1l	doublecortin- and calmodulin kinase-like 1
ddATP /CTP /GTP /NTP /TTP	Didesoxy-ATP /CTP /GTP /NTP /TTP
Ddb2	damage-specific DNA binding protein 2
DNA	deoxyribonucleic acid, Desoxyribonukleinsäure
DNA-PK	DNA-protein kinase
DR	death receptor
DSB	double-strand break
E2f	e2f transcription factor
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
Erc3 /4 /5	excision repair cross-complementing rodent repair deficiency,

	complementation group 3 /4 /5
FADD	Fas-associated via death domain
FancA / usw.	Fanconi anemia, complementation group A / usw.
Fas	Synonym für: TNF receptor superfamily, member 6 (TNFRSF6)
FasL	Fas ligand
FHA	forkhead associated domain
Foxm1	forkhead box M1
G	Guanin
Gadd45	growth arrest- and DNA damage-inducible 45
GTP	Guanosin-Triphosphat
H2ax	H2A histone family, member X
hcdc1	homolog of yeast cdh1
HCL	Salzsäure
Hipk2	homeodomain-interacting protein kinase 2
HPLC	high pressure liquid chromatography, Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie
Hus1	cell cycle checkpoint protein Hus1
IAP	Inhibitor-der-Apoptose-Proteine
IGFBP3	insulin-like growth factor binding protein 3
Ink4a /b /c /d	inhibits CDK4 A /B /C /D
Jak	janus kinase
Mdc1	mediator of DNA damage checkpoint 1
Mdm2	mouse double minute 2 homolog
MEN1	multiple endocrine neoplasia 1
Mlh1	mutL homolog 1, colon cancer, nonpolyposis type 2 (E. coli)
Mre11	meiotic recombination 11
mRNA	messenger RNA
Msh2	mutS homolog 2, colon cancer, nonpolyposis type 1 (E. coli)
Myc	myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian)
Myt1	myelin transcription factor 1
Nbs1	Nijmegen breakage syndrome 1 (nibrin)
Nek1 /..11	NIMA (never in mitosis gene a)-related kinase 1 /..11
NF-kB	nuclear factor kappa B
Nima	never in mitosis gene a
Noxa	Synonym für: Pmaip1 (phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1)
NTP	(Ribo-)Nukleosid-Triphosphat
p14-Arf	p14-alternative reading frame
p53	protein 53
PCNA	proliferating cell nuclear antigen
PCR	polymerase chain reaction, Polymerase-Kettenreaktion
PI3K	phosphoinositide-3-kinase
PKA /B /C	protein kinase A /B /C
Plk1 /3	polo-like kinase 1 /3
Pml	promyelocytic leukemia
Pms1	postmeiotic segregation increased 1
Psk-H1	protein serine kinase H1
Puma	Synonym für: BBC3 (BCL2 binding component 3)
Q	Glutamin
Rad1 /3 /9 /17 /50 /51c	Rad1 /3 /9 /17 /50 /51c homolog

Ras	rat sarcoma
Rb	retinoblastoma
RFC	replication factor C
RNA	ribonucleic acid, Ribonucleinsäure
Rpa	replication protein A
S	Serin
SCF	Skp1 (S-phase kinase-associated protein 1)-cullin-F-box
Ser	Serin
Smc1/ 3	structural maintenance of chromosomes 1 /3
Src	protein kinase SRC
SSB	single-strand break
SSCP	single strand conformation polymorphism, Einzelstrang-Konformations-Polymorphismus
Stat	signal transducer and activator of transcription
T	Thymin
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
Taq	Thermus aquaticus (eine Bakterienart)
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TEMED	Tetramethylethyldiamin
Thr	Threonin
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
TNFR	Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TTP	Thymidin-Triphosphat
UV	ultraviolett
Waf1	wildtype p53-activated fragment 1
Wee1	Wee1 homolog
Xpa /Xpc	xeroderma pigmentosum, complementation group A /C
Xrcc1 /9	X-ray repair, complementing defective, in Chinese hamster, 1 /9

## 9 Literaturverzeichnis

- Agner et al. (2005): Differential impact of diverse anticancer chemotherapeutics on the Cdc25A-degradation checkpoint pathway. *Exp Cell Res* 302 (2): 162-9.
- Ahn et al. (2002): Phosphorylation of threonine 68 promotes oligomerization and autophosphorylation of the Chk2 protein kinase via the forkhead-associated domain. *The Journal of biological chemistry* 277 (22): 19389-95.
- Ahn et al. (2003): Questioning the role of checkpoint kinase 2 in the p53 DNA damage response. *J Biol Chem* 278 (23): 20480-9.
- Ahn et al. (2004): The Chk2 protein kinase. *DNA Repair (Amst)* 3 (8-9): 1039-47.
- Alberts et al. (2004): *Molekularbiologie der Zelle*. Weinheim, Wiley-VCH.
- Allen et al. (1994): The SAD1/RAD53 protein kinase controls multiple checkpoints and DNA damage-induced transcription in yeast. *Genes Dev* 8 (20): 2401-15.
- Antoni et al. (2007): CHK2 kinase: cancer susceptibility and cancer therapy - two sides of the same coin? *Nat Rev Cancer* 7 (12): 925-36.
- Arienti et al. (2005): Checkpoint kinase inhibitors: SAR and radioprotective properties of a series of 2-arylbenzimidazoles. *J Med Chem* 48 (6): 1873-85.
- Asou et al. (1991): Establishment of a human acute myeloid leukemia cell line (Kasumi-1) with 8;21 chromosome translocation. *Blood* 77 (9): 2031-6.
- Bahassi el et al. (2009): Mice with the CHEK2\*1100delC SNP are predisposed to cancer with a strong gender bias. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106 (40): 17111-6.
- Bargou et al. (1993): Characterization of a novel Hodgkin cell line, HD-MyZ, with myelomonocytic features mimicking Hodgkin's disease in severe combined immunodeficient mice. *J Exp Med* 177 (5): 1257-68.
- Bartek et al. (2007a): DNA damage signalling guards against activated oncogenes and tumour progression. *Oncogene* 26 (56): 7773-9.
- Bartek et al. (2001): CHK2 kinase--a busy messenger. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2 (12): 877-86.
- Bartek et al. (1990): Genetic and immunochemical analysis of mutant p53 in human breast cancer cell lines. *Oncogene* 5 (6): 893-9.
- Bartek et al. (2003): Chk1 and Chk2 kinases in checkpoint control and cancer. *Cancer Cell* 3 (5): 421-9.
- Bartek et al. (2007b): DNA damage checkpoints: from initiation to recovery or adaptation. *Curr Opin Cell Biol* 19 (2): 238-45.
- Bartek et al. (2007c): DNA damage response as an anti-cancer barrier: damage threshold and the concept of 'conditional haploinsufficiency'. *Cell Cycle* 6 (19): 2344-7.
- Bartek et al. (2004): Checking on DNA damage in S phase. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5 (10): 792-804.
- Bartkova et al. (2005): DNA damage response as a candidate anti-cancer barrier in early human tumorigenesis. *Nature* 434 (7035): 864-70.
- Bell et al. (1999): Heterozygous germ line hCHK2 mutations in Li-Fraumeni syndrome. *Science* 286 (5449): 2528-31.
- Bellizzi et al. (2009): Colorectal cancer due to deficiency in DNA mismatch repair function: a review. *Adv Anat Pathol* 16 (6): 405-17.
- Ben-Porath et al. (2004): When cells get stressed: an integrative view of cellular senescence. *J Clin Invest* 113 (1): 8-13.
- Bensaad et al. (2007): p53: new roles in metabolism. *Trends Cell Biol* 17 (6): 286-91.
- Bitomsky et al. (2009): Apoptosis and autophagy: Regulation of apoptosis by DNA damage signalling - roles of p53, p73 and HIPK2. *FEBS J* 276 (21): 6074-83.
- Blasina et al. (1999): A human homologue of the checkpoint kinase Cds1 directly inhibits Cdc25 phosphatase. *Current biology* 9 (1): 1-10.
- Brady et al. (2010): p53 at a glance. *J Cell Sci* 123 (Pt 15): 2527-32.

