

**Untersuchung der Rolle von Chk1 in der
entzündungsbasierten kolorektalen Karzinogenese anhand
eines zellulären Colitis-Modells**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

genehmigt durch die Fakultät für Naturwissenschaften
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

von Dipl. Biol. Kathrin Reißig, geb. Haase

geb. am 10.08.1977 in Brandenburg

Gutachter: Prof. Dr. med. Albert Roessner

Prof. Dr. rer. nat. Susanne Sebens

eingereicht am: 29.09.2015

verteidigt am: 25.02.2016

Meinem Opa

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	I
Tabellenverzeichnis	III
Abkürzungsverzeichnis	V
1 EINLEITUNG	1
1.1 Colitis Ulcerosa und kolorektale Karzinogenese	1
1.1.1 Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen	1
1.1.2 Kolorektale Karzinome	2
1.1.3 Entzündungsassoziierte Karzinogenese	3
1.2 Oxidativer Stress und Karzinogenese	6
1.3 DNA-Schadenskontrolle und Zellzyklusregulation	8
1.3.1 Chk1 im Zellzyklus und in der DNA-Schadensantwort	9
1.3.2 JNK MAPK im Zellzyklus und in der DNA-Schadens-Antwort	12
1.4 Epigenetik und Karzinogenese	13
1.4.1 Kovalente Histonmodifikationen	13
1.4.2 ATP-abhängiger Chromatinumbau	16
1.4.3 DNA-Methylierung	17
1.5 Zelluläres Modell der Colitis Ulcerosa	17
1.6 Zielsetzung	19
2 MATERIAL UND METHODEN	20
2.1 Material	20
2.1.1 Geräte/Labormaterialien	20
2.1.2 Puffer/ Lösungen	24
2.1.3 Gele	26
2.1.4 AK, Marker, Standards, Kits, siRNA	27
2.1.5 Software	30
2.2 Methoden	31

2.2.1	Zellbiologische Methoden/Zellkultur -----	31
2.2.2	Proteinbiochemische Methoden-----	32
2.2.3	Datenauswertung / Statistik -----	34
3	ERGEBNISSE -----	35
3.1	Rolle von Chk1 im Modell der akuten Entzündung -----	35
3.1.1	Akuter Stressreiz durch H ₂ O ₂ führt zur Herunterregulation und Aktivierung von Chk1 in HCEC -----	35
3.1.2	Chk1 supprimiert die pJNK-abhängige DNA-Schadensantwort in HCEC nach akutem Stressreiz	36
3.1.3	Chk1 hat eine untergeordnete Funktion im Zellzyklus in HCEC nach Stressreiz-----	38
3.1.4	pJNK supprimiert pChk1 in HCEC -----	39
3.2	Rolle von Chk1 im Modell der chronischen Entzündung -----	41
3.2.1	Unveränderte Zellzykluskontrolle in Z1-Z10-----	41
3.2.2	Akkumulation von pChk1 ^{S317} und Herunterregulation von Chk1 in Z1-Z10-----	43
3.2.3	pJNK supprimiert pChk1 in Z-Zellkulturen -----	43
3.2.4	Chk1 supprimiert den pJNK-Signalweg in Z-Zellkulturen-----	44
3.3	Rolle von Chk1 bei erneuter Entzündungssimulation im Modell der chronischen Colitis Ulcerosa-----	46
3.3.1	Akuter Stressreiz induziert die Aktivierung von c-Jun und H2A.X in Z10-Zellen-----	46
3.3.2	Chk1 supprimiert die DNA-Schadensmarkierung in Z10-Zellen nach erneutem Stressreiz	47
3.3.3	Chk1 spielt in Z10-Zellen im Zellzyklus nach erneutem Stressreiz eine marginale Rolle im G2/M-Arrest-----	49
3.4	Rolle von Chk1 am Chromatin im Modell der Colitis Ulcerosa -----	50
3.4.1	Chk1 akkumuliert in Z10-Zellen am Chromatin-----	51
3.4.2	Erhöhte pChk1 ^{S317} -Level in den Fraktionen akut und chronisch gestresster Zellen	52
3.4.3	Veränderte Histonmodifikationen in Z10-Zellen -----	53
3.4.4	Effekte des Chk1- <i>knockdown</i> in den Fraktionen -----	57
3.4.5	Abhängigkeit der Histonmodifikationen von Chk1 -----	61
4	DISKUSSION -----	67
4.1	Rolle von Chk1 im Modell der akuten Entzündung -----	68
4.2	Rolle von Chk1 im Modell der chronischen Entzündung -----	71

4.3	Rolle von Chk1 bei erneuter Entzündungssimulation im Modell der chronischen Entzündung -----	74
4.4	Rolle von Chk1 am Chromatin -----	75
4.5	Ausblick und Fazit -----	78
	5 ZUSAMMENFASSUNG-----	80
	6 ABSTRACT-----	81
	7 LITERATURVERZEICHNIS-----	82
	8 ANHANG -----	91
8.1	Datentabellen/Messwerte -----	91
8.1.1	Originaldaten der Western Blot-Analysen -----	91
8.1.2	Originaldaten der Zellzyklusanalysen. -----	102
	DANKSAGUNG -----	107
	PUBLIKATIONEN -----	108
	ERKLÄRUNG -----	109

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Molekulare Pathogenese kolorektaler Tumoren.	2
Abb. 2: Mechanismen entzündungsbasierender Tumorentwicklung.	4
Abb. 3: Modell entzündungsbedingter Veränderungen genetischer und epigenetischer Art.	5
Abb. 4: Chemische und biologische Mechanismen der Entzündung.	7
Abb. 5: Schematische Darstellung des Chk1-Proteins.	10
Abb. 6: Rolle von Chk1 im Zellzyklus und in der DNA-Schadens-Antwort.	11
Abb. 7: Modell des Epigenoms humaner Zellen und Modifikationsstellen der Corehistone.	14
Abb. 8: Studiendesign zum in vitro Modell der Colitis Ulcerosa.	18
Abb. 9: Akuter Stressreiz durch H ₂ O ₂ führt zur Herunterregulation und Aktivierung von Chk1 in HCEC.	35
Abb. 10: Chk1 supprimiert die pJNK-abhängige DNA-Schadensantwort in HCEC.	37
Abb. 11: Chk1- <i>knockdown</i> ohne H ₂ O ₂ -Behandlung hat keinen Einfluss auf den JNK-Signalweg in HCEC.	38
Abb. 12: Unveränderte Rolle von Chk1 im Zellzyklus von HCEC nach H ₂ O ₂ -Behandlung.	39
Abb. 13: pJNK supprimiert die Aktivierung von Chk1 nach H ₂ O ₂ -Behandlung in HCEC.	40
Abb. 14: Unveränderte Zellzykluskontrolle trotz akkumuliertem DNA-Schaden und hohen pChk1 ^{S317} -Level in den Z-Zellkulturen Z1-Z10.	42
Abb. 15: Akkumulation von pChk1 ^{S317} und Reduktion von Chk1 in den Z-Zellkulturen Z1-Z10.	43
Abb. 16: pJNK induziert die Aktivierung von Chk1 in den Z-Zellkulturen.	44
Abb. 17: Chk1/pChk1 supprimiert z. T. den pJNK-Signalweg in Z-Zellkulturen.	45
Abb. 18: Akuter Stressreiz führt in Z-Zellkulturen zur Aktivierung von c-Jun und H2A.X.	46
Abb. 20: Rolle von Chk1 im Zellzyklus von Z10 nach erneutem Stressreiz.	49
Abb. 21: Nachweis der erfolgreichen Fraktionierung.	50
Abb. 22: Chk1-Gehalt in verschiedenen Fraktionen von HCEC und Z10-Zellen.	51
Abb. 23: pChk1 ^{S317} -Gehalt in verschiedenen Fraktionen von HCEC und Z10-Zellen.	53

Abb. 24: pH3 ^{T11} -Gehalt am Chromatin von HCEC und Z10-Zellen. -----	54
Abb. 25: GCN ₅ -Gehalt am Chromatin von HCEC und Z10-Zellen. -----	54
Abb. 26: Histonmodifikationen am Chromatin von HCEC und Z10-Zellen. -----	55
Abb. 27: Akkumulation von Histonacetylasen am Chromatin von HCEC und Z10-Zellen. -----	57
Abb. 28: Chk1-Gehalt am Chromatin von HCEC und Z10-Zellen nach Chk1- <i>knockdown</i> . -----	60
Abb. 29: pChk1 ^{S317} -Gehalt am Chromatin von HCEC und Z10-Zellen nach Chk1- <i>knockdown</i> . -----	61
Abb. 30: pH3 ^{T11} -Gehalt am Chromatin von HCEC und Z10-Zellen nach Chk1- <i>knockdown</i> . -----	62
Abb. 31: GCN ₅ -Gehalt am Chromatin von HCEC und Z10-Zellen nach Chk1- <i>knockdown</i> . -----	63
Abb. 32: acH3 ^{K9} -Gehalt am Chromatin von HCEC und Z10-Zellen nach Chk1- <i>knockdown</i> . -----	64
Abb. 34: acH4-Gehalt am Chromatin von HCEC und Z10-Zellen nach Chk1- <i>knockdown</i> . -----	66
Abb. 35: PCAF-Gehalt am Chromatin von HCEC und Z10-Zellen nach Chk1- <i>knockdown</i> . -----	67
Abb. A 1: Proteinexpression in den Z-Zellkulturen Z1-Z10. -----	93

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Herstellernachweis verwendeter Geräte	20
Tab. 2: Herstellernachweis verwendeter Stoffe	22
Tab. 3: Pufferrezepturen	24
Tab. 4: Gelrezepturen	26
Tab. 5: Herstellernachweis verwendeter Antikörper	27
Tab. 6: Herstellernachweis verwendeter Reagenzien	28
Tab. 7: Herstellernachweis verwendeter Marker	29
Tab. 8: Herstellernachweis verwendeter Kits	29
Tab. 9: Liste der Zellkulturmedien	29
Tab. 10: Bezugsquellen eingesetzter Zelllinien	29
Tab. 11-A2: zu Abb. 9	92
Tab. 12-A3: zu Abb. 10	92
Tab. 13-A4: zu Abb. 11	93
Tab. 14-A5: zu Abb. 13	93
Tab. 15-A6: zu Abb. 15	93
Tab. 16-A7: zu Abb. 17	94
Tab. 17-A8: zu Abb. 18	95
Tab. 18-A9: zu Abb. 19	95
Tab. 19-A10: zu Abb. 22	96
Tab. 20-A11: zu Abb. 23	96
Tab. 21-A12: zu Abb. 24/25	97
Tab. 22-A13: zu Abb. 26	97
Tab. 23-A14: zu Abb. 27	97
Tab. 24-A15: zu Abb. 28	98
Tab. 25-A16: zu Abb. 29	99

Tab. 26-A17: zu Abb. 30-----	100
Tab. 27-A18: zu Abb. 31-----	100
Tab. 28-A19: zu Abb. 32-----	101
Tab. 29-A20: zu Abb. 33-----	101
Tab. 30-A21: zu Abb. 34-----	102
Tab. 31-A22: zu Abb. 35-----	102
Tab. 32-A23: zu Abb. 12-----	103
Tab. 33-A24: zu Abb. 14-----	104
Tab. 34-A25: zu Abb. 20-----	105

Abkürzungsverzeichnis

AK	Antikörper
AOM	Azoxymethan
ATM	<i>Ataxia telangiectasia mutated protein</i>
ATR	<i>Ataxia telangiectasia and Rad3-related protein</i>
APC	<i>Adenomatous Polyposis Coli</i>
APS	<u>A</u> mmonium <u>p</u> eroxodisulfat
Aqua dest.	destilliertes Wasser
BSA	<u>R</u> inder <u>s</u> erum <u>a</u> lbumin (engl.: <i>bovineSA</i>)
CHES	<i>N-Cyclohexyl-2-aminoethanesulfonic acid</i>
Chk1	<i>Checkpoint kinase 1</i>
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dH ₂ O	deionisiertes Wasser (Milli-Q-Anlage)
DCC	<i>Deleted in Colorectal Carcinoma</i>
DMEM	<i>Dulbecco`s modified eagle`s media</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<u>D</u> esoxyribo <u>n</u> ukleins <u>ä</u> ure (engl.: <i>DNacid</i>)
DNase	Desoxyribonuklease
DPBS	<i>Dulbecco`s phosphate buffered saline</i>
DSB	Doppelstrangbruch, <i>double strand break</i>
DTT	<u>D</u> ithio <u>t</u> hreitol
EDTA	<u>E</u> thylend <u>a</u> min <u>t</u> etraessigsäure (engl.: <i>EDTacid</i>)
EMT	Epithelial-mesenchymale Transdifferenzierung
ERK	extrazelluläre Signal-regulierte Kinase
FACS	<i>fluorescence activated cell sorter</i>

FCS	fötales Kälberserum (engl.: <i>fetal calf serum</i>)
FFPE	Formalin-fixiert Paraffin-eingebettet
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
HAT	Histon Acetyl-transferase
HCl	Salzsäure
HDAC	Histon-Deacetylase
hMLH1	MutL homolog 1, hypermethyliert
HMT	<i>histone methyl-transferase</i>
HSP90	<i>heat shock protein 90</i>
IFN- γ	Interferon- γ
IL	Interleukin
JNK	c-Jun-N-terminale Kinase
K	Kontrolle
kDa	<u>Kilodalton</u>
KDM	Histon-Demethylase
MAPK	Mitogen-aktivierte Protein Kinase
MCPH1	Microcephalin
MEK	MAPK/ERK-Kinase
MGMT	O(6)-methylguanin DNA-Methyltransferase
MK2	<i>MAPK-activated protein kinase 2</i>
MMP	Matrixmetalloproteinasen
mRNA	Boten-RNA, (engl.: <i>messenger</i>)
NF- κ B	<i>nuclear factor-kappaB</i>
NO	Stickstoffmonoxid (engl.: <i>nitrogene</i>)
iNOS	Stickstoffoxide-Synthase in Makrophagen/Mikrogliazellen (i) (engl.: <i>nitrogene</i>)

NOX	NAD(P)H-Oxidase
N-Terminus	aminoterminales Ende
p	Signifikanzwert
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion (engl.: <i>chain</i>)
pChk1 ^{S317/345}	phosphorylierte Chk1
pJNK	phosphorylierte JNK
Plk	<i>Polo-like-kinase</i>
PMA	<i>phorbol 12-myristate 13 acetate</i>
PMSF	<i>phenylmethanesulfonylfluoride</i>
<i>PTEN</i>	engl: <i>Phosphatase and Tensin homolog</i>
rpm	Umdrehung pro Minute (<i>revolutions per minute</i>)
RNI	<i>Reactive Nitrogene Intermediate</i>
RNS	Reaktive Stickstoff-Spezies (engl.: <i>nitrogene</i>)
ROS	Reaktive Sauerstoff-Spezies (engl.: <i>oxygene</i>)
ROI	<i>Reactive Oxygene Intermediate</i>
RPA	<i>replication protein A</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute-Medium</i>
RT	Raumtemperatur
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat (engl.: <i>sodiumDS</i>)
SIRT	<i>sirtuine</i>
SSB	<i>single strand break</i> , Einzelstrangbruch der DNA
TAE	TRIS-Acetat-EDTA
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
TBS-T	<i>Tris-buffered saline</i> mit Tween20

TEMED	Tetra-methylethylenediamin
TNF- α	Tumor Nekrose Faktor α
TRIS	Tris (hydroxymethyl)-aminomethan
TSA	Trichostatin A
ü. N.	über Nacht
Vol	Volumen

1 EINLEITUNG

1.1 Colitis Ulcerosa und kolorektale Karzinogenese

1.1.1 Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen

Unter chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen (CED) werden rezidivierend oder kontinuierlich akute entzündliche Erkrankungen des Darms, seltener anderer Abschnitte des Verdauungstraktes, zusammengefasst. Abhängig von der Lokalisation und den mikroskopischen Veränderungen wird zwischen verschiedenen Krankheitsbildern unterschieden. Die häufigsten Vertreter der CED sind die Colitis Ulcerosa (CU) und der Morbus Crohn (MC). Im Gegensatz zum MC, der den gesamten Verdauungstrakt und verschiedene Schichten der Darmwand betreffen kann, beschränkt sich die CU vorwiegend auf die Schleimhaut des Dickdarms (Colon). Die pathologischen Charakteristika der CU sind die kontinuierliche, von aboral beginnende akute Entzündung der Mukosa und z. T. der Submukosa, sowie teils auch Schleimhautulzerationen (Herbst et al., 2006; Ullman und Itzkowitz, 2011; Francescone et al., 2015).