- Brattain et al. (1981): Heterogeneity of malignant cells from a human colonic carcinoma. *Cancer Res* 41 (5): 1751-6.
- Brinton et al. (2008): Prospective evaluation of risk factors for male breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 100 (20): 1477-81.
- Brown (2003): The ATR-independent DNA replication checkpoint. *Cell Cycle* 2 (3): 188-9.
- Brown et al. (1999): A human Cds1-related kinase that functions downstream of ATM protein in the cellular response to DNA damage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96 (7): 3745-50.
- Bunz et al. (1998): Requirement for p53 and p21 to sustain G2 arrest after DNA damage. *Science* 282 (5393): 1497-501.
- Burz et al. (2009): Apoptosis in cancer: key molecular signaling pathways and therapy targets. *Acta Oncol* 48 (6): 811-21.
- Buzin et al. (2000): Scanning by DOVAM-S detects all unique sequence changes in blinded analyses: evidence that the scanning conditions are generic. *Biotechniques* 28 (4): 746-50, 52-3.
- Cailleau et al. (1974): Breast tumor cell lines from pleural effusions. *J Natl Cancer Inst* 53 (3): 661-74.
- Campisi (2005): Senescent cells, tumor suppression, and organismal aging: good citizens, bad neighbors. *Cell* 120 (4): 513-22.
- Carlessi et al. (2007): Biochemical and cellular characterization of VRX0466617, a novel and selective inhibitor for the checkpoint kinase Chk2. *Mol Cancer Ther* 6 (3): 935-44.
- Carnero et al. (1998): The INK4 family of CDK inhibitors. *Curr Top Microbiol Immunol* 227: 43-55.
- Carrassa et al. (2004): Chk1, but not Chk2, is involved in the cellular response to DNA damaging agents: differential activity in cells expressing or not p53. *Cell Cycle* 3 (9): 1177-81.
- Castedo et al. (2004a): Cell death by mitotic catastrophe: a molecular definition. *Oncogene* 23 (16): 2825-37.
- Castedo et al. (2004b): The cell cycle checkpoint kinase Chk2 is a negative regulator of mitotic catastrophe. *Oncogene* 23 (25): 4353-61.
- Castro et al. (2005): The anaphase-promoting complex: a key factor in the regulation of cell cycle. *Oncogene* 24 (3): 314-25.
- CCDS (2012): CHEK2. Consensus Coding Sequence (CCDS) Database, National Center for Biotechnology Information (NCBI), National Library of Medicine (NLM), National Institutes of Health (NIH), Bethesda, MD, USA, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/CCDS/CcidsBrowse.cgi>, ID: 13843, Zugriff: 06/2012.
- Champelovier et al. (1994): Selection and characterization of an erythroeosinophilic subclone (LAMA-87) and an eosinophilic subclone (LAMA-88) from the multipotential cell line LAMA-84. *Leuk Res* 18 (12): 903-18.
- Chan et al. (1999): 14-3-3Sigma is required to prevent mitotic catastrophe after DNA damage. *Nature* 401 (6753): 616-20.
- Chang et al. (2003): Regulation of cell cycle progression and apoptosis by the Ras/Raf/MEK/ERK pathway (Review). *Int J Oncol* 22 (3): 469-80.
- Chaturvedi et al. (1999): Mammalian Chk2 is a downstream effector of the ATM-dependent DNA damage checkpoint pathway. *Oncogene* 18 (28): 4047-54.
- Chehab et al. (2000): Chk2/hCds1 functions as a DNA damage checkpoint in G(1) by stabilizing p53. *Genes Dev* 14 (3): 278-88.
- Chen et al. (1984): Establishment and characterization of a human monocytoid leukemia cell line, CTV-1. *Gann* 75 (8): 660-4.
- Chen et al. (1995): DLD-1 and HCT-15 cell lines derived separately from colorectal carcinomas have totally different chromosome changes but the same genetic origin. *Cancer Genet Cytogenet* 81 (2): 103-8.
- Chen et al. (2005): Dual induction of apoptosis and senescence in cancer cells by Chk2 activation: checkpoint activation as a strategy against cancer. *Cancer Res* 65 (14): 6017-21.
- Chen et al. (2003): Human Chk1 expression is dispensable for somatic cell death and critical for sustaining G2 DNA damage checkpoint. *Mol Cancer Ther* 2 (6): 543-8.

- Chrisanthur et al. (2008): CHEK2 mutations affecting kinase activity together with mutations in TP53 indicate a functional pathway associated with resistance to epirubicin in primary breast cancer. *PLoS One* 3 (8): e3062.
- Chrisanthur et al. (2011): Predictive and prognostic impact of TP53 mutations and MDM2 promoter genotype in primary breast cancer patients treated with epirubicin or paclitaxel. *PLoS One* 6 (4): e19249.
- Cottu et al. (1996): Inverse correlation between RER+ status and p53 mutation in colorectal cancer cell lines. *Oncogene* 13 (12): 2727-30.
- Craig et al. (2003): Allosteric effects mediate CHK2 phosphorylation of the p53 transactivation domain. *EMBO reports* 4 (8): 787-92.
- Cybulski et al. (2004): CHEK2 is a multiorgan cancer susceptibility gene. *Am J Hum Genet* 75 (6): 1131-5.
- d'Adda di Fagagna et al. (2003): A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence. *Nature* 426 (6963): 194-8.
- Dai et al. (2010): New insights into checkpoint kinase 1 in the DNA damage response signaling network. *Clin Cancer Res* 16 (2): 376-83.
- Daniel et al. (2003): Guardians of cell death: the Bcl-2 family proteins. *Essays Biochem* 39: 73-88.
- Daniel et al. (2001): The kiss of death: promises and failures of death receptors and ligands in cancer therapy. *Leukemia* 15 (7): 1022-32.
- dbSNP (2012): Database of Single Nucleotide Polymorphisms (dbSNP). National Center for Biotechnology Information (NCBI), National Library of Medicine (NLM), Bethesda, MD, USA, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>, Zugriff: 06/2012.
- Dean (2002): The Human ATP-Binding Cassette (ABC) Transporter Superfamily. Bethesda (MD), National Center for Biotechnology Information (US), <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK3/>.
- Dexter et al. (1979): N,N-dimethylformamide-induced alteration of cell culture characteristics and loss of tumorigenicity in cultured human colon carcinoma cells. *Cancer Res* 39 (3): 1020-5.
- Diaz-Martinez et al. (2009): Chromosome cohesion and the spindle checkpoint. *Cell Cycle* 8 (17): 2733-40.
- Diehl et al. (1985): Phenotypic and genotypic analysis of Hodgkin's disease derived cell lines: histopathological and clinical implications. *Cancer Surv* 4 (2): 399-419.
- Dietel et al. (1990): Membrane vesicle formation due to acquired mitoxantrone resistance in human gastric carcinoma cell line EPG85-257. *Cancer Res* 50 (18): 6100-6.
- Doll et al. (1981): The causes of cancer: quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today. *J Natl Cancer Inst* 66 (6): 1191-308.
- Dong et al. (2003): Mutations in CHEK2 associated with prostate cancer risk. *Am J Hum Genet* 72 (2): 270-80.
- Drewinko et al. (1976): Establishment of a human carcinoembryonic antigen-producing colon adenocarcinoma cell line. *Cancer Res* 36 (2 Pt 1): 467-75.
- Drexler et al. (2003): False leukemia-lymphoma cell lines: an update on over 500 cell lines. *Leukemia* 17 (2): 416-26.
- Duthu et al. (1992): p53 mutations in Raji cells: characterization and localization relative to other Burkitt's lymphomas. *Oncogene* 7 (11): 2161-7.
- Ensembl (2008): CHEK2. Ensembl-Database, EMBL / European Bioinformatics Institute (EBI), Wellcome Trust Sanger Institute (WTSI); Hinxton, United Kingdom, <http://www.ensembl.org/>, ID: ENSG00000183765, Zugriff: 09/2008.
- Essmann et al. (2005): Irradiation-induced translocation of p53 to mitochondria in the absence of apoptosis. *J Biol Chem* 280 (44): 37169-77.
- Ewen (2000): Relationship between Ras pathways and cell cycle control. *Prog Cell Cycle Res* 4: 1-17.
- Falchetti et al. (2008): BRCA1/BRCA2 rearrangements and CHEK2 common mutations are infrequent in Italian male breast cancer cases. *Breast Cancer Res Treat* 110 (1): 161-7.
- Falck et al. (2001a): Functional impact of concomitant versus alternative defects in the Chk2-p53 tumour suppressor pathway. *Oncogene* 20 (39): 5503-10.
- Falck et al. (2001b): The ATM-Chk2-Cdc25A checkpoint pathway guards against radioresistant DNA synthesis. *Nature* 410 (6830): 842-7.

- Falck et al. (2002): The DNA damage-dependent intra-S phase checkpoint is regulated by parallel pathways. *Nat Genet* 30 (3): 290-4.
- Farrell et al. (1991): p53 is frequently mutated in Burkitt's lymphoma cell lines. *The EMBO journal* 10 (10): 2879-87.
- Fearon et al. (1990): A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 61 (5): 759-67.
- Fisher et al. (1994): A novel cyclin associates with MO15/CDK7 to form the CDK-activating kinase. *Cell* 78 (4): 713-24.
- Fogh (1975): *Human tumor cells in vitro*. Plenum Press, New York.
- Fogh et al. (1977): One hundred and twenty-seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice. *J Natl Cancer Inst* 59 (1): 221-6.
- Gaffney (1982): A cell line (HBL-100) established from human breast milk. *Cell Tissue Res* 227 (3): 563-8.
- Gallagher et al. (1979): Characterization of the continuous, differentiating myeloid cell line (HL-60) from a patient with acute promyelocytic leukemia. *Blood* 54 (3): 713-33.
- Garrett et al. (2011): Anticancer therapy with checkpoint inhibitors: what, where and when? *Trends Pharmacol Sci* 32 (5): 308-16.
- Gatei et al. (2003): Ataxia-telangiectasia-mutated (ATM) and NBS1-dependent phosphorylation of Chk1 on Ser-317 in response to ionizing radiation. *J Biol Chem* 278 (17): 14806-11.
- Gatz et al. (2006): p53 in recombination and repair. *Cell Death Differ* 13 (6): 1003-16.
- Gene (2008): CHEK2. Entrez Gene (Database), National Center for Biotechnology Information (NCBI), National Library of Medicine (NLM), National Institutes of Health (NIH), Bethesda, MD, USA, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=gene>, ID: 11200, Zugriff: 09/2008.
- Gillissen et al. (2003): Induction of cell death by the BH3-only Bcl-2 homolog Nbk/Bik is mediated by an entirely Bax-dependent mitochondrial pathway. *EMBO J* 22 (14): 3580-90.
- Gillissen et al. (2007): Mcl-1 determines the Bax dependency of Nbk/Bik-induced apoptosis. *J Cell Biol* 179 (4): 701-15.
- Gillissen et al. (2010): Endogenous Bak inhibitors Mcl-1 and Bcl-xL: differential impact on TRAIL resistance in Bax-deficient carcinoma. *J Cell Biol* 188 (6): 851-62.
- Gire et al. (2004): DNA damage checkpoint kinase Chk2 triggers replicative senescence. *Embo J* 23 (13): 2554-63.
- Glotzer et al. (1991): Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway. *Nature* 349 (6305): 132-8.
- Gorgoulis et al. (2005): Activation of the DNA damage checkpoint and genomic instability in human precancerous lesions. *Nature* 434 (7035): 907-13.
- Graham et al. (1977): Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* 36 (1): 59-74.
- Graupner et al. (2011): Differential regulation of the proapoptotic multidomain protein Bak by p53 and p73 at the promoter level. *Cell Death Differ* 18 (7): 1130-9.
- Green et al. (2009): Cytoplasmic functions of the tumour suppressor p53. *Nature* 458 (7242): 1127-30.
- Grigorova et al. (2004): Possible causes of chromosome instability: comparison of chromosomal abnormalities in cancer cell lines with mutations in BRCA1, BRCA2, CHK2 and BUB1. *Cytogenet Genome Res* 104 (1-4): 333-40.
- Grompe (1993): The rapid detection of unknown mutations in nucleic acids. *Nat Genet* 5 (2): 111-7.
- Gronwald et al. (2009): Cancer risks in first-degree relatives of CHEK2 mutation carriers: effects of mutation type and cancer site in proband. *Br J Cancer* 100 (9): 1508-12.
- Guo et al. (2000): Response of *Xenopus* Cds1 in cell-free extracts to DNA templates with double-stranded ends. *Mol Biol Cell* 11 (5): 1535-46.
- Hambly et al. (1997): Establishment and characterisation of new cell lines from human breast tumours initially established as tumour xenografts in NMRI nude mice. *Breast Cancer Res Treat* 43 (3): 247-58.
- Hanahan et al. (2000): The hallmarks of cancer. *Cell* 100 (1): 57-70.
- Harbour et al. (2000): The Rb/E2F pathway: expanding roles and emerging paradigms. *Genes Dev* 14 (19): 2393-409.
- Hardwick et al. (2009): SnapShot: BCL-2 proteins. *Cell* 138 (2): 404, e1.