Die Prävalenz der CED ist in westlichen Industrienationen wie Europa und Nordamerika am höchsten und liegt bei 37-246 (CU) bzw. 29-199 (MC) Fällen, gefolgt von Japan, Korea, Hong Kong, Südafrika und Israel. In weniger entwickelten Ländern besteht nur eine geringe Prävalenz (D'Amato und Rioux, 2013). Die Inzidenz des MC (5,6) nimmt seit den 1960er Jahren stetig zu, während die der CU (20,3) weitgehend konstant bleibt (Baumgart und Carding, 2007; Ullman und Itzkowitz, 2011). Die Erkrankungen beginnen oftmals im Alter von 15 bis 35 Jahren, wobei kein geschlechtsspezifischer Unterschied angegeben wird (Danese und Fiocchi, 2011). Beide Erkrankungen gelten als idiopathisch. Die erhöhte Inzidenz der CED wird in urbanen Gebieten der Industrienationen zusätzlich durch psychosozialen Stress getriggert. Das Rauchen als weiterer gesundheitlicher Risikofaktor erhöht zwar das Risiko für MC, mindert aber das der CU (D'Amato und Rioux, 2013). Die Ursache der Entzündung wird derzeit in einer aberranten und exzessiven Immunantwort auf Umweltfaktoren (Ernährung, Hygienestandard, bakterielle Infektionen des Darms, Medikationen, o. Ä.) bei genetischer Disposition (familiäre Cluster) vermutet (Baumgart und Carding, 2007). Die gegen die Darmflora gerichtete Immunantwort schädigt langfristig das Darmepithel. Nach längerer Dauer (8-15 Jahre) und in Abhängigkeit der Ausdehnung (extensiv, Pancolitis) der CU besteht ein um bis zu 33 % erhöhtes Risiko an einem kolorektalen Karzinom zu erkranken (Mitamura et al., 2002; Francescone et al., 2015), da die Entzündung der Darmwand langfristig, bedingt durch epitheliale Schäden, zur Durchlässigkeit für Toxine und Karzinogene führt.

1.1.2 Kolorektale Karzinome

Kolorektale Karzinome stellen die dritthäufigsten Malignome weltweit dar und weisen eine hohe Letalität auf (Grivennikov, 2013). Umweltfaktoren scheinen eine Rolle in der Ätiologie zu spielen, da nur 5% der kolorektalen Karzinome einer familiär-genetischen Historie zugeordnet werden können (Baumgart and Carding, 2007). Nach einem Modell von Fearon und Vogelstein, der Adenom-Karzinom-Sequenz, entwickelt sich das sporadische kolorektale Karzinom aus benignen Vorläuferläsionen, den Adenomen (Fearon und Vogelstein, 1990). Für die Pathogenese gilt dabei die in (Abb. 1) dargestellte, typische Abfolge genetischer und epigenetischer Ereignisse (Ullman und Itzkowitz, 2011). Dabei muss angemerkt werden, dass bereits Adenome erste genetische Veränderungen aufweisen, die histomorphologisch zum Merkmal der intraepithelialen Neoplasie (Dysplasie) führen. Weitere zugrundeliegende molekulare Ereignisse sind Mikrosatelliten-Instabilität (MSI), Chromosomale Instabilität (CIN), Veränderungen in Tumorsuppressorgenen - wie *APC* (*Adenomatous Polyposis Coli*), *p53*, und *DCC* (*Deleted in Colorectal Carcinoma*) - oder Onkogenen, wie *k-ras*.

Auch im CU-assoziierten kolorektalen Karzinom spielen diese molekularen Ereignisse eine grundlegende Rolle, allerdings in veränderter zeitlicher Abfolge und Frequenz, wie in (Abb. 1) dargestellt (Ullman und Itzkowitz, 2011).

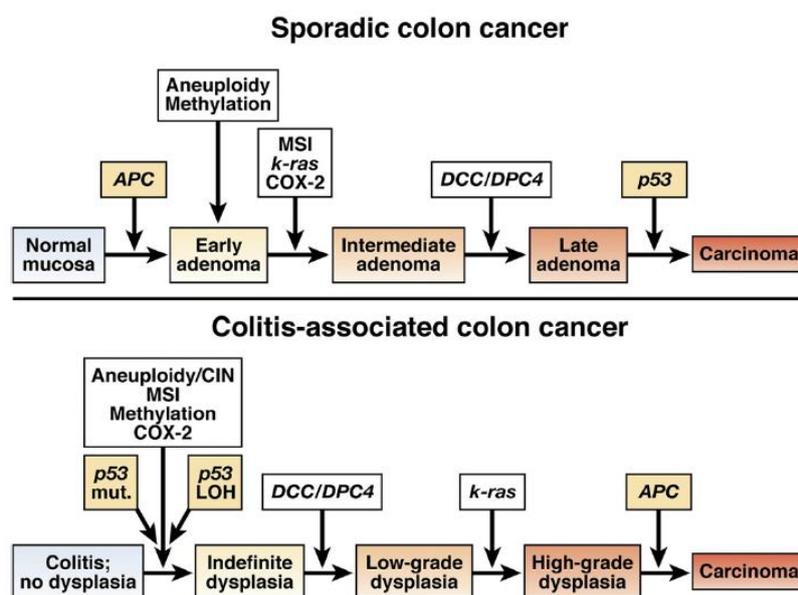


Abb. 1: Molekulare Pathogenese kolorektaler Tumoren. Molekulare Pathogenese des sporadischen kolorektalen Karzinoms (oben) und des CU-assoziierten kolorektalen Karzinoms (unten) aus Ullmann 2011 (Ullman und Itzkowitz, 2011). Zugrundeliegende molekulare Ereignisse wie MSI, CIN, Veränderungen in Tumorsuppressorgenen - wie *APC*, *p53*, und *DCC* - oder Onkogenen, wie *k-ras* spielen in der sporadischen als auch in der CU-assoziierten Karzinogenese eine Rolle, jedoch in veränderter zeitliche Abfolge.

Das Tumorsuppressorprotein p53 hat eine zentrale Rolle in der DNA-Schadenskontrolle inne und gilt als „Wächter des Genoms“. Es gewährleistet über seine Zielproteine p21^{WAF1} und GADD45 die Reparatur der DNA und den Fortgang des Zellzyklus. Somit wird ein Wachstumsvorteil in Zellen mit mutiertem p53 aufgrund fehlender Zellzyklussteuerung vermutet der die neoplastische Transformation voran treibt (Hussain et al., 2000). Studien an Colektomie-Präparaten von CU-Patienten belegen, dass p53 in mehr als 50% der Fälle mutiert vorliegt. Es ist zu vermuten, dass diese Beobachtung Folge der chronischen Entzündung ist (Ullman und Itzkowitz, 2011). Auch die MSI trägt durch Mutationen bzw. Promotorhypermethylierung in DNA-Reparaturgenen mit der Folge ausbleibender Reparaturmechanismen zur Häufung von Mutationen in neu replizierter DNA bei. Die häufigste Form der genomischen Instabilität in der Pathogenese der CU-assoziierten kolorektalen Karzinome ist die CIN, induziert durch Aneuploidie (Seril et al., 2003). Weiterhin kommt korrespondierend mit der Zunahme intraepithelialer Neoplasien zu Mutationen in den Genen *DCC* (Fearon und Vogelstein, 1990), *k-ras* und *APC* (Seril et al., 2003). Dadurch wird eine Tumorprogression begünstigt. *K-ras*-abhängige Signalwege regulieren über MAPK (mitogen-activated protein kinase) und PI3K/AKT die Tumorzellproliferation, deren Wachstum und Überleben sowie die Invasion und Metastasierung. *APC* ist ein negativer Regulator des Wnt-Signalweges und an der Degradation von β -Catenin beteiligt. Sein Verlust fördert Protoonkogene wie *c-Myc* (Lemieux et al., 2014).

1.1.3 Entzündungsassoziierte Karzinogenese

Bereits 1863 bemerkte Rudolf Virchow, dass Entzündungszellen im Tumorgewebe vorkommen und sich Tumore besonders an chronisch entzündeten Stellen entwickelten (Balkwill und Mantovani, 2001). Seitdem haben viele klinische und epidemiologische Studien diesen Zusammenhang bestätigt. So sind etwa ein Viertel aller Krebserkrankungen mit einer chronischen Entzündung assoziiert (Balkwill und Mantovani, 2001; Hussain und Harris, 2007; Mantovani et al., 2008). Das Risiko an einem kolorektalen Karzinom zu erkranken ist bei CU-Patienten, abhängig von der Erkrankungsdauer und -ausdehnung, um etwa 33 % erhöht (Mitamura et al., 2002; Francescone et al., 2015). Klinische Studien zeigten, dass auch die Effektivität der antientzündlichen Therapie großen Einfluss auf die Prävalenz der CU-assoziierten Karzinome hat. Weiterhin belegen experimentelle Studien, dass Karzinome entzündungsgetriggert entstehen können. So führte in *Azoxymethane*-Mausmodellen (AOM) eine Einzelinjektion der karzinogenen Substanz Azoxymethan nur dann zur Malignombildung, wenn gleichzeitig eine chronische Entzündung induziert wurde. In nicht entzündetem Gewebe führte erst die mehrfache Injektion des Karzinogens zur Tumorinduktion (Neufert et al., 2007; Grivennikov und Karin, 2010). Auch viele genetische, pharmakologische und molekulare Studien belegen

die tumorfördernde Eigenschaft der Entzündung und lassen einen *crossstalk* zwischen Entzündung und Onkogenese vermuten; Review (Grivennikov, 2013).

Bezug nehmend auf den zellulären und molekularen Zusammenhang zwischen Entzündung und Karzinogenese kann zwischen zwei Signalwegen unterschieden werden: einem extrinsischen, bei dem die Entzündung die Tumorentstehung fördert, und einem intrinsischen, bei dem genetische Veränderungen (Onkogene) die Ausbildung von Neoplasien fördern und so ein entzündliches Mikroklima geschaffen wird (Colotta et al., 2009). Beide Wege führen über die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, Onkogenen und die Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen zur sogenannten Tumor-assoziierten Entzündung (Mantovani et al., 2008). Die bei einer chronischen Entzündung involvierten Lymphozyten, Plasmazellen und Makrophagen (Meira et al., 2008) bedingen die Freisetzung von Entzündungsmediatoren und das resultierende Mikromilieu fördert die Progression, Angiogenese, Migration, Invasion und Metastasierung des Tumors (**Abb. 2**) (Mantovani et al., 2008; Grivennikov und Karin, 2011).

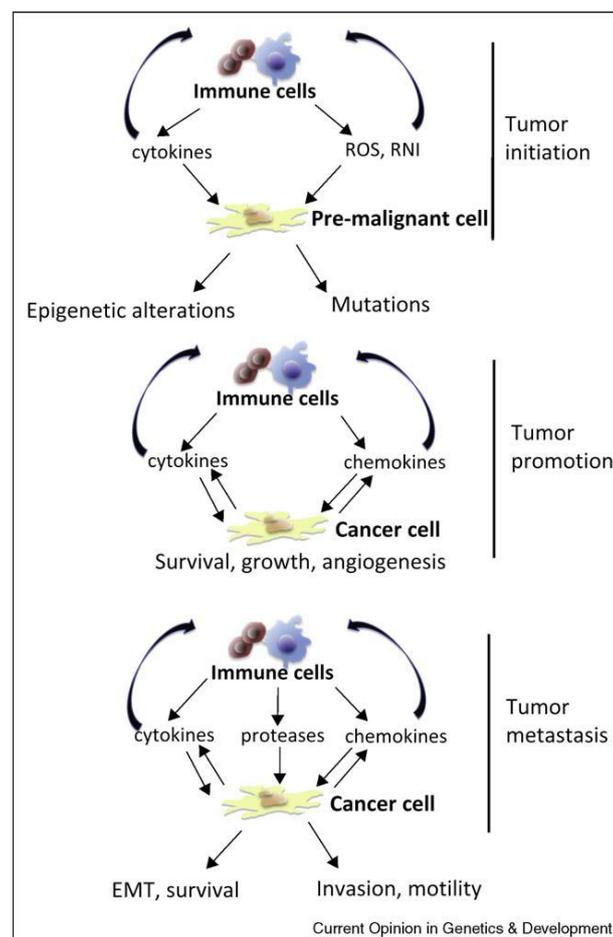


Abb. 2: Mechanismen entzündungsbasierter Tumorentwicklung. Entzündungsmediatoren und das resultierende Mikromilieu fördern die Progression, Angiogenese, Migration, Invasion und Metastasierung des Tumors aus Grivennikov 2010 (Grivennikov und Karin, 2010).

Durch die von Makrophagen ausgeschütteten entzündungsfördernden Zytokine wie TNF α (*tumor necrosis factor α*) und IL-6 (Interleukin 6) werden onkogene Transkriptionsfaktoren wie NF- κ B (*nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells*), AP-1 (*activator protein 1*) und STAT3 (*Signal transducer and activator of transcription 3*) in epithelialen Zellen aktiviert, die die Transkription, Proliferation und das Überleben von Zellen fördern (Grivennikov und Karin, 2011). Neuere Studien belegen, dass TNF α nicht nur von Immunzellen wie Makrophagen, sondern auch von den Epithelzellen selbst in entzündetem Gewebe sezerniert wird (Francescone et al., 2015). Neben der Sekretion dieser Zytokine und Aktivierung der Transkriptionsfaktoren spielen auch angiogene Faktoren und die durch Immunzellen produzierten Chemokine wie reaktive Sauerstoff- (ROS) und Stickstoff-Spezies (RNS) eine bedeutende Rolle in der Karzinogenese (Terzic et al., 2010). ROS und RNS können direkt oder über Intermediate zu DNA-Schäden und Mutationen führen (**Abb. 3**) (Lu et al., 2006) oder schädigen indirekt, durch Rekrutierung anderer entzündungsfördernder Zellen (Federico et al., 2007b).

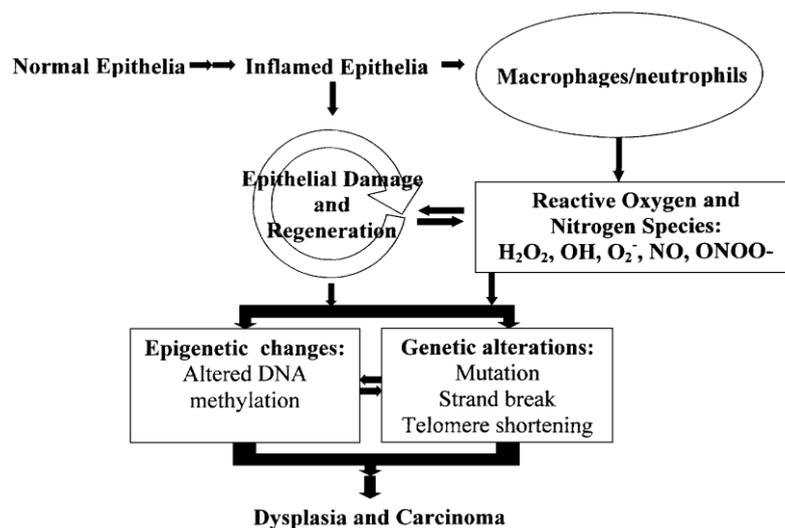


Abb. 3: Modell entzündungsbedingter Veränderungen genetischer und epigenetischer Art.

Entzündungsbedingte Sekretion von ROS/RNS schädigt das Epithel und führt zu epigenetischen und genetischen Veränderungen, die die Dysplasie und Tumorgenese fördern; aus Seril 2003 (Seril et al., 2003)

Der Zusammenhang zwischen Entzündung und Tumorgenese ist somit unumstritten (Coussens und Werb, 2002). Und bereits 2009 wurden die von Hanahan und Weinberg definierten sechs Kennzeichen maligner Tumore („*Hallmarks of Cancer*“) (Hanahan und Weinberg, 2000) um ein siebtes Zeichen, die Entzündung, erweitert (Colotta et al., 2009). Allerdings konnte bisher die Frage, ob die Entzündung allein ausreichend für die Tumorinitiation ist, nicht hinreichend beantwortet werden (Mantovani et al., 2008; Grivennikov und Karin, 2010).

1.2 Oxidativer Stress und Karzinogenese

Unter physiologischen Bedingungen werden intrazellulär sogenannte Intermediate des Sauerstoffs und Stickstoffs gebildet: ROI (*Reactive Oxygene Intermediate*) und RNI (*Reactive Nitrogene Intermediate*). Diese Metaboliten wie $O_2^{\bullet-}$ (Superoxidanionradikal) und H_2O_2 (Wasserstoffperoxid), dienen vor allem als Signalmoleküle für den Stoffwechsel, Zellzyklus und intrazelluläre Signalwege (Federico et al., 2007a). H_2O_2 ist dabei kein freies Radikal im eigentlichen Sinne, wird aber zu den ROS gezählt, da es die Fähigkeit besitzt hochreaktive Hydroxylradikale ($\bullet OH$) zu bilden. Der Körper verfügt zur Aufrechterhaltung des Gleichgewichts zwischen Signalmolekülen und schädigender Menge an ROS/RNS über sogenannte Antioxidantien, wie die Superoxiddismutase (SOD), Katalasen und Peroxidasen (Thannickal und Fanburg, 2000). Herrscht ein Ungleichgewicht zwischen ROI, RNI und verminderter antioxidativer Abwehr so kommt es zum oxidativen Stress.