- Hartwell et al. (1989): Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. *Science* 246 (4930): 629-34.
- Haruki et al. (2000): Histological type-selective, tumor-predominant expression of a novel CHK1 isoform and infrequent in vivo somatic CHK2 mutation in small cell lung cancer. *Cancer Res* 60 (17): 4689-92.
- Hayashi et al. (1993): How sensitive is PCR-SSCP? *Hum Mutat* 2 (5): 338-46.
- Hayflick et al. (1961): The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* 25: 585-621.
- Heald et al. (1993): Human wee1 maintains mitotic timing by protecting the nucleus from cytoplasmically activated Cdc2 kinase. *Cell* 74 (3): 463-74.
- Hemmati et al. (2002): Adenovirus-mediated overexpression of p14(ARF) induces p53 and Bax-independent apoptosis. *Oncogene* 21 (20): 3149-61.
- Hemmati et al. (2006): Bak functionally complements for loss of Bax during p14ARF-induced mitochondrial apoptosis in human cancer cells. *Oncogene* 25 (50): 6582-94.
- Hemmati et al. (2010): Systematic genetic dissection of p14ARF-mediated mitochondrial cell death signaling reveals a key role for p21CDKN1 and the BH3-only protein Puma/bbc3. *J Mol Med* 88 (6): 609-22.
- Hemmati et al. (2005): Loss of p21 disrupts p14 ARF-induced G1 cell cycle arrest but augments p14 ARF-induced apoptosis in human carcinoma cells. *Oncogene* 24 (25): 4114-28.
- Hengst et al. (1998): Inhibitors of the Cip/Kip family. *Curr Top Microbiol Immunol* 227: 25-41.
- Higashitani et al. (2000): *Caenorhabditis elegans* Chk2-like gene is essential for meiosis but dispensable for DNA repair. *FEBS Lett* 485 (1): 35-9.
- Hirano et al. (1979): In vitro immune response of human peripheral lymphocytes. IV. Specific induction of human suppressor T cells by an antiserum to the T leukemia cell line HSB. *J Immunol* 123 (3): 1133-40.
- Hirao et al. (2002): Chk2 is a tumor suppressor that regulates apoptosis in both an ataxia telangiectasia mutated (ATM)-dependent and an ATM-independent manner. *Mol Cell Biol* 22 (18): 6521-32.
- Hirao et al. (2000): DNA damage-induced activation of p53 by the checkpoint kinase Chk2. *Science* 287 (5459): 1824-7.
- Ho et al. (2005): The relative contribution of CHK1 and CHK2 to Adriamycin-induced checkpoint. *Exp Cell Res* 304 (1): 1-15.
- Hoeijmakers (2001): Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature* 411 (6835): 366-74.
- Huang et al. (2008): Chk1 and Chk2 are differentially involved in homologous recombination repair and cell cycle arrest in response to DNA double-strand breaks induced by camptothecins. *Mol Cancer Ther* 7 (6): 1440-9.
- Hubbard et al. (2007): Ensembl 2007. *Nucleic acids research* 35: D610-7, <http://www.ensembl.org/>.
- Hurwitz et al. (1979): Characterization of a leukemic cell line of the pre-B phenotype. *Int J Cancer* 23 (2): 174-80.
- Iliakis et al. (2003): DNA damage checkpoint control in cells exposed to ionizing radiation. *Oncogene* 22 (37): 5834-47.
- Ingvarsson et al. (2002): Mutation analysis of the CHK2 gene in breast carcinoma and other cancers. *Breast Cancer Res* 4 (3): R4.
- Iniesta et al. (2010): Absence of CHEK2\*1100delC mutation in families with hereditary breast cancer in North America. *Cancer Genet Cytogenet* 202 (2): 136-40.
- Isaacs et al. (1991): Wild-type p53 suppresses growth of human prostate cancer cells containing mutant p53 alleles. *Cancer Res* 51 (17): 4716-20.
- Jack et al. (2002): Chk2 is dispensable for p53-mediated G1 arrest but is required for a latent p53-mediated apoptotic response. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 (15): 9825-9.
- Jackson (2001): Detecting, signalling and repairing DNA double-strand breaks. *Biochem Soc Trans* 29 (Pt 6): 655-61.
- Jallepalli et al. (2003): The Chk2 tumor suppressor is not required for p53 responses in human cancer cells. *J Biol Chem* 278 (23): 20475-9.
- Janetka et al. (2009): Checkpoint kinase inhibitors: a review of the patent literature. *Expert Opin Ther Pat* 19 (2): 165-97.

- Janetka et al. (2007): Inhibitors of checkpoint kinases: from discovery to the clinic. *Curr Opin Drug Discov Devel* 10 (4): 473-86.
- Janicke et al. (2008): The dark side of a tumor suppressor: anti-apoptotic p53. *Cell Death Differ* 15 (6): 959-76.
- Jeffrey et al. (1995): Mechanism of CDK activation revealed by the structure of a cyclinA-CDK2 complex. *Nature* 376 (6538): 313-20.
- Jemal et al. (2011): Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 61 (2): 69-90.
- Jia et al. (1997): Screening the p53 status of human cell lines using a yeast functional assay. *Mol Carcinog* 19 (4): 243-53.
- Jiang et al. (1989): Rapid detection of ras oncogenes in human tumors: applications to colon, esophageal, and gastric cancer. *Oncogene* 4 (7): 923-8.
- Jin et al. (2008): Differential roles for checkpoint kinases in DNA damage-dependent degradation of the Cdc25A protein phosphatase. *J Biol Chem* 283 (28): 19322-8.
- Kastan et al. (2004): Cell-cycle checkpoints and cancer. *Nature* 432 (7015): 316-23.
- Kawabe (2004): G2 checkpoint abrogators as anticancer drugs. *Mol Cancer Ther* 3 (4): 513-9.
- Keydar et al. (1979): Establishment and characterization of a cell line of human breast carcinoma origin. *Eur J Cancer* 15 (5): 659-70.
- Khanna et al. (2001): DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. *Nature genetics* 27 (3): 247-54.
- Kilpivaara et al. (2006): CHEK2 I157T associates with familial and sporadic colorectal cancer. *J Med Genet* 43 (7): e34.
- Kishi (1985): A new leukemia cell line with Philadelphia chromosome characterized as basophil precursors. *Leuk Res* 9 (3): 381-90.
- Kroemer et al. (2007): Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiol Rev* 87 (1): 99-163.
- Kurz et al. (2004): Doxorubicin activates ATM-dependent phosphorylation of multiple downstream targets in part through the generation of reactive oxygen species. *J Biol Chem* 279 (51): 53272-81.
- Lacroix et al. (2004): Relevance of breast cancer cell lines as models for breast tumours: an update. *Breast Cancer Res Treat* 83 (3): 249-89.
- Lainchbury et al. (2011): Checkpoint kinase inhibitors: a patent review (2009 - 2010). *Expert Opin Ther Pat*.
- Langlois et al. (1979): Morphological and biochemical properties of a new human breast cancer cell line. *Cancer Res* 39 (7 Pt 1): 2604-13.
- Larrea et al. (2010): SnapShot: DNA mismatch repair. *Cell* 141 (4): 730 e1.
- Larson et al. (2007): Identification of novel, selective and potent Chk2 inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett* 17 (1): 172-5.
- Lasfargues et al. (1958): Cultivation of human breast carcinomas. *J Natl Cancer Inst* 21 (6): 1131-47.
- Lavin et al. (2007): ATM activation and DNA damage response. *Cell Cycle* 6 (8): 931-42.
- Lawen (2003): Apoptosis-an introduction. *Bioessays* 25 (9): 888-96.
- Lee et al. (2000): hCds1-mediated phosphorylation of BRCA1 regulates the DNA damage response. *Nature* 404 (6774): 201-4.
- Lee et al. (2001): Destabilization of CHK2 by a missense mutation associated with Li-Fraumeni Syndrome. *Cancer Res* 61 (22): 8062-7.
- Leibovitz et al. (1976): Classification of human colorectal adenocarcinoma cell lines. *Cancer Res* 36 (12): 4562-9.
- Leone et al. (1997): Myc and Ras collaborate in inducing accumulation of active cyclin E/Cdk2 and E2F. *Nature* 387 (6631): 422-6.
- Levine et al. (2009): The first 30 years of p53: growing ever more complex. *Nat Rev Cancer* 9 (10): 749-58.
- Lew et al. (1996): Regulatory roles of cyclin dependent kinase phosphorylation in cell cycle control. *Curr Opin Cell Biol* 8 (6): 795-804.
- Li et al. (2005a): Regulation of CHK2 by DNA-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 280 (12): 12041-50.