CED wurden bereits 2003 von Hussein et al. als „*oxyradical overload disease*“ bezeichnet. Freie Radikale greifen dabei in viele metabolische Prozesse ein und können DNA, RNA, Proteine und Lipide oxidieren oder deaminieren (LihBrody et al., 1996; Hussain et al., 2003; Meira et al., 2008). Daher spielen oxidativer Stress und durch Immunzellen wie Makrophagen produzierte große Menge an ROS und RNS, die die DNA schädigen, in der CU-assoziierten Karzinogenese eine große Rolle (**Abb. 4**) (Roessner et al., 2008; Kraus und Arber, 2009). Durch die verminderte antioxidative Abwehr kann es so zu Schäden am kolorektalen Epithel und zu erhöhter Permeabilität der Mukosa für Toxine und Karzinogene kommen (Bülbul et al., 2014), woraus Mutationen, Strangbrüchen, Telomerverkürzungen und Veränderungen im Methylierungsstatus resultieren können. Die entzündungsbedingte erhöhte Zellumsatzrate führt dann zu Replikationsfehlern und Manifestation eben dieser und beschleunigt die epigenetische Veränderungen (Seril et al., 2003) und begünstigt so die Karzinogenese.

Die häufigste ROS unter physiologischen Bedingungen stellt das $O_2^{\bullet-}$ dar, welches vor allem in der Atmungskette der Mitochondrien durch unvollständige Reduktion des molekularen Sauerstoffs anfällt (LihBrody et al., 1996; Mangerich et al., 2013). Die erhöhten ROS/RNS-Level während der CED kommen zum einen durch die Entzündung selbst zustande, zum anderen produzieren im Frühstadium der Erkrankung die Epithelzellen erhöhte ROS-Level (Zhu und Li, 2012). Die Infiltration mit Entzündungszellen als Kennzeichen der CED (Maloy und Powrie, 2011) zieht bei deren Aktivierung die Produktion großer Mengen an ROI/RNI durch die NAD(P)H-Oxidasen (*NOX1*, *NOX2*) und die Stickstoffoxide-Synthase (*iNOS*) nach sich. Und auch die Epithelzellen verfügen über *NOX* und *iNOS* Enzyme, die der körpereigenen Abwehr dienen und die durch entzündungsbedingte Zytokine wie $TNF\alpha$ oder $IFN-\gamma$ (Interferon- γ) aktiviert werden können (Zhu und Li, 2012; Mangerich et al., 2013).

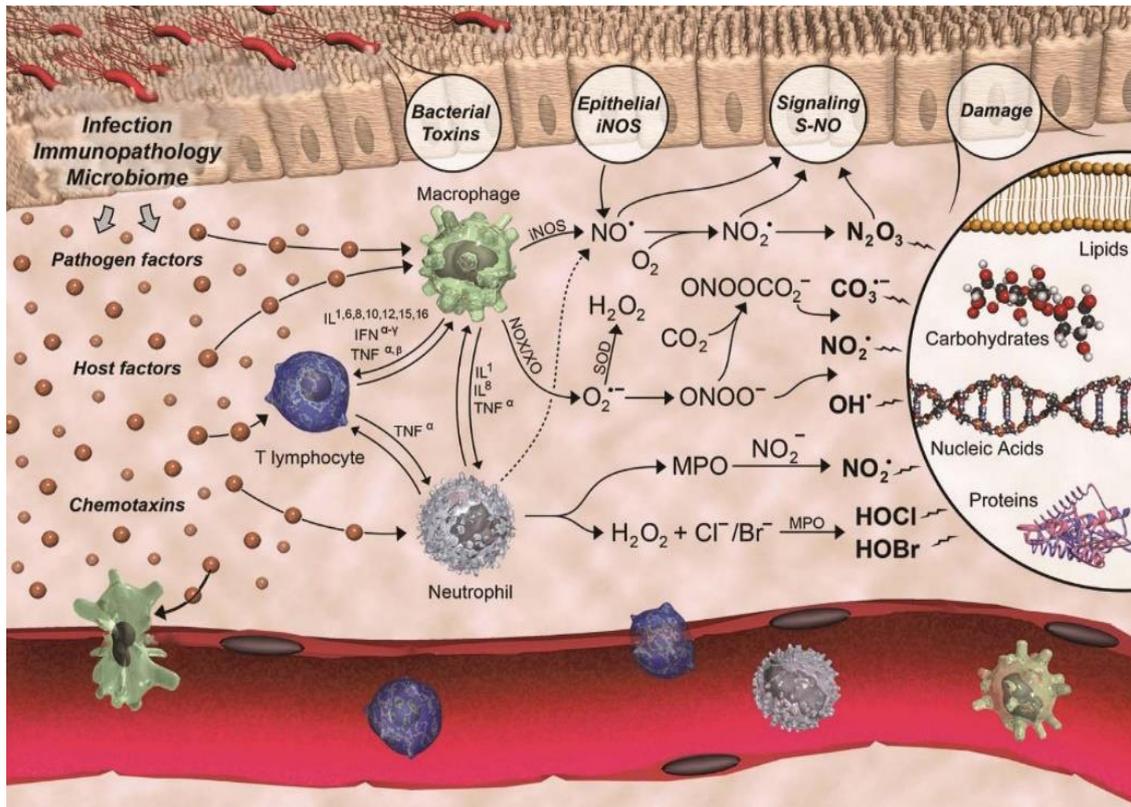


Abb. 4: Chemische und biologische Mechanismen der Entzündung; aus Mangerich 2013 (Mangerich et al., 2013). Immunzellen wie Makrophagen bedingen die Ausschüttung entzündungsfördernder ROS/RNS wie H_2O_2 , aus denen reaktive Intermediate gebildet werden, die die DNA schädigen können und so die Karzinogenese vorantreiben. iNOS, inducible nitric oxide synthase; MPO, myeloperoxidase; NOX, NADPH oxidase; XO, xanthine oxidase.

Durch die SOD wird das $O_2^{\bullet-}$ in H_2O_2 umgewandelt, das dann durch Katalasen und Glutathion-Peroxidasen in Wasser und Sauerstoff umgewandelt wird. Gerade Immunzellen wie Neutrophile und Makrophagen verfügen über eine große Menge an SOD (Pravda, 2004). Akkumuliert H_2O_2 kann es über die Fentonreaktion in das hochreaktive $\bullet OH$ umgewandelt werden, das als das am stärksten schädigende Radikal gilt. Außerdem ist H_2O_2 selbst hoch membrangängig und wirkt als Signalmolekül an zellulären Prozessen wie Phosphorylierungskaskaden mit. Diese ziehen dann Proliferation und Zytokinausschüttungen nach sich (Mangerich et al., 2013). Ein Zusammenhang zwischen H_2O_2 und der CED konnte schon früh infolge von kurierender Darmspülungen mit H_2O_2 ermittelt werden. Und auch an einer Studie mit Ratten führte eine rektale Injektion einer nur 3%igen H_2O_2 -Lösung zur CED (Pravda, 2004). Weiterhin konnte MacFie *et al.* zeigen, dass die H_2O_2 -Produktion bei aktiver Colitis im Epithel selbst stattfindet, was wiederum den Entzündungsprozess durch Rekrutierung von Immunzellen vorantreibt (MacFie et al., 2014).

1.3 DNA-Schadenskontrolle und Zellzyklusregulation

Jede der rund 10 Billionen Zellen im menschlichen Körper erfährt täglich mehrere zehntausend DNA-Läsionen (Lindahl und Barnes, 2000; Chen et al., 2012). Ohne Reparatur kommt es dadurch zu Mutationen, Aberrationen, Einzel- (SSB) oder Doppel-Strangbrüchen (DSB) der DNA, Replikations- und Transkriptionsabbrüchen und nachfolgend zur Beeinträchtigung der Viabilität (Jackson und Bartek, 2009). Um die genetische Stabilität aufrecht zu erhalten, haben Zellen eine DNA-Schadenskontrolle entwickelt, die es ihnen ermöglicht, den Schaden zu detektieren und eine Reparatur einzuleiten. Der Schaden wird von Sensoren erkannt und an Signalgeber (*Transducer*) weitergegeben. Effektor-Proteine induzieren anschließend die Verzögerung oder den Stopp des Zellzyklus und ermöglichen so eine Pause, in der Reparaturmechanismen greifen können. Innerhalb des Zellzyklus existieren analog zu den einzelnen Phasen G1 (*Gap1*), S (Synthese), G2 (*Gap2*) und M (Mitose) diverse Kontrollpunkte. Am Übergang G1/S wird die Replikation geschädigter DNA verhindert. Wird der G1-Kontrollpunkt trotzdem überwunden bzw. kommt es während der S-Phase zu Schäden wird am Intra-S-Kontrollpunkt die Replikation unterbrochen. Am Übergang G2/M wird bei bestehendem Schaden der Eintritt in die Mitose verhindert. Der korrekte Aufbau des Spindelapparates wird während der Mitose am M-Kontrollpunkt überprüft (Poehlmann und Roessner, 2010; Chen et al., 2012; Weinberg, 2013). Zu Beginn der G1-Phase erfolgt die Regulation im Besonderen über externe Faktoren und es wird die Entscheidung über Differentiation, Ruhezustand (G0-Phase) oder programmierten Zelltod (Apoptose) bei irreparablen Schäden getroffen (Boonstra und Post, 2004). An allen Kontrollpunkten spielen Zykline und deren Aktivatoren, die zyklinabhängigen Proteinkinasen (*CDK: cyclindependent protein kinases*) eine wichtige Rolle.

Die wichtigsten DNA-Schadenssensoren sind die Proteinkinasen ATM (*Ataxia telangiectasia mutated protein*) und ATR (*Ataxia telangiectasia and Rad3-related protein*), welche vorwiegend durch DSB oder RPA- (*replication protein A*) markierte ssDNA rekrutiert werden. Als nachfolgende *Transducer* reduzieren die Proteinkinasen Chk1 und Chk2 (*checkpoint kinase*) zusammen mit ATM/ATR die Aktivität der CDK z. B. über die Aktivierung des Transkriptionsfaktors p53. Gleichzeitig wird durch die transkriptionelle oder post-transkriptionelle Induktion von DNA-Reparaturproteinen, die Rekrutierung von Reparaturfaktoren und die Aktivierung der Reparaturproteine eine Reparatur der DNA-Schäden ermöglicht (Jackson und Bartek, 2009). Auch die Chromatinstruktur spielt eine wichtige Rolle in der Schadensantwort. So werden DSB innerhalb kürzester Zeit durch eine Histon H2A Variante (H2A.X) markiert, die ATM-, ATR- oder DNA-PK- (*DNA-dependent protein kinase*) vermittelt, an Serin 139 oder 142 phosphoryliert wurde (γ H2A.X) und an der Schadensstelle akkumuliert. Über Zielproteine wie z.B. MCPH1 (Microcephalin) können zum einen Reparaturproteine rekrutiert und zum

anderen über ATR und Chk1/2 ein Zellzyklusarrest eingeleitet und so eine Reparatur ermöglicht werden (Bonner et al., 2008).

1.3.1 Chk1 im Zellzyklus und in der DNA-Schadensantwort

Chk1 wurde erstmalig 1993 von Walworth *et al.* als Serin/Threonin-Kinase mit einer Rolle im Zellzyklus nach DNA-Schaden in Hefen (*fission yeast*) identifiziert (Walworth et al., 1993). Das entsprechende Ortholog in humanen Zellen wurde 1997 beschrieben (Sanchez et al., 1997). Es ist sowohl nukleär, als auch zytoplasmatisch lokalisiert und kann am Chromosom oder in den Zentrosomen gebunden vorliegen (Zhao et al., 2002; Kramer et al., 2004; Smits et al., 2006; Niida et al., 2007). Das Molekulargewicht beträgt ~56 kDa (476 Aminosäuren) und die Sequenz, schematisch in **Abb. 5** dargestellt, ist zum Teil hochkonserviert. Die Chk1 Kinasedomäne besteht aus zwei Subdomänen, einer kleineren N-terminalen Domäne aus β -Faltblättern und einer mehr als doppelt so großen helikalen C-terminalen Domäne, die durch eine *linker*-Region miteinander verknüpft sind. Die C-terminale Domäne übt vermutlich intramolekular eine inhibierende Funktion aus. Die dort gelegene SQ/TQ-Domäne hat verschiedene konservierte Serin-Glutamin- (SQ) oder Threonin-Glutamin- (TQ) Motive, bei denen bevorzugt die Serin-Reste durch ATR phosphoryliert werden (Zhao et al., 2002). Die ATR abhängige Phosphorylierung der Serin-Reste 317 und 345 ist essentiell für eine Änderung der Konformation und somit für die Aktivierung von Chk1 (Wang et al., 2012; Patil et al., 2013). Nach Phosphorylierung der Serin-Reste 317/345 kommt es an Serin 296 zur Autophosphorylierung was eine räumlich-zeitliche Regulation innerhalb des Zellkerns nach sich zieht und einer Terminierung der Chk1-abhängigen Mechanismen dient (Kasahara et al., 2010). Studien belegen, dass phosphoryliertes Chk1 eine deutlich höhere Kinaseaktivität, als die unphosphorylierte Variante besitzt (Chen et al., 2000). Neben weiteren kontextabhängigen Phosphorylierungsstellen ist auch die Mobilisation und Lokalisation von Chk1 stark kontextbedingt (Goto et al., 2012).

Infolge von DNA-Schaden wird Chk1 am S- oder G2/M-Kontrollpunkt durch am Chromatin gebundenes ATR und Repression inhibierender Faktoren (Walker et al., 2009) oder in Claspin-abhängiger Weise infolge stockender Replikation (Chen et al., 2012) phosphoryliert. Aktiviertes Chk1 kann die Replikation der DNA verzögern, die Replikationsgabel stabilisieren und so den Eintritt der Zelle in die Mitose und zunächst den apoptotischen Zelltod verhindern (Sanchez et al., 1997).

Doch auch im ungestörten Zellzyklus übt Chk1 durch die Regulation der Replikation (Goto et al., 2012) eine wichtige Funktion aus. So wird der Zeitpunkt des Mitosestarts indirekt, durch Lokalisationsänderungen von nukleär nach zytoplasmatisch, über Chk1-abhängige CDKs reguliert (Enomoto et al., 2009; Matsuyama et al., 2011). Auf diese Weise verhindert Chk1 die verfrühte Mitose bei unvollständiger DNA-Synthese.

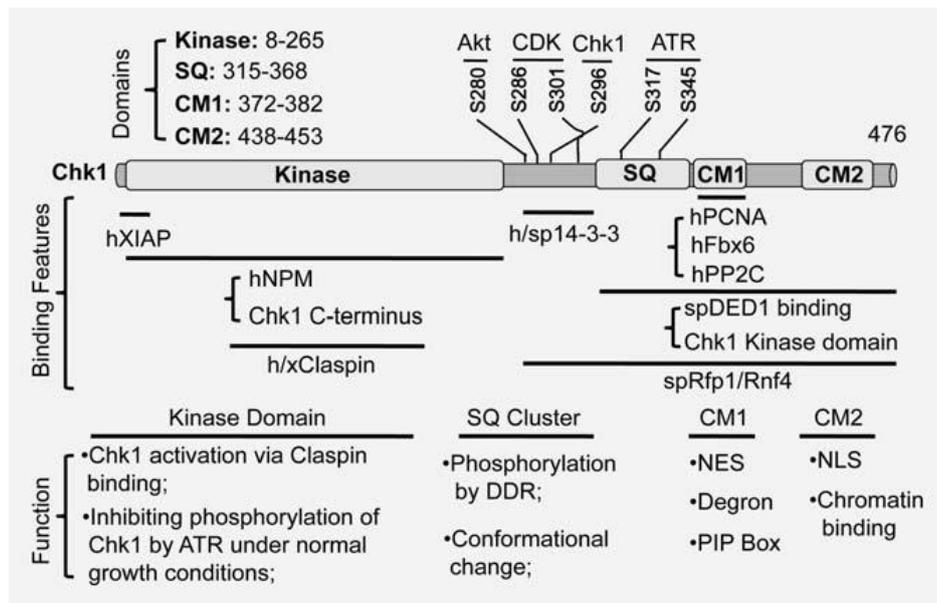


Abb. 5: Schematische Darstellung des Chk1-Proteins; aus Zhang 2014 (Zhang und Hunter, 2014). Humanes Chk1: Domänenstruktur, Phosphorylierungsstellen, interagierende Proteine und Domänenfunktion. SQ, Ser/Gln cluster; CM, conserved motif; NES, nuclear export signal; NLS, nuclear localisation signal; h, human; sp, S pombe; x, Xenopus; PIP, PCNA-interacting protein.

Eine dritte, zentrosomale Rolle von Chk1 (Kramer et al., 2004) steht ebenfalls mit dem Eintritt in die Mitose im Zusammenhang. Es wird vermutet, dass Chk1 in der späten G2-Phase am Zentrosom akkumuliert um Cdc25B zu phosphorylieren - eine Phosphatase, die CDK1 aktiviert und die dadurch inhibiert wird. Allerdings wird diese Theorie mittlerweile kontrovers diskutiert (Matsuyama et al., 2011).

Unumstritten ist die kritische Rolle von Chk1 im Spindel-Kontrollpunkt in der M-Phase des Zellzyklus. In Chk1-defizienten Zellen kommt es nach Behandlung mit einem Microtubuli-Abbau-Hemmer zu Chromosomenmissegregationen und infolge dessen zu genomischer Instabilität. Dies lässt vermuten, dass Chk1 die Lokalisation der Kinetochore über Aurora B reguliert (Zachos et al., 2007). Defekte Spindel-Kontrollpunkte begünstigen somit CIN, Aneuploidie und daraus folgend die Tumorgenese.

Bezüglich der Lokalisation von Chk1 haben Smits et al. festgestellt, dass während aller Zellzyklusphasen 20 % des zellulären Chk1 chromatingebunden vorliegt (Smits et al., 2006). Eine schnelle Dissoziation des Chk1 vom Chromatin scheint die Zellzyklusantwort zu fördern. Da die Dissoziation von Chk1 vom Chromatin deutlich mit seiner Phosphorylierung korreliert, wird vermutet, dass die Lokalisation am Chromatin für eine effektive Verteilung von Chk1 im Kern essentiell ist und nukleäre Zielproteine so schnell und effektiv erreicht werden können. Außerdem entsteht so eine räumliche Nähe zu ATM und ATR wodurch die Phosphorylierung von Chk1 ermöglicht wird (Niida et al., 2007). Daraus lässt sich auch die neueste Funktion von Chk1, die eines

Chromatin-modifizierenden Transkriptionsfaktors, ableiten (Enders, 2008). Chk1 phosphoryliert Histon H3 an Threonin 11 (T11) und ermöglicht so die Bindung von GCN₅ (*general control nonderepressible 5*) welches dann H3 an Lysin 9 (K9) acetyliert (Shimada et al., 2008). Das bedeutet, dass ATR/ATM-abhängige Dissoziation von Chk1 vom Chromatin mit einer Reduzierung von phospho-H3^{T11}, acetyliertem H3^{K9}, der GCN₅-Bindung und daraus folgend der Transkription von bis zu 200 Genen oder Phosphorylierungen an anderen Histonen einhergeht (Enders, 2008).

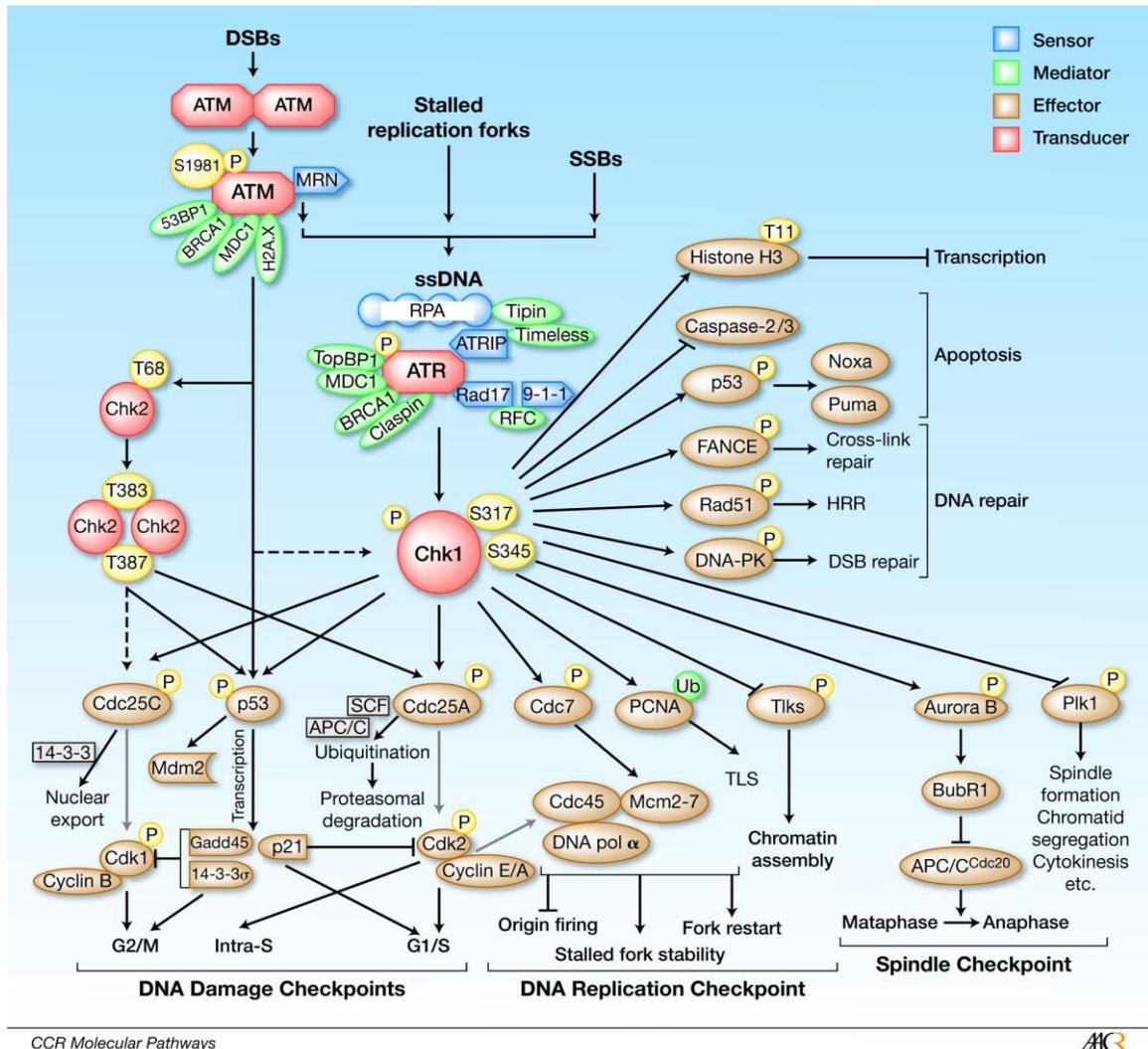


Abb. 6: Rolle von Chk1 im Zellzyklus und in der DNA-Schadens-Antwort; aus Dai 2010 (Dai und Grant, 2010). Durch DNA-Schäden werden DNA-Strangbrüche generiert, die eine ATR-abhängige Aktivierung von Chk1 nach sich ziehen. Der ATR/ATRIP-Komplex wird über RPA an die markierte DNA rekrutiert. Nachfolgend wird Chk1 an Serin 317/345 durch ATR phosphoryliert und damit aktiviert. Aktiviertes Chk1 phosphoryliert diverse nachgeschaltete Effektoren, die in die Zellzykluskontrolle, die DNA-Replikationskontrolle, den mitotischen Spindelkontrollpunkt und weiterhin in die DNA-Reparatur, die Apoptose, sowie die Transkription involviert sind. Demnach stellt Chk1 eine Kinase mit zentraler Bedeutung für das DNA-Schadens-Netzwerk dar.

1.3.2 JNK MAPK im Zellzyklus und in der DNA-Schadens-Antwort

Oxidativer Stress aktiviert die MAPKs (*Mitogen-activated protein kinases*). Wobei die ERK (*extracellular signal-regulated protein kinase*) vorwiegend mitogen aktiviert wird und als Proliferations- und Differentiationsfaktor wirkt (Cobb, 1999). MAPK p38, auch MAPK14 genannt, und besonders JNK/SAPK (c-Jun N-terminale Kinase oder *stress-activated protein kinase*) hingegen werden bei Veränderungen im Redoxgleichgewicht aktiviert.

Drei Gene kodieren für die JNK 1-3, wobei JNK1 und JNK2 in vielen Geweben vorkommen, JNK3 vorrangig im Gehirn lokalisiert ist. Alternatives *splicen* der jeweiligen pre-mRNA innerhalb der katalytischen Domäne führt zu den α - und β -Isoformen, *splicen* am COOH-terminalen Ende hingegen zu den Varianten mit 46 kDa (p46) bzw. 54 kDa (p54) – auch Typ 1 und 2 genannt (Kyriakis und Avruch, 2012). Die α - und β -Isoformen unterscheiden sich in der Affinität zu Substraten, wohingegen über die funktionelle Signifikanz der beiden Varianten p46 und p54 wenig bekannt ist (Kyriakis und Avruch, 2012).

Die Induktion des heterodimeren Transkriptionsfaktors AP-1 durch H_2O_2 , Zytokine und andere Stressoren erfolgt hauptsächlich über die JNK-MAPK-Kaskade (Shibata et al., 2008; Reuter et al., 2010). Dabei aktivieren vorrangig MKK4 und MKK7 JNK durch Phosphorylierung und JNK seinerseits aktiviert ebenfalls durch Phosphorylierung Zielproteine wie c-Jun, einer AP-1-Komponente, an S63 und/oder S73 was zur Stabilisierung von c-Jun und zur Aktivierung der Transkription führt (Sabapathy et al., 2004; Kyriakis und Avruch, 2012). JNK spielt in Abhängigkeit vom Stimulus und Zelltyp eine Rolle in der Induktion der Apoptose, Zellproliferation, Entzündung oder Transformation (Karin und Gallagher, 2005; Shibata et al., 2008). JNK kann eine tumorfördernde oder tumorunterdrückende Funktion innehaben. So wurde JNK1 als Proliferationsfördernd, JNK2 als negativer Regulator der Proliferation beschrieben (Sabapathy et al., 2004). Im Gegensatz dazu hat JNK2 in p53-defizienten Zellen eine Schlüsselrolle im Überleben inne (Potapova et al., 2000), u. a. durch positive Regulation des Transkriptionsfaktors c-Jun (Jaeschke et al., 2006). p53-Mutationen sind zudem ein frühes Ereignis in der kolorektalen Karzinogenese. In humanen kolorektalen Krebszelllinien führte außerdem die erhöhte Aktivität des Protoonkogens *KRAS* zur Aktivierung des JNK-Signalweges (Fang und Richardson, 2005). Liu *et al.* zeigten, dass oxidativer Stress (H_2O_2) zur Aktivierung von JNK führt, im Besonderen durch den *crossstalk* zwischen PI3-K/PKB und dem JNK-Signalweg (Liu et al., 2002). Die Inhibition von PI3-K hingegen verhinderte die durch H_2O_2 induzierte Apoptose (Zhou et al., 2005).

Innerhalb der Zellzykluskontrolle regulieren JNK durch Phosphorylierung von p53 den G1/S-Übergang (Buschmann et al., 2000). Durch Phosphorylierung von Cdc25c oder über das Target p21^{WAF1} kann JNK einen G2/M-Arrest induzieren (Kardassis et al., 1999; Gutierrez et al., 2010).

1.4 Epigenetik und Karzinogenese

Zell- und Gewebe-spezifische DNA-Methylierungen, Histonmodifikationen, die Chromatinstruktur, sowie die kodierende und nicht-kodierende RNA bilden das Epigenom. Es wird zeitlebens dynamisch moduliert und reguliert das Wann, Wo und Wie der Genexpression. Veränderungen, so genannte epigenetische Alterationen, werden mit allen Stadien der Tumorentstehung in Verbindung gebracht, der Initiation, Progression, Invasion und Metastasierung (Huang et al., 2011). Im Gegensatz zu irreversiblen genetischen Veränderungen sind epigenetische DNA-Veränderungen z. T. reversibel, weshalb deren Aufklärung neue therapeutische Ansätze verspricht (Esteller, 2011).

Die dynamische Modulation des Chromatins im Zuge der Genexpression, Apoptose, Replikation, DNA-Reparatur und der Chromosomenkondensation und -segregation erfolgt kontextabhängig durch kovalente Histonmodifikationen und den Einbau von Histonvarianten, durch ATP-abhängigen Chromatinumbau oder DNA-Methylierung (Wang et al., 2007a). Aufgrund des enormen Einflusses dieser Modifikation auf die Genexpression spricht man auch vom „Epigenetischen Code“ (Cohen et al., 2011). Daher liegt es auf der Hand, dass Störungen in der Chromatinmodulation zur Karzinogenese beitragen.

1.4.1 Kovalente Histonmodifikationen

Histone haben einen hohen Gehalt an den Aminosäuren Lysin und Arginin bzw. Serin und Threonin, die bevorzugt N-terminal durch Acetylierung, Methylierung, Phosphorylierung, Ubiquitylierung und weitere Veränderungen modifiziert werden; exemplarisch in (**Abb. 7**) dargestellt. Diese post-translationalen Veränderungen führen u. U. dazu, dass die DNA während der Replikation nicht vollständig aufgewunden werden kann. Sie werden daher für das Stilllegen oder Aktivieren bestimmter Gene genutzt und können im Minutentakt variieren (Wang et al., 2007a).

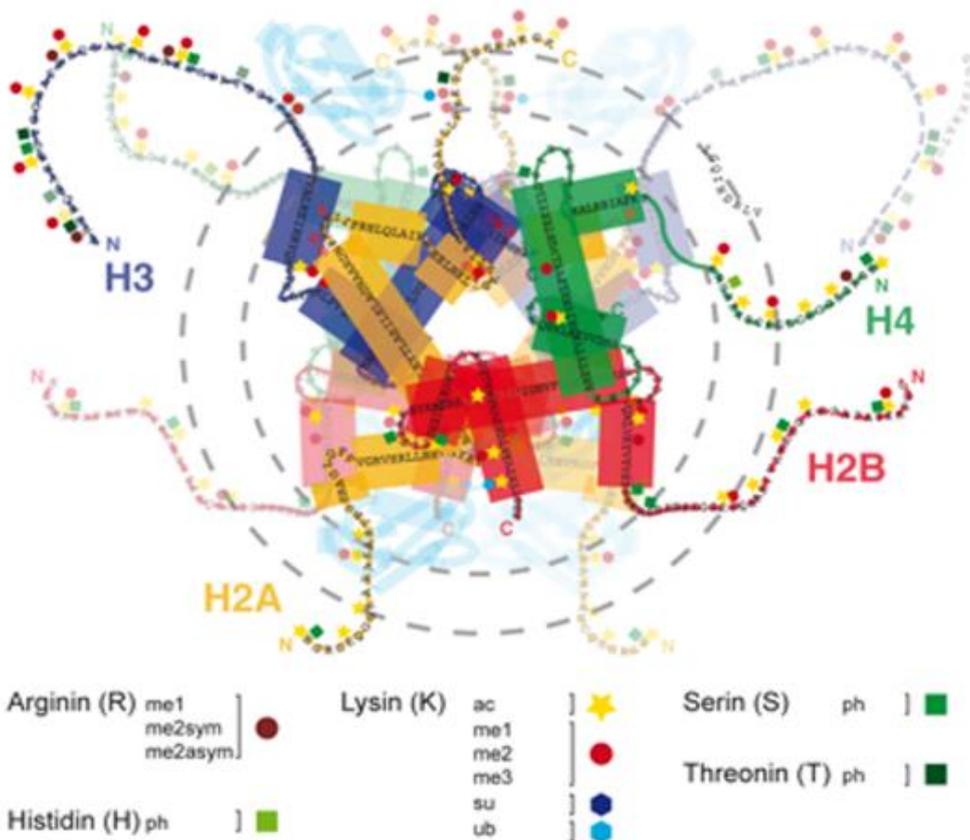
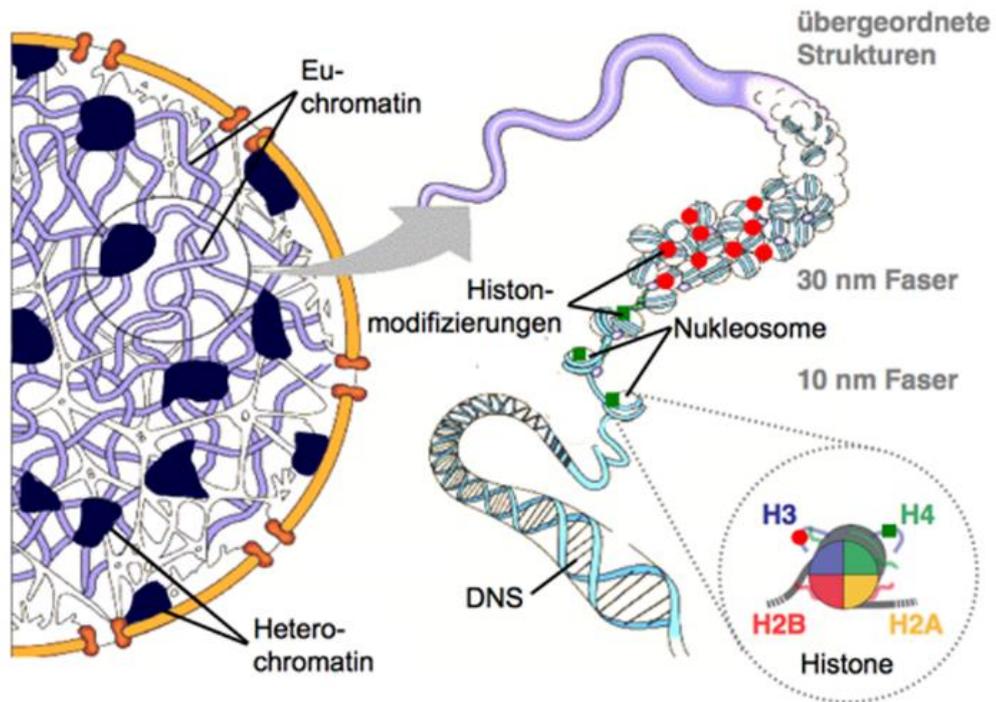


Abb. 7: Modell des Epigenoms humaner Zellen und Modifikationsstellen der Corehistone.
 DNS, Desoxyribonucleinsäure; H3 H4 H2A H2B, Histon 3 4 2A bzw. 2B; me, methyliert; ac, acetyliert; ph, phosphoryliert; mit freundlicher Genehmigung von W. Fischle, Max-Planck-Institut für Biophysikalische Chemie, Göttingen.