- Li et al. (2003): Selective killing of cancer cells by beta -lapachone: direct checkpoint activation as a strategy against cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 (5): 2674-8.
- Li et al. (2002): Structural and functional versatility of the FHA domain in DNA-damage signaling by the tumor suppressor kinase Chk2. *Molecular cell* 9 (5): 1045-54.
- Li et al. (2005b): Sensing, signaling, and responding to DNA damage: organization of the checkpoint pathways in mammalian cells. *J Cell Biochem* 94 (2): 298-306.
- Lindahl (1993): Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature* 362 (6422): 709-15.
- Lindqvist et al. (2009): The decision to enter mitosis: feedback and redundancy in the mitotic entry network. *J Cell Biol* 185 (2): 193-202.
- Liu et al. (2000): Chk1 is an essential kinase that is regulated by Atr and required for the G(2)/M DNA damage checkpoint. *Genes & development* 14 (12): 1448-59.
- Liu et al. (2007): Wiring the cell signaling circuitry by the NF-kappa B and JNK1 crosstalk and its applications in human diseases. *Oncogene* 26 (22): 3267-78.
- Liu et al. (1997): The human Myt1 kinase preferentially phosphorylates Cdc2 on threonine 14 and localizes to the endoplasmic reticulum and Golgi complex. *Mol Cell Biol* 17 (2): 571-83.
- Lloyd (2002): Limits to lifespan. *Nat Cell Biol* 4 (2): E25-7.
- Lozzio et al. (1975): Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome. *Blood* 45 (3): 321-34.
- Lukas et al. (2003): Distinct spatiotemporal dynamics of mammalian checkpoint regulators induced by DNA damage. *Nat Cell Biol* 5 (3): 255-60.
- Lukas et al. (2004): Mammalian cell cycle checkpoints: signalling pathways and their organization in space and time. *DNA Repair (Amst)* 3 (8-9): 997-1007.
- MacLeod et al. (1999): Widespread intraspecies cross-contamination of human tumor cell lines arising at source. *Int J Cancer* 83 (4): 555-63.
- MacQueen et al. (2001): Nuclear reorganization and homologous chromosome pairing during meiotic prophase require *C. elegans* chk-2. *Genes Dev* 15 (13): 1674-87.
- Maglott et al. (2007): Entrez Gene: gene-centered information at NCBI. *Nucleic acids research* 35: D26-31, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=gene>.
- Matsuoka et al. (2007): ATM and ATR substrate analysis reveals extensive protein networks responsive to DNA damage. *Science* 316 (5828): 1160-6.
- Matsuoka et al. (1998): Linkage of ATM to cell cycle regulation by the Chk2 protein kinase. *Science* 282 (5395): 1893-7.
- Matsuoka et al. (2001): Reduced expression and impaired kinase activity of a Chk2 mutant identified in human lung cancer. *Cancer Res* 61 (14): 5362-5.
- May et al. (2006): The spindle checkpoint. *J Cell Sci* 119 (Pt 20): 4139-42.
- Meijers-Heijboer et al. (2002): Low-penetrance susceptibility to breast cancer due to CHEK2(\*)1100delC in noncarriers of BRCA1 or BRCA2 mutations. *Nat Genet* 31 (1): 55-9.
- Melo et al. (1986): Two new cell lines from B-prolymphocytic leukaemia: characterization by morphology, immunological markers, karyotype and Ig gene rearrangement. *Int J Cancer* 38 (4): 531-8.
- Miller et al. (2002): Mutations of the CHK2 gene are found in some osteosarcomas, but are rare in breast, lung, and ovarian tumors. *Genes Chromosomes Cancer* 33 (1): 17-21.
- Minowada et al. (1972): Rosette-forming human lymphoid cell lines. I. Establishment and evidence for origin of thymus-derived lymphocytes. *J Natl Cancer Inst* 49 (3): 891-5.
- Morgan (1997): Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors. *Annu Rev Cell Dev Biol* 13: 261-91.
- Morgan et al. (2006): The relationship of premature mitosis to cytotoxicity in response to checkpoint abrogation and antimetabolite treatment. *Cell Cycle* 5 (17): 1983-8.
- Motoyama et al. (2004): DNA damage tumor suppressor genes and genomic instability. *Curr Opin Genet Dev* 14 (1): 11-6.
- Muir (1987): *Cancer incidence in five continents*. Lyon, International Agency for Research on Cancer.
- Mullis et al. (1986): Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 51 Pt 1: 263-73.