1.4.1.1 Acetylierung

Die bisher am besten untersuchte Histonmodifikation ist dabei die Acetylierung an Lysinen durch HATs (*histone acetyl-transferases*) oder die entgegen wirkende Deacetylierung durch HDACs (*histone deacetylases*) (Hake et al., 2004). Die HATs sind dabei u. a. nukleär lokalisiert, wo sie durch die Acetylierung die Öffnung der Chromatinstruktur und somit das Binden von Transkriptionsfaktoren und damit die Transkription begünstigen. Eine wichtige HAT ist der Koaktivator CBP/p300 (p300/CREB-bindendes Protein), der jedes der vier Corehistone und 70 andere Proteine, darunter p53 und Aktivatoren wie AP-1 (c-Jun und c-Fos) acetylieren kann (Chen et al., 1997; Cohen et al., 2011). Eine Bedeutung von p300/CBP in der Oncogenese wurde durch *loss-of-function*-Mutationen in kolorektalen Karzinomen belegt (Cohen et al., 2011). Eine weitere wichtige HAT ist GCN₅, welches sowohl H3 als auch H4 zu acetylieren vermag (Chen et al., 1997). Die bevorzugte Acetylierungsstelle am jeweiligen Histon ist dabei abhängig davon, in welchem Komplex GCN₅ gebunden ist. GCN₅ reguliert dabei u.a. die onkogene Aktivität des Onkoproteins c-Myc oder von Tumorsuppressoren wie p53 oder BRAC1 (Cohen et al., 2011).

Zu den wichtigsten Histondeactylasen zählen neben der SIRT-Famile (*sirtuins*) vor allem die HDACs 1-11 mit verschiedenen zellulären Lokalisationen, deren Aktivität u.a. durch Trichostatin A (TSA) gehemmt werden kann. Auch die HDACs üben ihre Funktion über Cofaktoren aus (Richards und Elgin, 2002). Neueste Studien belegen eine Rolle von HDAC1 und HDAC2 in intestinalen Entzündungen (Turgeon et al., 2013). Da beide Deacetylases die intestinale Entzündungsantwort hemmen und an der Regulation der Zellpolarität der Epithelzellen, der Proliferation und Differentiation beteiligt sind (Turgeon et al., 2013). Des Weiteren stimuliert die Deacetylierung von PTEN (*Phosphatase and Tensin homolog*) durch HDAC1 dessen Aktivität. PTEN selbst ist eine wichtige Phosphatase im Signalweg der Phosphoinositole (AKT/PI3) die ununterdrückt durch Einleiten der Apoptose als Tumorsuppressor fungiert (Li, 1997).

1.4.1.2 Methylierung

Die Methylierung ist eine weitere post-translationale Modifikation der Histone und erfolgt durch HMTs (*histone methyl-transferase*) entweder an Lysinen oder an Argininen und kann repressiv oder aktivierend wirken. Dabei werden auch Lysine methyliert, auch mehrfach (Tri-Methylierung), die häufig zur Acetylierung genutzt werden wie z. B. Lysin 9 in Histon H3 (H3K9) (Hake et al., 2004). Histondemethylasen (KDM) entfernen dementsprechend die Methyl-Gruppen von den Histonen. Die für die kolorektale Karzinogenese bedeutendsten Methylierungen sind die an H3K9 und H4K20(tri-) (Zoratto et al., 2014). Eine fehlende Demethylierung von H3K9 korreliert mit der Proliferation, Koloniebildung und Migration humaner kolorektaler Krebszellen (Liu et al., 2013). Die Dimethylierung an H3K20 erfolgt vermutlich infolge der γ H2A.X-vermittelten

DNA-Schadensantwort (Pei et al., 2011). Und der Verlust von H4K20me3 ist für mehrere Krebszelllinien und Tumore beschrieben.

1.4.1.3 Phosphorylierung

Die Histon-Phosphorylierung erfolgt durch Histonkinasen an den Serinen und Threoninen und erfolgt zyklisch während des Zellzyklus und zieht u. a. eine Kondensation des Chromatins nach sich. Daher erfolgt diese Modifikation auch im Zuge der Mitose, Apoptose und nach DNA-Schaden (Hake et al., 2004). So wird z. B. Histon H3 an Serin 10 im Zuge der Chromosomenkondensation während der Mitose phosphoryliert (pH3^{S10}) (Wang et al., 2001). Diese Modifikation wird zusätzlich durch Aurora B katalysiert, dem eine Rolle in der kolorektalen Karzinogenese zugewiesen wird (Cohen et al., 2011). Doch auch in der Regulation der Transkription der mitogen stimulierten *immediate-early response genes* wie *c-Jun* und *c-Fos* spielt pH3^{S10} eine Rolle (Cohen et al., 2011). Eine Phosphorylierung an H3 kann weiterhin die Acetylierung von H3 an verschiedenen Lysinen unterstützen und hemmen. So kann eine Genaktivierung durch Kooperation von pH3^{S10} und acH3^{K14} erfolgen, wobei gleichzeitig die Acetylierung und Methylierung an K9 gehemmt werden um die aktive Transkription zu unterstützen (Cohen et al., 2011).

1.4.1.4 Histonvarianten

Doch auch beim Einbau von Histonvarianten spielt die Phosphorylierung eine Rolle. Die bekannteste Variante des Histons H2A ist H2A.X. Es hat eine besondere Funktion in der DNA-Schadens-Kontrolle inne und wird bei Schaden ATM/ATR-abhängig an Serin 139 phosphoryliert. (p)γH2A.X interagiert direkt mit einem *Chromatin-Remodeling Complex*, um die Akkumulation von Proteinen zu veranlassen, die in Schadenskontrollpunkten, der DNA-Reparatur und im Chromatinumbau tätig sind (Costelloe et al., 2006; Wang et al., 2007b). Im Anschluss daran wird das Schadenssignal dann an Effektorkinasen wie Chk1/2 weitergeleitet. Die funktionelle Bedeutung von γH2A.X für das Überleben der Zelle, besonders infolge von DSB und/oder oxidativem Stress steht mittlerweile außer Frage (Revet et al., 2011).

1.4.2 ATP-abhängiger Chromatinumbau

Der ATP-abhängige Chromatinumbau erfolgt durch Multi-Protein-Komplexe und führt zu einer Lockerung des DNA-Histon-Kontaktes und ermöglicht so die Bindung von Transkriptionsfaktoren. Damit werden die Regelung der Transkription, die DNA-Schadensantwort, die DNA-Replikation und weitere Prozesse ermöglicht. Auch der Austausch von Histonvarianten kann ATP-abhängig sein und dient außerdem der Aufrechterhaltung der Chromatinstruktur. Die Dysregulation einer dieser Prozesse kann somit zu neoplastischer Transformation und Tumorgenese beitragen (Wang et al., 2007b)

1.4.3 DNA-Methylierung

Nicht nur Histonmodifikationen sondern auch Veränderungen an der DNA selbst können das Stilllegen von Genen durch Chromatinumbau nach sich ziehen (Hake et al., 2004). Die wichtigste und gut untersuchte Modifikation ist die DNA-Methylierung in den CpG-Inseln (Cytosin-phosphatidyl-Guanin) (Wang et al., 2007a). Durch DNA-Methyltransferasen (DNMT) werden Cytidin-Basen der DNA methyliert. Das hat die Verdichtung der Nukleosomen zur Folge und die Inaktivierung darunterliegender Gene, die so für die DNA-Polymerase nicht zugänglich sind. Des Weiteren sind methylierte Cytidine anfällig für Desaminierung was zu Punktmutationen führen kann und Mutationen in Protoonkogenen begünstigt. In neoplastischem Gewebe kommt es häufig zu Hypermethylation, seltener Hypomethylation in Promotor-assoziierten CpG-Inseln (CIMP) oder zu globaler DNA-Hypomethylation. So ist im Besonderen bei 85 % der kolorektalen Karzinome eine Hypermethylierung der Promotoren von DNA-*Mismatch*-Reparatur-Proteinen wie MLH1 oder MGMT bekannt, was die Begünstigung von Längenverschiebungen in Mikrosatelliten und somit MSI oder Basenfehlpaarungen nach sich zieht und die Adenom-Karzinom-Sequenz voran treibt (Cunningham et al., 1998; Baylin und Jones, 2011; Li et al., 2013). Außerdem ist sonst hochmethyliertes Heterochromatin (vor allem die Zentromer-Region) in Tumorzellen geringer methyliert (Jeltsch, 2002). Wird methylierte DNA erkannt, kommt es zur Assoziation mit großen Proteinkomplexen, die u. A. HDACs oder HMTs enthalten. Die resultierende Deacetylierung oder Methylierung führt zur Repression betroffener Gene (Hake et al., 2004). Besonders häufig in der Karzinogenese sind Tumorsuppressorgene auf diese Weise inaktiviert. So ist das Gen des Zellzyklusregulators p53 in mehr als 50 % aller menschlichen Tumoren hypermethyliert und damit inaktiviert. Auch in der kolorektalen Karzinogenese ist die Inaktivierung des p53 ein frühes Ereignis (siehe kolorektale Karzinome, 1.1.2).

1.5 Zelluläres Modell der Colitis Ulcerosa

Die Grundlage für die Forschungsergebnisse der vorliegenden Arbeit bildete ein von Dr. A. Pöhlmann entwickeltes zelluläres *in vitro* Modell der Colitis Ulcerosa (Poehlmann et al., 2013b). Dies basiert auf den von Blum *et al.* und dem Nestlé Research Center Lausanne gezüchteten, humanen Dickdarmepithelzellen (*Human colonic epithelial cells*, HCEC) (Blum et al., 2001), deren Eignung als Modell für karzinogen-induzierte maligne Transformationen durch Herbst *et al.* beschrieben wurde (Herbst et al., 2006). HCEC exprimieren die Colon-spezifische Dipeptidylpeptidase IV und Epithel-spezifische Zytokeratine und weisen keine Mutationen in den Genen *p53*, *APC* oder dem als kolorektalen Tumormarker genutzten *CEA* auf (Poehlmann et al., 2013a). Aus den HCEC wurden in Anlehnung an die *in vivo* Situation mit einer pathophysiologischen Konzentration von 200 μ M H₂O₂ (Poehlmann et al., 2013b) zehn Zelllinien gezüchtet: Z1-Z10, nachfolgend als Z-Zellkulturen bezeichnet. Die akute Entzündungs-situation des

Darmepithels wurde, wie (**Abb. 8**) dargestellt, durch einmalige H_2O_2 -Behandlung der HCEC simuliert. Das Nachstellen der chronischen Entzündungssituation erfolgte durch wiederholte Behandlung, einmal (Z1) bis zehnmal (Z10), mit intermittierenden Regenerationsphasen (Poehlmann et al., 2013b).

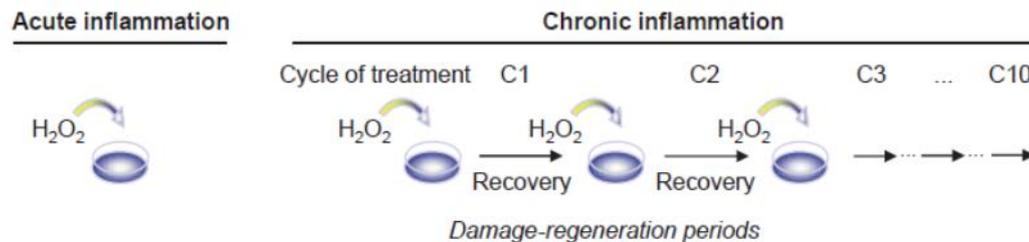


Abb. 8: Studiendesign zum in vitro Modell der Colitis Ulcerosa; aus Pöhlmann 2013b (Poehlmann et al., 2013b).

Bereits nach drei Behandlungszyklen konnten von Pöhlmann *et al.* mehrere Zeichen einer malignen Transformation ausgemacht werden. So hatten die Z-Zellkulturen ihre Zell-Zell-Kontakthemmung verloren und begannen Zellherde (Foci) und in Form der Z10-Zellen auch Kolonien in Softagar zu bilden. Weiterhin wurden eine verminderte Filopodien-Bildung und vor allem eine erhöhte Proliferationsrate mit zunehmender Anzahl an Behandlungen als Folge einer überwundenen Seneszenz beobachtet. Es wurde außerdem gezeigt, dass die exogene H_2O_2 -Behandlung intrazellulär erhöhte ROS-Level bedingt und eine verminderte ROS-Ausschüttung nach sich zieht. (Poehlmann et al., 2013a; Poehlmann et al., 2013b). Um die der Transformation zugrunde liegenden molekularen Mechanismen untersuchen und aufklären zu können, wurden zunächst für die kolorektale Karzinogenese bekannte, genetische und epigenetische Veränderungen untersucht. Mutationen in den *hotspots* des *p53*, *APC*, *β -Catenin* und im *k-ras* Gen wurden ausgeschlossen. Weiterhin zeigte sich kein Anhalt für eine Promotorhypermethylierung des DNA-*Mismatch*-Reparatur-Proteins MGMT oder MSI (Poehlmann et al., 2013b) (Poehlmann, A. *unpublished data*). Erste Untersuchungen der beteiligten Signalwege zeigten eine dysregulierte DNA-Schadensantwort, die Überexpression onkogener Transkriptionsfaktoren und G1-Phase-Zellzyklusregulatoren. Apoptoseresistenz trotz Akkumulation von DNA-Schäden, eine erhöhte Transkription und die Kontrollpunktadaptation begünstigten weiterhin die maligne Transformation der Zellen (Poehlmann et al., 2013b).

1.6 Zielsetzung

Das Risiko einer malignen Entartung infolge der Colitis Ulcerosa ist mit fortschreitender Erkrankungsdauer stark erhöht. Durch die aberrante exzessive Immunantwort kommt es zu oxidativem Stress. Die Bedeutung dessen für die Tumorpromotion, -progression und Metastasierung ist mittlerweile unumstritten. Allerdings ist bisher unklar, ob die Entzündung allein zur Tumorinitiation genügt. Anhand eines etablierten zellulären Modells der Colitis Ulcerosa wurden bereits Veränderungen in der Signaltransduktion infolge von oxidativen Stress festgestellt. Da bekannte genetische Alterationen für dieses Modell ausgeschlossen wurden, sollten zugrundeliegende molekulare und epigenetische Mechanismen der DNA-Schadensantwort aufgeklärt werden. Ein besonderer Focus lag dabei auf Chk1, einem Protein mit multiplen Bedeutungen in der DNA-Schadensantwort und dem ungestörtem Zellzyklus sowie in der Chromatinmodulation. Daher sollten die Rolle von Chk1 in der Signaltransduktion der DNA-Schadensantwort und eine mögliche Funktion in der epigenetischen Chromatinmodulation nach oxidativem Stress untersucht werden.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

2.1.1 Geräte/Labormaterialien

Tab. 1: Herstellernachweis verwendeter Geräte

Gerät	Hersteller
Agarosegelkammer	Bio Rad Laboratories GmbH, München
Bio Photometer	Eppendorf AG, Hamburg
Blotting Chamber Mini Protean II	Bio Rad Laboratories GmbH, München
COUNTESS™ <i>automated cell counter</i>	Invitrogen/Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA
Deckgläschen	Lagerartikel
Einfrierröhrchen	Greiner-Bio-One, Frickenhausen
Einmalskalpelle	Lagerartikel
FACS DIVA	Becton Dickinson, New Jersey, USA
GeneGnome	Syngene Bio Imaging, Cambridge, UK
Handschuhe	MaiMed, Neuenkirchen
Multifuge B-SR	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Multilabel Counter 1420	Perkin Elmer Wallac
Objektträger <i>SuperFrost Plus</i>	Thermo Scientific, München
PCR DNA Engine	Bio Rad Laboratories GmbH, München
Petrischalen	Greiner, Solingen
Pinzetten	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Pipetten	Eppendorf AG, Hamburg
Reaktionsgefäße (0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Reaktionsröhrchen (15 ml, 50 ml)	Greiner, Solingen
Rotoshake Genic	Scientific Ind., New York, USA
Thermomixer comfort	Eppendorf AG, Hamburg
Tischzentrifuge <i>Biofuge pico</i>	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Vakuumentrifuge Speedvac	Eppendorf AG, Hamburg
Variomag Electronic Rührer	Monotherm, Hanau
Vortex reaxtop	Heidolph, Schwabach
Waage	Satorius, Göttingen
Wärmeschrank	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Waterbath heater PTC	MJ Research Inc., St. Bruno, Canada
Zentrifuge 5403	Eppendorf AG, Hamburg

Sonstige Labormaterialien

Glaswaren und sonstige Laborgefäße wurden von folgenden Firmen bezogen:

Falcon, Heidelberg

Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe

VWR International LLC, Hamburg

Neolab, Heidelberg

Chemikalien

Die für diese Arbeit verwendeten allgemeinen Labor-Chemikalien waren von handelsüblicher Reinheit und wurden, sofern nicht anders angegeben, bei den folgenden Firmen bezogen:

Biochrom KG über MERCK KGaA, Darmstadt

Merck KGaA, Darmstadt

Promega GmbH, Mannheim

Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe

Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen

Invitrogen über Invitrogen/Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA

PAA Laboratories GmbH, Parsching

PAN-Biotech GmbH, Aidenbach

Roche Diagnostics, Grenzach-Wyhlen

Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen

VWR International LLC, Hamburg

Fertigprodukte/ Chemikalien/gebrauchsfertige Stoffe/ Verbrauchsmaterial**Tab. 2: Herstellernachweis verwendeter Stoffe**

Stoff	Hersteller
Acrylamid	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Agarose	Invitrogen/Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA
APS	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
Ascorbinsäure	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Bisacrylamid	Bio Rad Laboratories GmbH, München
<i>bovine serum albumin</i> (BSA)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
CHES	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Chloroform	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
Collagen Typ IV	Becton Dickinson, New Jersey, USA
DC-Protein Assay	Bio Rad Laboratories GmbH, München
Dexamethason	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
Dimethylsulfoxid (DMSO)	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach
DMSO	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
DTT	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
EDTA	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
Ethanol 96 %	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Ethidiumbromid	MERCK KGaA, Darmstadt
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
FCS	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach oder PAA, Parsching
Formalin 4 %	MERCK KGaA, Darmstadt
Glutamin	PAA, Velizy-Villacoublay, France
Glycerin	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate	Millipore/MERCK KGaA, Darmstadt
Isopropanol 100 %	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Isotonische Lösung Cell Counter	Perkin Elmer Wallac
Kaliumchlorid	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
LB-Medium	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
L-Glutamin	PAA, Parsching
Methanol	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Milchpulver	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Paraffin	Invitrogen/Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA

Fortsetzung Tab. 2	
Stoff	Hersteller
PBS	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Penicillin/Streptomycin	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
<i>Phosphate buffered saline (PBS)</i>	Invitrogen/Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA
Pituetary bovin extrakt	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim und Cell Applications, San Diego, USA
PMSF	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Ponceau S	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
Protease-Inhibitor-Cocktail Set III	Millipore/MERCK KGaA, Darmstadt
Restore Western Blot Stripping Buffer	Pierce/Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA
Retinolsäure	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
RNase	Roche Diagnostics, Grenzach-Wyhlen
SDS	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Silbernitrat	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
TEMED	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Tris Base	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Trizol	Invitrogen/Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA
Trypanblau	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
Trypsin-EDTA	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach
Tween 20	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
β -Mercaptoethanol	Sigma Aldrich, Deisenhofen

2.1.2 Puffer/ Lösungen

Tab. 3: Pufferrezepturen

Puffer	Zusammensetzung
PBS (1x)	137 mM NaCl 2,6 mM KCl 10 mM Na ₂ HPO ₄ 1,8 mM KH ₂ PO ₄ in Aqua bidest, pH 7,4
TBS (1x)	1 M Tris 5 M NaCl in Aqua bidest, pH 8,0
TAE (10x)	0,4 M Tris 0,01 M EDTA Aqua bidest, pH 8,5
Kristallviolett	0,5 g Kristallviolett 20 ml Methanol 100 % 80 ml Aqua dest.
Protein-Lysispuffer	4 M Urea 62,5 mM Tris, pH 6,8 0,5 % SDS 1 Spatelspitze Bromphenolblau Kurz vor Gebrauch: 1:100 Protease-Inhibitoren-Cocktail Set III 1 mM PMSF
Sammelgelpuffer	1,875 M Tris-Base 0,5 % SDS pH 6,8 in Aqua dest.
Trenngelpuffer	1,875 M Tris-Base 1 % SDS pH 8,8 in Aqua dest.
Laufpuffer SDS-PAGE (10x)	0,25 M Tris-Base 1,92 M Glycin 1 % SDS In Aqua dest.
Laufpuffer SDS-PAGE (1x)	Verdünnung 1:10 in Aqua dest

Fortsetzung Tab. 3

Puffer	Zusammensetzung
Proben-Ladepuffer (5x)	4 M Urea 62,5 mM Tris, pH 6,8 10 % SDS 20 % DTT 1 Spatelspitze Bromphenolblau In Aqua dest.
Proben-Ladepuffer (2x)	4 M Urea 62,5 mM Tris, pH 6,8 2 % SDS 1 Spatelspitze Bromphenolblau In Aqua dest.
Transferpuffer (10x)	0,25 M Tris-Base 1,92 M Glycin In Aqua dest.
Transferpuffer (1x)	1:10 verdünnen Frisch 16 % Methanol zugeben
Ponceau-S-Lösung	50 ml 3%ige Essigsäure 300 µl Ponceau
Waschpuffer (TBST)	TBS (1x) 0,1 % Tween 20 1 M Tris-Base pH 8 5 M NaCl
Blockingpuffer (5 %)	TBST 5 % Magermilchpulver oder 5 % BSA
Lösungen	Zusammensetzung
Propidiumiodid Lösung	50ml 1xPBS 7,5mg PI-Pulver (= 50µg/ml) 50mg NaCitrat 50µl Triton-X 100

2.1.3 Gele

Tab. 4: Gelrezepturen

Gel	Zusammensetzung	
Trenngel SDS-PAGE 12,5 %	Aqua bidest	3,73 ml
	30 % Acrylamid	4,16 ml
	Trenngelpuffer	2,0 ml
	10 % APS	100 µl
	TEMED	<u>10 µl</u>
		Σ10 ml
Trenngel SDS-PAGE 12,5 %	Aqua bidest	5,23 ml
	30 % Acrylamid	2,65 ml
	Trenngelpuffer	2,0 ml
	10 % APS	100 µl
	TEMED	10 µl
		Σ10 ml
Sammelgel SDS-PAGE 5 %	Aqua bidest	2,27 ml
	30 % Acrylamid	0,5 ml
	Sammelgelpuffer	0,2 ml
	10 % APS	30 µl
	TEMED	<u>3 µl</u>
		Σ10 ml
Agarosegel 0,8 – 1 %	Agarose	0,8 – 1 g
	TAE (1x)	100 ml
Polyacrylamidgel, horizontal 6 %	Aqua bidest	20,1 ml
	30 % Acryl-PDA	9,2 ml
	500 mM Tris-P.	6,6 ml
	CHES	4,1 ml
	10 % APS	360 µl
	TEMED	18,6 µl

2.1.4 AK, Marker, Standards, Kits, siRNA

Tab. 5: Herstellernachweis verwendeter Antikörper

Antikörper	Katalog-Nr.	Hersteller
acH3	#06-599	Upstate
acH4	#06-866	Upstate
β -Aktin	A5441	Sigma
APC	#2504	Cell Signaling
ATF2	Sc-187	Santa Cruz
ATF2	#9226	Cell Signalling
ATM	#2873	Cell Signaling
Bcl2	#2872	Cell Signalling
Casp 3	#9662	Cell Signaling
Casp 8	#9746	Cell Signaling
Casp 9	#9502	Cell Signaling
β -Catenin	C2206	Sigma
cdc 25c	DM339-05	Acris
cdc2 /CDK1	#9112	Cell Signalling
CDK2	#2546	Cell Signalling
CDK6	SM1568P	Acris
c-Fos	#2250	Cell Signalling
c-Fos	8047	Santa Cruz
Chk1	Sc-8408	Santa Cruz
c-Jun	#9260	Cell Signaling
c-Myc	Ab9326-100	Abcam
Cyclin B1	117312	Novocastra
Cyclin D1	#2926	Cell Signaling
Dnmt 1	1234	Imgenex
DR4	SP62458	Acris
GAPDH	Sc-166545	Santa Cruz
H1	Sc-8030	Santa Cruz
H2AX	#07-327	Upstate
H3	#9715	Cell Signaling
HDAC1	Sc-7872	Santa Cruz
HSP90	# 4875	Cell Signalling
JNK/SAPK	#9926	Cell Signaling
Lamin B1	33-2000	Invitrogen
MGMT	04-10-6679	EnergoEurope
Nucleolin/ C23	Sc-17826	Santa Cruz

Fortsetzung Tab. 5

Antikörper	Katalog-Nr.	Hersteller
ORC2	Sc-13238	Santa Cruz
pH2A.X Ser139 (yH2A.X)	#05-636	Millipore/ Upstate
p21 ^{WAF1}	Sc-397	Santa Cruz
P300/CBP	DM374P	Upstate
p53	OP43	Calbiochem
pATF	#9221S	Cell Signalling
PCAF	#3378S	Cell Signalling
pChk1 Ser317	NB100-275	Novus
pChk1 Ser280	#2347	Cell signalling
pChk1 Ser296	#2349	Cell signalling
pChk1 ser345	#2341	Cell signalling
pChk1 Ser317	#2344	Cell signalling
pc-Jun Ser63	#9260	Cell Signaling
pc-Jun Ser73	#9260	Santa Cruz
PCNA	IM1510	Immunotech
pH3 Thr11	#9764	Cell Signaling
pJNK/SAPK	#4668	Cell Signaling
pP38	#9910	Cell Signalling
pSTAT3	#9138S	Cell Signalling
SP1	Sc-59	Santa Cruz
STAT3	#9139	Cell Signalling
TCF4	Sc-13027	Santa Cruz
Ubiquitin	#6584	Cell Signaling
Vimentin	Sc-6260	Santa Cruz

Tab. 6: Herstellernachweis verwendeter Reagenzien

Reagenzien	Katalog-Nr.	Hersteller
Fluoreszenz-Antikörper		
Alexa Fluor 488 Phalloidin	A12379	Invitrogen
siRNA Reagenzien		
Chk1 siRNA	sc-29269	Santa Cruz
Control siRNA A	sc-37007	Santa Cruz
Transfektionsreagenz	sc-29528	Santa Cruz
Transfektionsmedium	sc-36868	Santa Cruz
Inhibitoren		
JNK-Inhibitor SP600125	EI-305	ENZO

Tab. 7: Herstellernachweis verwendeter Marker

Standards/Marker	
Marker PCR	VWR
Marker/Protein-Leiter, biotinyliert	Cell-Signaling

Tab. 8: Herstellernachweis verwendeter Kits

Kit	Hersteller
Comet-Assay Kit	Trevigene
BCA Protein Assay Kit	BioRad
Subcellular Fractionation Kit	Thermo Scientific

Tab. 9: Liste der Zellkulturmedien

Medium	Hersteller
RPMI 1640	PAA
HCEC Basalmedium	PAN
Zusätze siehe Methoden	

Tab. 10: Bezugsquellen eingesetzter Zelllinien

Zelllinie	Herkunft
HCEC	Patent DSM ACC2258 Blum et al. zur Verfügung gestellt von Prof. P. Steinberg, Stiftung Tierärztliche Hochschule, Hannover
HCEC Z1-Z10	Dr. A. Pöhlmann, Universität Magdeburg
HCT116	DSZM ACC581, Braunschweig
TE7	Prof. W. El-Rifai, Vanderbilt University Medical Center, Nashville, USA

2.1.5 Software

Zur Auswertung und Analyse der durchgeführten Versuche wurde zusätzlich folgende Software verwendet:

Microsoft Office 2007/2010

Adobe Photoshop™ 10.0

Gene Tools, Syngene

SigmaPlot Software 11.2 (2001)

FACS DIVA Software *CellQuest Pro*, Becton Dickinson

2.2 Methoden

2.2.1 Zellbiologische Methoden/Zellkultur

2.2.1.1 Kultivierung humaner Zelllinien

Die Kultur der verwendeten Zelllinien erfolgte in geeigneten Kulturflaschen oder -schalen im jeweiligen Medium in einem Brutschrank mit Wasserdampf gesättigter Atmosphäre bei 37 °C und 5 % CO₂. Die HCEC-Zellen und die daraus abgeleiteten Zelllinien wurden dem Patent (Blum et al., 2001) entsprechend in Basalmedium, versetzt mit 2 mM L-Glutamin, 100 nM Retinolsäure, 1 nM Dexamethason, 30 µg/ml Ascorbinsäure und 38 mg/ml *Pituetary bovine extract* kultiviert. Die Kulturschalen oder -flaschen wurden zuvor für 20 min mit Kollagen (1:2000) beschichtet. Überschüssiges Kollagen wurde entfernt und das Gefäß einmal mit PBS gewaschen. Die Kultivierung der HCT116-Zellen erfolgte in RPMI-Medium, versetzt mit 10 % FCS und 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin. Zur Kryokonservierung von Zellen in flüssigem Stickstoff wurde das jeweilige Basalmedium mit 15 % DMSO, 20 % FCS und 2 % HEPES-Puffer versetzt.

Bei den adhärennten Kulturen wurde alle zwei bis drei Tage das Medium nach vorsichtigem Waschen mit PBS erneuert und bei einer Konfluenz von 70-85% subkultiviert. Dazu wurde das Medium abgenommen und die Zellen mit PBS gewaschen. Anschließend erfolgte das Benetzen der Kulturen mit Trypsin/EDTA für 3 sec. Und die anschließende Inkubation bei 37°C für 5 min ohne Trypsin/EDTA-Überstand. Die Zellen wurden durch Abspülen mit Medium gelöst und durch Zentrifugation (1000 rpm, 5 min) zur Sedimentation gebracht und anschließend in neuem Medium aufgenommen und nach Bestimmung der Zellzahl (Trypanblau/COUNTESSTM, nach Herstellerangaben) entsprechend weiterkultiviert.

2.2.1.2 H₂O₂-Behandlung

Die Behandlung der HCEC-Zellen und der abgeleiteten Z1-Z10-Zellen mit Wasserstoffperoxid (H₂O₂) erfolgte durch Zugabe des entsprechenden Volumens einer frisch hergestellten Vorverdünnungslösung (30 mM/PBS) direkt zur Zellkultur. Die Endkonzentration an H₂O₂ betrug so immer 200 µM.

2.2.1.3 Behandlung mit JNK-Inhibitor SP600125

Nach Herstellerangaben wurde eine Stammlösung in DMSO von 20 mM hergestellt, aliquotiert und entsprechend gelagert. Die Behandlung der Zellen erfolgte durch Zugabe des entsprechenden Volumens der Stammlösung zum Zellkulturmedium. Die Endkonzentration an SP600125 bzw. dem Lösungsmittel DMSO in den Kontrollen betrug 50 µM.

2.2.1.4 Chk1-knockdown

Nach Herstellerangaben erfolgte die Behandlung der Zellen in Spezialmedium mit einer siRNA-Endkonzentration von 20 nM. Als Kontrollen wurden Transfektionsreagenz in gleichem Volumen und siRNA-Ktr. (siehe 2.1.4) in gleicher Konzentration mitgeführt. Nach 24 h erfolgte die entsprechende Weiterbehandlung (H₂O₂) oder Aufarbeitung der Zellen.

2.2.1.5 Zellzyklusanalyse

Die Zellen wurden mit warmen Reagenzien (37°C, Trypsin/EDTA, Medium, PBS) von den Kulturgefäßen gelöst und in einem Zentrifugationsröhrchen bei 750 rpm, 4°C für 15 min pelletiert und einmal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in PBS aufgenommen und durch tropfenweises Zugeben von 100%igem Ethanol bei einer Endkonzentration von 70% Ethanol auf Eis fixiert und bis zur Färbung bei -20°C gelagert.