- Murakami et al. (1995): A kinase from fission yeast responsible for blocking mitosis in S phase. *Nature* 374 (6525): 817-9.
- Mutschler et al. (2008): *Mutschler Arzneimittelwirkungen: Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie*. Stuttgart, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft.
- Nahleh et al. (2006): Male breast cancer: a gender issue. *Nat Clin Pract Oncol* 3 (8): 428-37.
- Naundorf et al. (1992): Characterization of two human mammary carcinomas, MT-1 and MT-3, suitable for in vivo testing of ether lipids and their derivatives. *Breast Cancer Res Treat* 23 (1-2): 87-95.
- Negrini et al. (2010): Genomic instability--an evolving hallmark of cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11 (3): 220-8.
- Neubauer et al. (1993): Genetic alterations in the p53 gene in the blast crisis of chronic myelogenous leukemia: analysis by polymerase chain reaction based techniques. *Leukemia* 7 (4): 593-600.
- Neuhausen et al. (2004): Role of CHEK2\*1100delC in unselected series of non-BRCA1/2 male breast cancers. *Int J Cancer* 108 (3): 477-8.
- Nevanlinna et al. (2006): The CHEK2 gene and inherited breast cancer susceptibility. *Oncogene* 25 (43): 5912-9.
- Nigro et al. (1989): Mutations in the p53 gene occur in diverse human tumour types. *Nature* 342 (6250): 705-8.
- Nitiss (2009): Targeting DNA topoisomerase II in cancer chemotherapy. *Nat Rev Cancer* 9 (5): 338-50.
- Norbury et al. (2004): DNA damage-induced apoptosis. *Oncogene* 23 (16): 2797-808.
- O'Connor et al. (1997): Characterization of the p53 tumor suppressor pathway in cell lines of the National Cancer Institute anticancer drug screen and correlations with the growth-inhibitory potency of 123 anticancer agents. *Cancer Res* 57 (19): 4285-300.
- O'Connor et al. (2007): Targeted cancer therapies based on the inhibition of DNA strand break repair. *Oncogene* 26 (56): 7816-24.
- O'Neill et al. (2002): Determination of substrate motifs for human Chk1 and hCds1/Chk2 by the oriented peptide library approach. *The Journal of biological chemistry* 277 (18): 16102-15.
- Oishi et al. (2001): Critical role of *Caenorhabditis elegans* homologs of Cds1 (Chk2)-related kinases in meiotic recombination. *Mol Cell Biol* 21 (4): 1329-35.
- Oishi et al. (1998): A novel *Drosophila* nuclear protein serine/threonine kinase expressed in the germline during its establishment. *Mech Dev* 71 (1-2): 49-63.
- Okada et al. (2004): Pathways of apoptotic and non-apoptotic death in tumour cells. *Nat Rev Cancer* 4 (8): 592-603.
- OMIM (2008a): ATAXIA-TELANGIECTASIA. Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM (TM). Johns Hopkins University, Baltimore, MD, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/>, MIM: 208900, Zugriff: 09/2008.
- OMIM (2008b): BREAST CANCER 1 GENE (BRCA1). Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM (TM). Johns Hopkins University, Baltimore, MD, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/>, MIM: 113705, Zugriff: 09/2008.
- OMIM (2008c): BREAST CANCER 2 GENE (BRCA2). Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM (TM). Johns Hopkins University, Baltimore, MD, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/>, MIM: 600185, Zugriff: 09/2008.
- OMIM (2008d): FAMILIAL BREAST CANCER. Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM (TM). Johns Hopkins University, Baltimore, MD, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/>, MIM: 114480, Zugriff: 09/2008.
- OMIM (2008e): FANCONI ANEMIA. Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM (TM). Johns Hopkins University, Baltimore, MD, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/>, MIM: 227650, Zugriff: 06/2011.
- OMIM (2008f): LI-FRAUMENI SYNDROME 1. Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM (TM). Johns Hopkins University, Baltimore, MD, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/>, MIM: 151623, Zugriff: 09/2008.
- OMIM (2008g): LI-FRAUMENI SYNDROME 2. Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM (TM). Johns Hopkins University, Baltimore, MD, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/>, MIM: 609265, Zugriff: 09/2008.
- OMIM (2008h): LYNCH SYNDROME I. Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM (TM). Johns Hopkins University, Baltimore, MD, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/>, MIM: 120435, Zugriff: 06/2011.
- OMIM (2008i): MULTIPLE ENDOCRINE NEOPLASIA, TYPE I. Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM (TM). Johns Hopkins University, Baltimore, MD, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/>, MIM: 131100, Zugriff: 06/2011.

- OMIM (2008j): NIJMEGEN BREAKAGE SYNDROME. Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM (TM). Johns Hopkins University, Baltimore, MD, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/>, MIM: 251260, Zugriff: 09/2008.
- OMIM (2008k): SECKEL SYNDROME 1. Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM (TM). Johns Hopkins University, Baltimore, MD, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/>, MIM: 210600, Zugriff: 06/2011.
- OMIM (2008l): XERODERMA PIGMENTOSUM A. Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM (TM). Johns Hopkins University, Baltimore, MD, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/>, MIM: 278700, Zugriff: 09/2008.
- Oren (2003): Decision making by p53: life, death and cancer. *Cell Death Differ* 10 (4): 431-42.
- Orita et al. (1989a): Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86 (8): 2766-70.
- Orita et al. (1989b): Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. *Genomics* 5 (4): 874-9.
- Ottini et al. (2010): Male breast cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* 73 (2): 141-55.
- Painter et al. (1980): Radiosensitivity in ataxia-telangiectasia: a new explanation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77 (12): 7315-7.
- Papadopoulos et al. (1994): Mutation of a mutL homolog in hereditary colon cancer. *Science* 263 (5153): 1625-9.
- Pardee (1974): A restriction point for control of normal animal cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 71 (4): 1286-90.
- Paulsen et al. (2007): The ATR pathway: fine-tuning the fork. *DNA Repair (Amst)* 6 (7): 953-66.
- Pavletich (1999): Mechanisms of cyclin-dependent kinase regulation: structures of Cdks, their cyclin activators, and Cip and INK4 inhibitors. *J Mol Biol* 287 (5): 821-8.
- Perdiguero et al. (2004): Regulation of Cdc25C activity during the meiotic G2/M transition. *Cell Cycle* 3 (6): 733-7.
- Peters (1998): SCF and APC: the Yin and Yang of cell cycle regulated proteolysis. *Curr Opin Cell Biol* 10 (6): 759-68.
- Peto (2001): Cancer epidemiology in the last century and the next decade. *Nature* 411 (6835): 390-5.
- Pines (1991): Cyclins: wheels within wheels. *Cell Growth Differ* 2 (6): 305-10.
- Pommier et al. (2005): Targeting chk2 kinase: molecular interaction maps and therapeutic rationale. *Curr Pharm Des* 11 (22): 2855-72.
- Ponten et al. (1967): Two established in vitro cell lines from human mesenchymal tumours. *Int J Cancer* 2 (5): 434-47.
- Pruitt et al. (2009): The consensus coding sequence (CCDS) project: Identifying a common protein-coding gene set for the human and mouse genomes. *Genome Res* 19 (7): 1316-23.
- Puca et al. (2010): Regulation of p53 activity by HIPK2: molecular mechanisms and therapeutical implications in human cancer cells. *Oncogene* 29 (31): 4378-87.
- Pulvertaft (1964): Cytology of Burkitt's Tumour (African Lymphoma). *Lancet* 39: 238-40.
- Reddy et al. (2002): Analysis of CHK2 in vulval neoplasia. *British journal of cancer* 86 (5): 756-60.
- Reinhardt et al. (2009): Kinases that control the cell cycle in response to DNA damage: Chk1, Chk2, and MK2. *Curr Opin Cell Biol* 21 (2): 245-55.
- Renwick et al. (2006): ATM mutations that cause ataxia-telangiectasia are breast cancer susceptibility alleles. *Nat Genet* 38 (8): 873-5.
- Ripperger et al. (2009): Breast cancer susceptibility: current knowledge and implications for genetic counselling. *Eur J Hum Genet* 17 (6): 722-31.
- Rodrigues et al. (1990): p53 mutations in colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87 (19): 7555-9.
- Rohaly et al. (2005): A novel human p53 isoform is an essential element of the ATR-intra-S phase checkpoint. *Cell* 122 (1): 21-32.
- Roos et al. (2006): DNA damage-induced cell death by apoptosis. *Trends Mol Med* 12 (9): 440-50.
- Rosenfeld et al. (1977): Phenotypic characterisation of a unique non-T, non-B acute lymphoblastic leukaemia cell line. *Nature* 267 (5614): 841-3.
- Ryan et al. (2000): Role of NF-kappaB in p53-mediated programmed cell death. *Nature* 404 (6780): 892-7.