Für die Analyse am FACS (*Fluorescence-activated cell sorting*) wurden die Zellen durch erneute Zentrifugation sedimentiert, der ethanolhaltige Überstand abgenommen und die Zellen einmal mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden in PBS resuspendiert und mit 100 µg/ml RNase für 10 min bei 37°C inkubiert. Die Färbung mit Propidiumiodid in einer Endkonzentration von 150 µg/ml erfolgte durch Zugabe der entsprechenden Menge an Stammlösung (50µg/ml) bei RT für 20 min. Bis zur anschließenden Analyse (FACS DIVA) wurden die Zellen auf Eis gelagert.

2.2.1.6 Fraktionierung von Zellen

Analog der Zellzyklusanalyse wurden auch hier die Trockenpellets von 3x10⁶ Zellen gesammelt und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C gelagert. Die Extraktion von chromatingebundenen, nukleären und zytoplasmatischen Proteinen sowie von Membranproteinen aus Zellen erfolgte durch subzelluläre Fraktionierung mittels des *Subcellular Protein Fractionation Kits* entsprechend der Herstellerangaben. Die Extrakte wurden bei -80°C bis zur Verwendung für die Western-Blot-Analyse gelagert. Nach der Proteinbestimmung durch die Lowry-Methode erfolgte der Einsatz gleicher Proteinmengen in der Gelelektrophorese.

2.2.2 Proteinbiochemische Methoden

2.2.2.1 Gewinnung von Proteinextrakten

Zur Gewinnung von Proteinextrakten wurden die Zellen vom Kulturgefäß geschabt und mit vorgekühltem PBS durch Zentrifugation (4000 g, 15 min, 4 °C) pelletiert. Nach dem Waschen mit PBS wurde das Pellet in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend als Trockenpellet bei -80 °C gelagert.

Die Lyse der Zellen erfolgte auf Eis in denaturierendem Protein-Lysispuffer (50–500 µl) für eine Stunde unter gelegentlichem Vortexen. Anschließend erfolgten die Behandlung mit 15–30 Ultraschallimpulsen (30% Power) und ein Schockfrost in Stickstoff bei -80 °C.

2.2.2.2 Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Bestimmung des Proteingehalts der Lysate erfolgte in Doppelbestimmung mittels *Dc Protein Assay* nach der Methode von Lowry entsprechend den Herstellerangaben.

2.2.2.3 Probenvorbereitung für die SDS-PAGE

Standardmäßig wurden 15–30 µg Protein pro Geltasche geladen. Dazu wurden zum Lysat ein Fünftel des entsprechenden Volumens in Form von 5 x Proben-Ladepuffer hinzugegeben und mit 2 x Proben-Ladepuffer auf ein einheitliches Volumen (i. d. R. 30 µl) aufgefüllt. Die Proben wurden gevortext, abzentrifugiert und nach der Denaturierung (5 min, 95 °C) sofort auf Eis gestellt und auf das Gel geladen. Zur Identifikation der Banden wurde ein biotinylierter Molekulargewichtsmarker mitgeführt, der zuvor ebenfalls denaturiert wurde (2 min, 99 °C).

2.2.2.4 SDS-Gelelektrophorese

Beim verwendeten diskontinuierlichen Lämmli-System mit Tris-Glycin-Puffern wurde jeweils ein Trenngel (8-12,5 % Bisacrylamid) und Sammelgel (5 % Bisacrylamid) nach Empfehlungen von Carl Roth GmbH & Co mit einer Dicke von 1–1,5 mm hergestellt. Nach dem Auftragen der Proben und Marker erfolgte die Elektrophorese im Laufpuffer bei 30 mA, bzw. 50 mA.

2.2.2.5 Proteintransfer durch Western Blot

Das Gel wurde im Sandwich-Verfahren über Nacht bei 30 V auf eine Nitrocellulose-Membran (0,45 µm) geblottet. Durch Färbung in Ponceau-S-Lösung wurde der erfolgreiche Transfer der Proteine überprüft.

2.2.2.6 Immunodetektion

Unspezifische Bindestellen der Membran wurden zunächst mit Blockingpuffer unter Schwenken blockiert (2 h, RT). Nach standardmäßigem Waschen wurde die Membran zur Immunodetektion der Antigene bzw. des Phosphorylierungsgrades mit einer geeigneten Verdünnung des Primärantikörpers in TBST ü. N. bei 4 °C unter Schwenken inkubiert. Nach erneutem Waschen wurden ebenfalls unter Schwenken für eine Stunde (RT) ein HRP-gekoppelter Sekundärantikörper und ein Anti-Biotin-Konjugat in TBST zugegeben. Die Visualisierung erfolgte mittels *Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate*

im *GeneGnom*. Wurde die Membran zur weiteren Detektion verwendet, wurden die Antikörper mit *Stripping Buffer* (10 min, RT oder 42 °C) entfernt. Anschließend konnte die Membran mit einem neuen Primärantikörper inkubiert werden.

2.2.3 Datenauswertung / Statistik

Für die Western Blot Analysen erfolgte die Auswertung der ermittelten Signale mit Hilfe der Gene Tools Software von Syngene (2.1.5). Der ermittelte Chemilumineszenzwert des jeweiligen Proteinsignals wurde gegen den entsprechenden Wert des *house keepers* (β -Aktin) bzw. der Ladekontrolle (Ponceau S) normiert. Anschließend wurden diese normierten, absoluten Werte für jedes Protein gegen die mitgeführte dazugehörige Kontrolle kalkuliert [Formel: Wert behandelte Probe/Wert unbehandelte Kontrolle]. Das resultierende Xfache der Kontrolle bei K=1.0 wurde für mindestens drei unabhängig durchgeführte Versuche ermittelt. Für die deskriptive statistische Aufarbeitung der Daten und die graphische Darstellung in Balkendiagrammen mittels Microsoft Excel Software (2.1.5) wurden die Werte der unabhängigen Versuche (Xfache) gemittelt. Die Graphiken zeigen daher die Mittelwerte des Xfachen \pm der entsprechenden Standardabweichungen.

Alle Daten wurden mittels Shapiro-Wilk-Test zunächst auf Normalverteilung geprüft. Bei den normal-verteilten Daten wurde anschließend zur Berechnung der Signifikanzwerte (p) ein Students *t*-Test durchgeführt, bei nicht-normalverteilten Daten fand der Mann-Whitney-U-Test Anwendung. Nach der automatisch mitgeführten Varianzanalyse erfolgte bei unterschiedlichen Varianzen ebenfalls die Bestimmung des p-Wertes mittels Mann-Whitney-U-Test. Aufgrund des z. T. kleinen Stichprobenumfangs von n=3 sind die Aussagen als explorative Analysen zu verstehen.

Die Berechnungen der Signifikanzwerte erfolgten mittels SigmaPlot Software (2.1.5). Dabei wurde ein Signifikanzwert von $p \leq 0,05$ als signifikant (* $p < 0,05$); $p \leq 0,01$ als hochsignifikant (** $p < 0,01$) bzw. $p \leq 0,001$ als höchstsignifikant (***) $p < 0,001$) angenommen und entsprechend gekennzeichnet. Der Anhang A enthält neben den Datensätzen zu den jeweiligen Abbildungen auch die berechneten p Werte eines jeden Mittelwertes.

3 ERGEBNISSE

3.1 Rolle von Chk1 im Modell der akuten Entzündung

Wie aus der Zusammenfassung der bereits für das zelluläre *in vitro* Modell der Colitis Ulcerosa publizierten Daten in 1.5 hervorgeht, löste die Behandlung mit H₂O₂ in HCEC die Aktivierung der DNA-Schadenskontrolle aus, die sich als pJNK-abhängig erwies und durch Hochregulation des Zellzyklusregulators p21^{WAF1} und des Schadensensors γ H2A.X zustande kam. Auch die in HCEC nach H₂O₂-Behandlung induzierten S- und G2/M-Zellzyklusarreste zeigten sich als z. T. JNK-abhängig. Der G2/M-Arrest konnte allerdings nicht langfristig (72 h) aufrechterhalten werden, sodass die Zellen aus diesem Arrest in den Zelltod übergingen.

Aufgrund einer essentiellen Bedeutung von Chk1 im Zellzyklus, im Besonderen im G2/M-Arrest und in der DNA-Schadensantwort sowie einer postulierten parallelen Induktion des JNK- und des Chk1/2-Signalweges (Wang et al., 2009b) erfolgte die Untersuchung einer potentiellen Rolle von Chk1 im zellulären Modell der Colitis Ulcerosa.

3.1.1 Akuter Stressreiz durch H₂O₂ führt zur Herunterregulation und Aktivierung von Chk1 in HCEC

Zur Nachahmung der akuten Entzündungssituation wurden HCEC mit H₂O₂ behandelt und anschließend die Proteinexpression von Chk1 und dessen aktivierter Form, pChk1^{S317/S345}, untersucht.

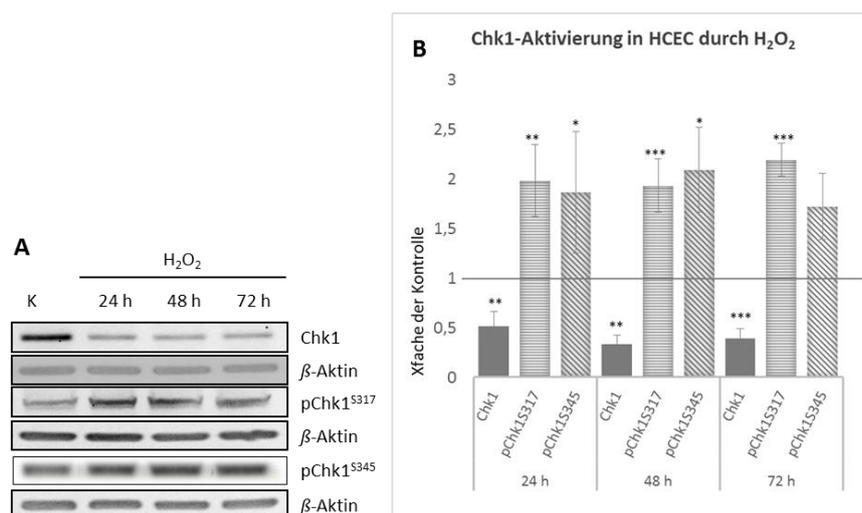


Abb. 9: Akuter Stressreiz durch H₂O₂ führt zur Herunterregulation und Aktivierung von Chk1 in HCEC. (A) Western Blot-Analysen von HCEC 24 h, 48 h und 72 h nach H₂O₂-Behandlung. Proteinlevel im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (K) und zum *housekeeping*-Gen β -Aktin. **(B)** Vergleich der mittleren Chk1-, pChk1^{S317}-, pChk1^{S345}-Level. Veränderung (Xfache) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (K=1.0). Mittelwerte von drei bis fünf unabhängigen Versuchen mit Standardabweichung. * p<0,05; **p<0,01; *** p<0,001.

Akuter H₂O₂-Reiz führte in HCEC zur Aktivierung von Chk1 durch Phosphorylierung an S317 und S345 24 h, 48 h und 72 h nach der Behandlung (**Abb. 9A**). Wie das Diagramm in **Abb. 9B** zeigt, sank die Menge an Chk1-Gesamtprotein zu allen drei Zeitpunkten hochsignifikant auf unter 50 % im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Die Aktivierung durch Phosphorylierung an S317 (hoch- und höchstsignifikant) und S345 (z. T. signifikant) blieb zu allen untersuchten Zeitpunkten konstant hoch, über dem 1,75fachen der Kontrolle.

Da Chk1 nach Reiz in HCEC aktiviert vorlag, die Schadensantwort und resultierende Zellzyklusarreste jedoch bisher als JNK-abhängig gefunden wurden und die Aufrechterhaltung des G2/M-Arrestes problematisch schien, erfolgte die Untersuchung eines möglichen Einflusses von Chk1 auf den JNK-Signalweg und *vice versa*.

3.1.2 Chk1 supprimiert die pJNK-abhängige DNA-Schadensantwort in HCEC nach akutem Stressreiz

Die aktivierte Variante von Chk1 war deutlich hochreguliert (**Abb. 9B**), gleichzeitig besitzt Chk1 aber auch eine Kinase-unabhängige Funktion (Chen et al., 2009). Daher wurde ein Chk1-*knockdown* durchgeführt und anschließend die Proteinlevel des JNK-Signalweges und die Zellzyklusverteilung untersucht.

Die Western Blot-Analysen der 24 h-Proben zeigten einen effektiven Chk1-*knockdown* in HCEC nach H₂O₂-Behandlung (**Abb. 10A**). Die Analyse der Proteinmengen nach Chk1-siRNA-Behandlung (**Abb. 10B**) ergab einen durchschnittlichen, signifikanten *knockdown* von ca. 50 % im Vergleich zur siRNA-Kontrolle, wodurch auch der Level von pChk1^{S317} signifikant auf 75 % reduziert wurde. Der Chk1-*knockdown* führte zu einer deutlichen Hochregulation der Proteine pJNK (p46 und p54) und γ H2A.X auf das mehr als 1,5fache. Auch JNK p54 (1,2fach), pc-Jun^{S63} (1,4fach), c-Jun (1,3fach), sowie p21^{WAF1} (1,5fach) und H2A.X (1,2fach) wurden signifikant hochreguliert bzw. stärker aktiviert. Lediglich der Proteinlevel von JNK p46 zeigte keine Änderung. Diese Daten zeigen, dass eine zusätzliche Reduktion des Chk1-Levels von 50 % auf 25 % oder aber die Verminderung des zuvor erhöhten pChk1-Levels zu einer Induktion des pJNK-Signalwegs nach akuter H₂O₂-Behandlung führen würde. Für die 48 h- und 72 h-Werte nach H₂O₂-Behandlung und Chk1-*knockdown* (**Abb. 10**) zeigten sich ebenfalls eine Reduktion des Chk1- und pChk1-Levels, minimal bis keine Effekte für JNK p54 und p46. Die Phosphorylierung von JNK an p54 war rückläufig, die für p46 blieb signifikant hoch. Die Phosphorylierung von c-Jun blieb nach 48 h trotz nicht mehr erhöhtem c-Jun-Level signifikant erhöht, sank aber nach 72 h wieder auf das Niveau der Kontrolle ab. Die Level der Schadensmarker γ H2A.X und p21^{WAF1} waren ebenfalls stark rückläufig. H2A.X blieb leicht erhöht.

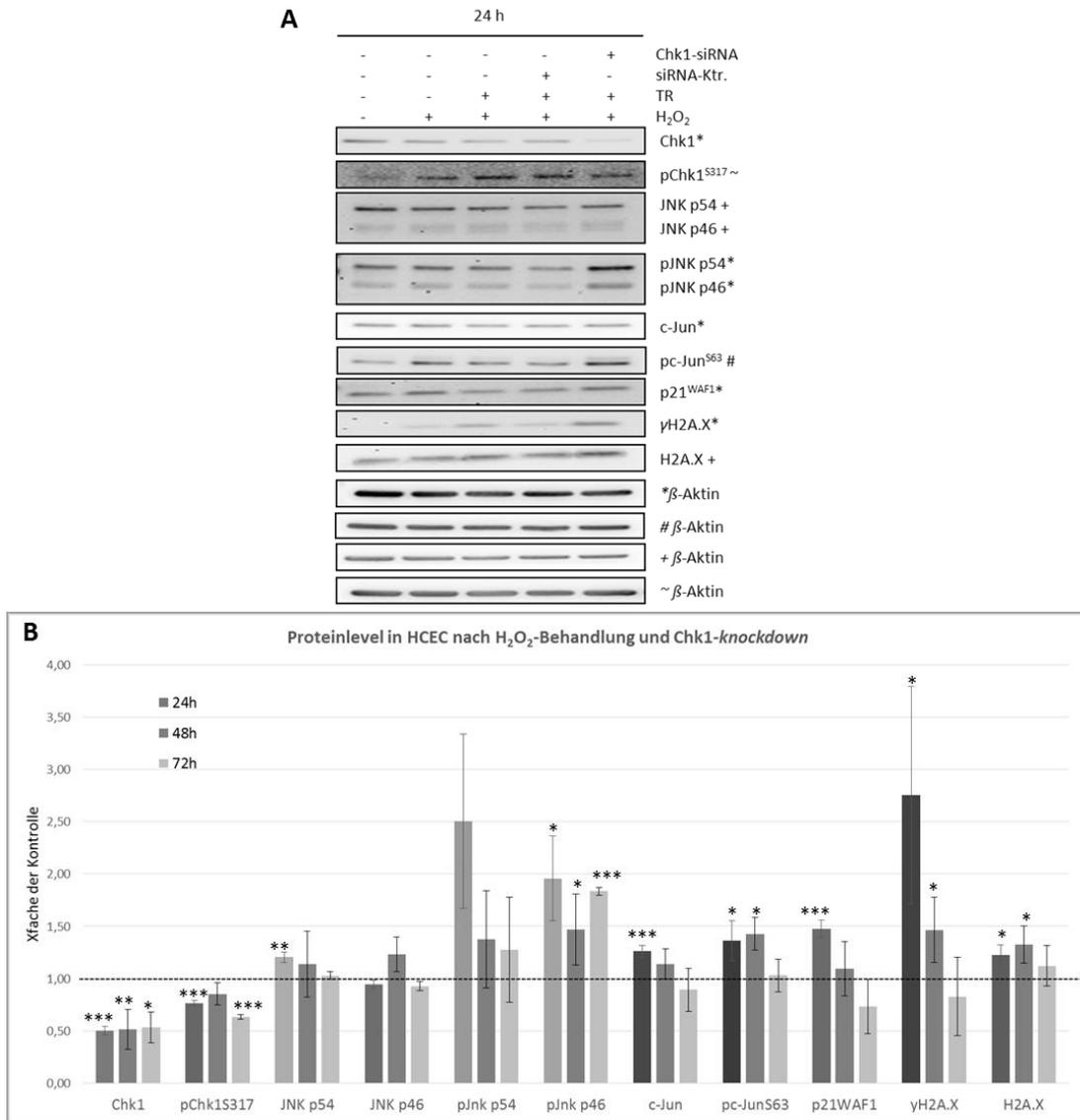


Abb. 10: Chk1 supprimiert die pJNK-abhängige DNA-Schadensantwort in HCEC. (A) Western Blot-Analysen von HCEC nach Chk1-siRNA- und 24h nach H₂O₂-Behandlung. Proteinlevel im Vergleich zur siRNA-Kontrolle und zum *housekeeping*-Gen β -Aktin. TR, Transfektionsreagenz. **(B)** Veränderung (Xfache) der Proteinlevel nach Chk1-siRNA- und 24 h, 48 h und 72 h nach H₂O₂-Behandlung im Vergleich zur siRNA-Kontrolle nach H₂O₂-Behandlung (gestrichelte Linie, K=1.0). Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen mit Standardabweichung. * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001.