- Saiki et al. (1985): Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230 (4732): 1350-4.
- Saltman et al. (1990): Establishment of a karyotypically normal B-chronic lymphocytic leukemia cell line; evidence of leukemic origin by immunoglobulin gene rearrangement. *Leuk Res* 14 (4): 381-7.
- Salvesen et al. (2002): IAP proteins: blocking the road to death's door. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3 (6): 401-10.
- Sancar et al. (2004): Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annu Rev Biochem* 73: 39-85.
- Sanger et al. (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74 (12): 5463-7.
- Sant et al. (2010): Incidence of hematologic malignancies in Europe by morphologic subtype: results of the HAEMACARE project. *Blood* 116 (19): 3724-34.
- Savitsky et al. (1995): A single ataxia telangiectasia gene with a product similar to PI-3 kinase. *Science (New York, N.Y)* 268 (5218): 1749-53.
- Schaffner et al. (2000): Mantle cell lymphoma is characterized by inactivation of the ATM gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97 (6): 2773-8.
- Schaffner et al. (1999): Somatic ATM mutations indicate a pathogenic role of ATM in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 94 (2): 748-53.
- Schmitt et al. (2007): DNA-damage response network at the crossroads of cell-cycle checkpoints, cellular senescence and apoptosis. *J Zhejiang Univ Sci B* 8 (6): 377-97.
- Senderowicz (2004): Targeting cell cycle and apoptosis for the treatment of human malignancies. *Curr Opin Cell Biol* 16 (6): 670-8.
- Seo et al. (2003): Determination of substrate specificity and putative substrates of Chk2 kinase. *Biochem Biophys Res Commun* 304 (2): 339-43.
- Seppala et al. (2003): CHEK2 variants associate with hereditary prostate cancer. *Br J Cancer* 89 (10): 1966-70.
- Shamas-Din et al. (2011): BH3-only proteins: Orchestrators of apoptosis. *Biochim Biophys Acta* 1813 (4): 508-20.
- Sharom (2008): ABC multidrug transporters: structure, function and role in chemoresistance. *Pharmacogenomics* 9 (1): 105-27.
- Shay et al. (2005): Senescence and immortalization: role of telomeres and telomerase. *Carcinogenesis* 26 (5): 867-74.
- Sherr (2006): Divorcing ARF and p53: an unsettled case. *Nat Rev Cancer* 6 (9): 663-73.
- Sherr et al. (1995): Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases. *Genes Dev* 9 (10): 1149-63.
- Shieh et al. (2000): The human homologs of checkpoint kinases Chk1 and Cds1 (Chk2) phosphorylate p53 at multiple DNA damage-inducible sites. *Genes & development* 14 (3): 289-300.
- Shuen et al. (2011): Inherited mutations in breast cancer genes--risk and response. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 16 (1): 3-15.
- Sodha et al. (2002): Increasing evidence that germline mutations in CHEK2 do not cause Li-Fraumeni syndrome. *Hum Mutat* 20 (6): 460-2.
- Sodha et al. (2000): Screening hCHK2 for mutations. *Science* 289 (5478): 359.
- Sorensen et al. (2003): Chk1 regulates the S phase checkpoint by coupling the physiological turnover and ionizing radiation-induced accelerated proteolysis of Cdc25A. *Cancer Cell* 3 (3): 247-58.
- Soule et al. (1973): A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 51 (5): 1409-16.
- Staalesen et al. (2004): Alternative splicing and mutation status of CHEK2 in stage III breast cancer. *Oncogene* 23 (52): 8535-44.
- Stark et al. (2006): Control of the G2/M transition. *Mol Biotechnol* 32 (3): 227-48.
- Stein et al. (1997): Development and characterisation of novel human multidrug resistant mammary carcinoma lines in vitro and in vivo. *Int J Cancer* 72 (5): 885-91.
- Stein et al. (2008): Complete in vivo reversal of the multidrug resistance phenotype by jet-injection of anti-MDR1 short hairpin RNA-encoding plasmid DNA. *Mol Ther* 16 (1): 178-86.
- Stevens et al. (2003): Chk2 activates E2F-1 in response to DNA damage. *Nature cell biology* 5 (5): 401-9.

- Stilgenbauer et al. (1999): Molecular characterization of 11q deletions points to a pathogenic role of the ATM gene in mantle cell lymphoma. *Blood* 94 (9): 3262-4.
- Stolz et al. (2011): Tumor suppressor CHK2: regulator of DNA damage response and mediator of chromosomal stability. *Clin Cancer Res* 17 (3): 401-5.
- Stone et al. (1978): Isolation of a human prostate carcinoma cell line (DU 145). *Int J Cancer* 21 (3): 274-81.
- Sturm et al. (2003): Mutation of p53 and consecutive selective drug resistance in B-CLL occurs as a consequence of prior DNA-damaging chemotherapy. *Cell Death Differ* 10 (4): 477-84.
- Sturm et al. (2006a): Silencing of APAF-1 in B-CLL results in poor prognosis in the case of concomitant p53 mutation. *Int J Cancer* 118 (9): 2329-36.
- Sturm et al. (2006b): Loss of the tissue-specific proapoptotic BH3-only protein Nbk/Bik is a unifying feature of renal cell carcinoma. *Cell Death Differ* 13 (4): 619-27.
- Sugimoto et al. (1992): Frequent mutations in the p53 gene in human myeloid leukemia cell lines. *Blood* 79 (9): 2378-83.
- Sullivan et al. (2002): Concomitant inactivation of p53 and Chk2 in breast cancer. *Oncogene* 21 (9): 1316-24.
- Sundstrom et al. (1976): Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line (U-937). *Int J Cancer* 17 (5): 565-77.
- Swift et al. (1987): Breast and other cancers in families with ataxia-telangiectasia. *N Engl J Med* 316 (21): 1289-94.
- Syrjakoski et al. (2004): CHEK2 1100delC is not a risk factor for male breast cancer population. *Int J Cancer* 108 (3): 475-6.
- Szymanska-Pasternak et al. (2006): CHEK2 variants predispose to benign, borderline and low-grade invasive ovarian tumors. *Gynecol Oncol* 102 (3): 429-31.
- Takai et al. (2002): Chk2-deficient mice exhibit radioresistance and defective p53-mediated transcription. *The EMBO journal* 21 (19): 5195-205.
- Takai et al. (2000): Aberrant cell cycle checkpoint function and early embryonic death in Chk1(-/-) mice. *Genes & development* 14 (12): 1439-47.
- Takemura et al. (2006): Defective Mre11-dependent activation of Chk2 by ataxia telangiectasia mutated in colorectal carcinoma cells in response to replication-dependent DNA double strand breaks. *J Biol Chem* 281 (41): 30814-23.
- Tan et al. (2007): Chk2 mediates stabilization of the FoxM1 transcription factor to stimulate expression of DNA repair genes. *Mol Cell Biol* 27 (3): 1007-16.
- Tao et al. (2008): Enhancement of radiation response in p53-deficient cancer cells by the Aurora-B kinase inhibitor AZD1152. *Oncogene* 27 (23): 3244-55.
- Taylor et al. (2001): Regulation of the G2/M transition by p53. *Oncogene* 20 (15): 1803-15.
- Thompson et al. (2005): Cancer risks and mortality in heterozygous ATM mutation carriers. *J Natl Cancer Inst* 97 (11): 813-22.
- Tom et al. (1976): Human colonic adenocarcinoma cells. I. Establishment and description of a new line. *In Vitro* 12 (3): 180-91.
- Tominaga et al. (1999): Role of human Cds1 (Chk2) kinase in DNA damage checkpoint and its regulation by p53. *J Biol Chem* 274 (44): 31463-7.
- Tort et al. (2002): CHK2-decreased protein expression and infrequent genetic alterations mainly occur in aggressive types of non-Hodgkin lymphomas. *Blood* 100 (13): 4602-8.
- Tsvetkov (2004): Polo-like kinases and Chk2 at the interface of DNA damage checkpoint pathways and mitotic regulation. *IUBMB Life* 56 (8): 449-56.
- Tucker et al. (1987): Characterization of a new human diploid myeloid leukemia cell line (PLB-985) with granulocytic and monocytic differentiating capacity. *Blood* 70 (2): 372-8.
- Umar et al. (1994): Defective mismatch repair in extracts of colorectal and endometrial cancer cell lines exhibiting microsatellite instability. *J Biol Chem* 269 (20): 14367-70.
- UniProt-Consortium (2007): The Universal Protein Resource (UniProt). *Nucleic acids research* 35: D193-7, <http://www.uniprot.org>.
- UniProt (2008): CHK2\_HUMAN. The Universal Protein Resource (UniProt); Swiss Institute of Bioinformatics (SIB), Geneva, Switzerland; European Bioinformatics Institute (EBI), Cambridge, United

- Kingdom; Protein Information Resource (PIR), Washington, USA; <http://www.uniprot.org>, ID: O96017, Zugriff: 09/2008.
- Vahteristo et al. (2002): A CHEK2 genetic variant contributing to a substantial fraction of familial breast cancer. *Am J Hum Genet* 71 (2): 432-8.
- Vahteristo et al. (2001): p53, CHK2, and CHK1 genes in Finnish families with Li-Fraumeni syndrome: further evidence of CHK2 in inherited cancer predisposition. *Cancer Res* 61 (15): 5718-22.
- Vermeulen et al. (2003a): Cell cycle and apoptosis. *Cell Prolif* 36 (3): 165-75.
- Vermeulen et al. (2003b): The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Prolif* 36 (3): 131-49.
- Vodermaier (2004): APC/C and SCF: controlling each other and the cell cycle. *Curr Biol* 14 (18): R787-96.
- Vogelstein et al. (2004): Cancer genes and the pathways they control. *Nat Med* 10 (8): 789-99.
- Vorechovsky et al. (1997): Clustering of missense mutations in the ataxia-telangiectasia gene in a sporadic T-cell leukaemia. *Nat Genet* 17 (1): 96-9.
- Vousden et al. (2009): Blinded by the Light: The Growing Complexity of p53. *Cell* 137 (3): 413-31.
- Waldman et al. (1995): p21 is necessary for the p53-mediated G1 arrest in human cancer cells. *Cancer Res* 55 (22): 5187-90.
- Wang et al. (2006): Ataxia telangiectasia mutated and checkpoint kinase 2 regulate BRCA1 to promote the fidelity of DNA end-joining. *Cancer Res* 66 (3): 1391-400.
- Wang et al. (2004): ATM-dependent CHK2 activation induced by anticancer agent, irifolven. *J Biol Chem* 279 (38): 39584-92.
- Wasielowski et al. (2009): CHEK2 1100delC and male breast cancer in the Netherlands. *Breast Cancer Res Treat* 116 (2): 397-400.
- Weischer et al. (2008): CHEK2\*1100delC genotyping for clinical assessment of breast cancer risk: meta-analyses of 26,000 patient cases and 27,000 controls. *J Clin Oncol* 26 (4): 542-8.
- Weiss et al. (2005): Epidemiology of male breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 14 (1): 20-6.
- Widmaier et al. (1974): [A new infinite cell line, MaTu, of human mammary tumor-cells (author's transl)]. *Arch Geschwulstforsch* 44 (1): 1-10.
- Wilson (2004): Radiation and the cell cycle, revisited. *Cancer Metastasis Rev* 23 (3-4): 209-25.
- Woo et al. (2003): Cyclin-dependent kinases and S phase control in mammalian cells. *Cell Cycle* 2 (4): 316-24.
- Wu et al. (2001): Characterization of tumor-associated Chk2 mutations. *J Biol Chem* 276 (4): 2971-4.
- Xiao et al. (2003): Chk1 mediates S and G2 arrests through Cdc25A degradation in response to DNA-damaging agents. *J Biol Chem* 278 (24): 21767-73.
- Xiao et al. (2006): Differential roles of checkpoint kinase 1, checkpoint kinase 2, and mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2 in mediating DNA damage-induced cell cycle arrest: implications for cancer therapy. *Mol Cancer Ther* 5 (8): 1935-43.
- Xie et al. (2002): Genotoxic stress-induced activation of Plk3 is partly mediated by Chk2. *Cell cycle (Georgetown, Tex)* 1 (6): 424-9.
- Yang et al. (2002): PML-dependent apoptosis after DNA damage is regulated by the checkpoint kinase hCds1/Chk2. *Nature cell biology* 4 (11): 865-70.
- Yoshida et al. (2010): The cell death machinery governed by the p53 tumor suppressor in response to DNA damage. *Cancer Sci* 101 (4): 831-5.
- Yoshikawa et al. (1999): Mutational analysis of p73 and p53 in human cancer cell lines. *Oncogene* 18 (22): 3415-21.
- Youle et al. (2008): The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9 (1): 47-59.
- Yu et al. (2002): UCN-01 inhibits p53 up-regulation and abrogates gamma-radiation-induced G(2)-M checkpoint independently of p53 by targeting both of the checkpoint kinases, Chk2 and Chk1. *Cancer Res* 62 (20): 5743-8.
- Yu et al. (2001): Antisense inhibition of Chk2/hCds1 expression attenuates DNA damage-induced S and G2 checkpoints and enhances apoptotic activity in HEK-293 cells. *FEBS Lett* 505 (1): 7-12.

- Zachos et al. (2007): Exercising restraints: role of Chk1 in regulating the onset and progression of unperturbed mitosis in vertebrate cells. *Cell Cycle* 6 (7): 810-3.
- Zhang et al. (2011): Genetic variants associated with breast-cancer risk: comprehensive research synopsis, meta-analysis, and epidemiological evidence. *Lancet Oncol* 12 (5): 477-88.
- Zhang et al. (2004): Chk2 phosphorylation of BRCA1 regulates DNA double-strand break repair. *Mol Cell Biol* 24 (2): 708-18.
- Zhao et al. (2002): Disruption of the checkpoint kinase 1/cell division cycle 25A pathway abrogates ionizing radiation-induced S and G2 checkpoints. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 (23): 14795-800.
- Zhou et al. (2000): The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. *Nature* 408 (6811): 433-9.
- Zhuang et al. (2006): Checkpoint kinase 2-mediated phosphorylation of BRCA1 regulates the fidelity of nonhomologous end-joining. *Cancer Res* 66 (3): 1401-8.
- Zlowocka et al. (2008): Germline mutations in the CHEK2 kinase gene are associated with an increased risk of bladder cancer. *Int J Cancer* 122 (3): 583-6.

## 10 Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

## 11 Selbstständigkeitserklärung

Ich erkläre, dass die vorgelegte Dissertation von mir selbst und ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst wurde, auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten darstellt und die benutzten Hilfsmittel und Quellen vollständig angegeben sind.

---

Datum

---

Unterschrift