Um zu überprüfen, ob oben genannte Chk1-Abhängigkeiten auch spezifisch nach Reiz eintreten, wurde eine Chk1-siRNA-Behandlung ohne H₂O₂-Reiz an HCEC durchgeführt und die Expression bzw. der Phosphorylierungsstatus der Proteine analysiert. Wie die **Abb. 11** zeigt, wurden die Proteine nach Chk1-knockdown ohne den entsprechenden Stressreiz nicht verändert exprimiert oder phosphoryliert.

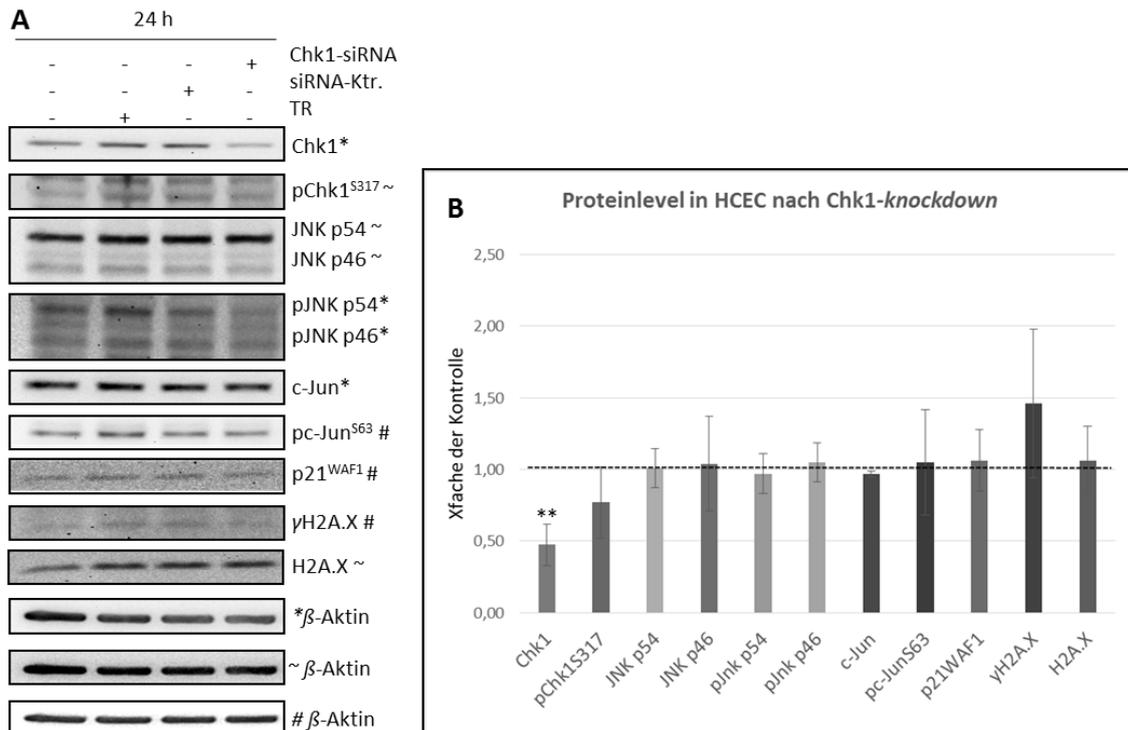


Abb. 11: Chk1-knockdown ohne H₂O₂-Behandlung hat keinen Einfluss auf den JNK-Signalweg in HCEC. (A) Western Blot-Analysen von HCEC nach Chk1-siRNA-Behandlung. Proteinlevel im Vergleich zur siRNA-Kontrolle und zum *housekeeping*-Gen β-Aktin. TR Transfektionsreagenz. **(B)** Veränderung (Xfache) der Proteinlevel nach Chk1-siRNA-Behandlung im Vergleich zur siRNA-Kontrolle (gestrichelte Linie, K=1.0). Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen. ** p<0,01.

3.1.3 Chk1 hat eine untergeordnete Funktion im Zellzyklus in HCEC nach Stressreiz

Als nächstes sollte die Rolle von Chk1/pChk1 in den z.T. pJNK-abhängigen Zellzyklusarresten geklärt werden. Die Analyse der Daten 24 h nach H₂O₂-Behandlung ergab einen S- und G2/M-Arrest 24 h nach Stressreiz (**Abb. 12A**). Nach Chk1-knockdown und H₂O₂-Behandlung ergaben die Mittelwerte dreier unabhängiger Versuche im Vergleich zur siRNA/H₂O₂-Kontrolle eine leicht erhöhte G1-Population aber nahezu gleichviele Zellen in der S-, G2/M- und Sub-G1-Phase (**Abb. 12B**). Da Chk1 den pJNK-Signalweg supprimierte und pJNK einen S- und G2/M-Arrest induzierte, wären nach Chk1-knockdown verstärkte oder aufrechterhaltene S- und G2/M-Arreste zu erwarten gewesen. Und tatsächlich blieben im Mittel 95 % der Zellen der S-Phase und 96 % der G2/M-Phase auch bei verminderter Chk1-Expression und/ oder -Phosphorylierung in diesen Zellzyklusphasen. Die Zellzahl der Sub-G1-Phase war um 8 % leicht vermindert. Es zeigte sich nach Chk1-knockdown aber eine um 19 % erhöhte Zellzahl in G1. Die Aufrechterhaltung der beiden Arreste, S- und G2/M, ist aufgrund der verminderten Chk1-Expression weniger Chk1 sondern vielmehr dem zwar reduzierten, aber dennoch erhöht vorliegenden pChk1 zuzuordnen.

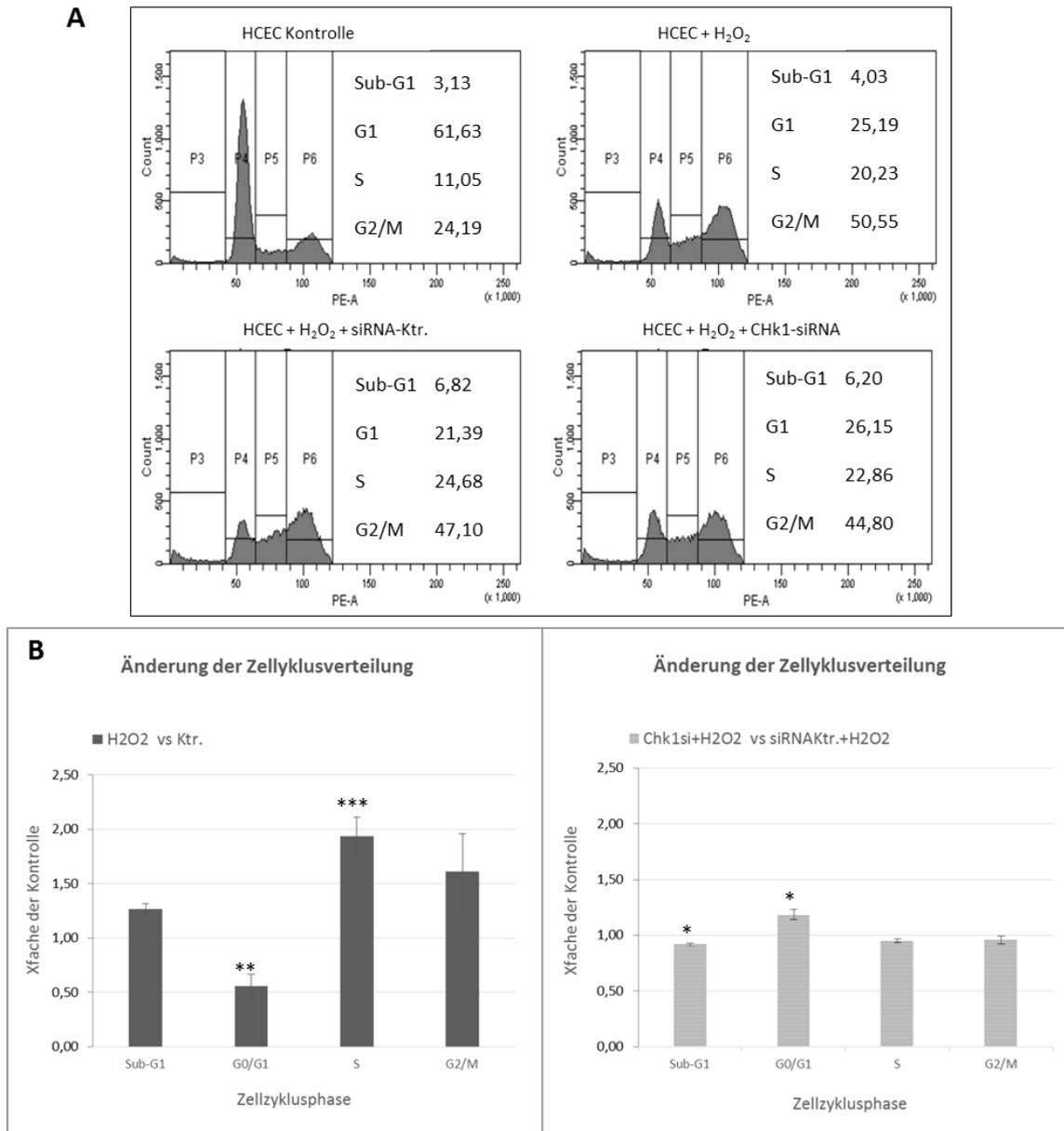


Abb. 12: Untergeordnete Rolle von Chk1 im Zellzyklus von HCEC nach H₂O₂-Behandlung. (A) Zellzyklusanalyse von HCEC nach Chk1-*knockdown* und 24 h nach H₂O₂-Behandlung mittels FACS. Zellzahlen in den jeweiligen Phasen in %. (B) Vergleich der Zellzyklusverteilung 24 h nach H₂O₂-Behandlung (links) und zusätzlichem Chk1-*knockdown* (rechts). Jeweils im Vergleich zur unbehandelten bzw. siRNA-Kontrolle (gestrichelte Linie, K=1.0). Mittleres Xfache dreier unabhängiger Versuche mit Standardabweichung. ** p<0,01; *** p<0,001.

3.1.4 pJNK supprimiert pChk1 in HCEC

Wie anfangs begründet, wurde nach der Untersuchung einer möglichen Abhängigkeit des pJNK-Signalweges von Chk1 auch die Möglichkeit eines JNK-regulierten Chk1-Signalweges betrachtet. Dazu wurden HCEC-Zellen mit dem JNK-Inhibitor SP600125 behandelt und relevante Proteinlevel analysiert. Das aktivierte pJNK-Target pc-Jun^{S63} diente dabei als Kontrolle für eine gelungene Inhibition.

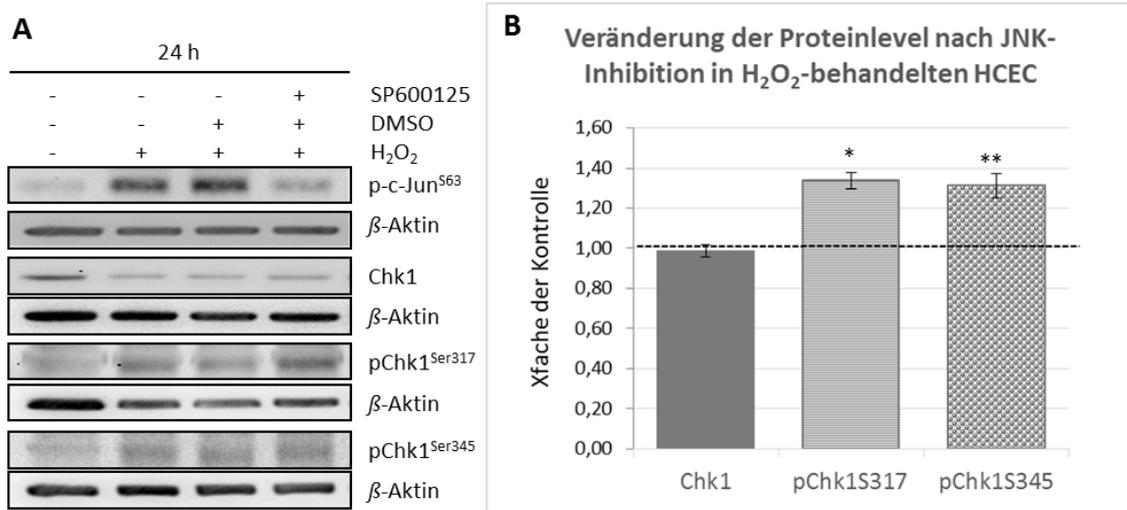


Abb. 13: pJNK supprimiert die Aktivierung von Chk1 nach H₂O₂-Behandlung in HCEC. (A) Western Blot-Analysen von HCEC nach JNK-Inhibition durch SP600125 und 24h nach H₂O₂-Behandlung. Proteinlevel im Vergleich zur DMSO/H₂O₂-Kontrolle und zum *housekeeping*-Gen β-Aktin. (B) Veränderung der Chk1-Aktivierung nach pJNK-Inhibition. Mittelwerte dreier unabhängiger Versuche mit Standardabweichung. * p<0,05; ** p<0,01.

Wie aus **Abb. 13** hervorgeht, gelang die JNK-Inhibition und Chk1 wurde bei unverändert niedrigem Gesamtlevel stärker aktiviert (p-Chk1^{S317} und p-Chk1^{S345}). Da der JNK-Inhibitor SP600125 die Kinasefunktion von JNK ATP-kompetetiv hemmt, kann aus dem gezeigten Ergebnis geschlossen werden, dass p-JNK die Aktivierung von Chk1 supprimiert.

Für die in HCEC nachgestellte akute Entzündungssituation lässt sich somit zusammenfassend feststellen, dass die Menge an Chk1 Gesamtprotein nach H₂O₂-Behandlung vermindert vorlag, Chk1 nichts destotrotz stärker durch Phosphorylierung aktiviert wurde (**Abb. 9**). Chk1 supprimierte den pJNK-Signalweg (**Abb. 10**), pJNK hingegen unterdrückte z. T. die aktivierte Form von Chk1 (**Abb. 13**). Die als pJNK-abhängig beschriebenen Zellzyklusarreste (Poehlmann et al., 2013a) waren nach Chk1-*knockdown* weiterhin nachweisbar (**Abb. 12**). Die Rolle von Chk1 in der Zellzykluskontrolle und in der DNA-Schadensantwort wird im Allgemeinen durch die aktivierte Variante, pChk1, ausgeübt, welches in den HCEC z. T. pJNK-abhängig gehemmt wurde, seine Funktion aber vermutlich aufgrund der ohnehin erhöhten Level trotzdem ausüben konnte.

3.2 Rolle von Chk1 im Modell der chronischen Entzündung

Die bisher gezeigten Ergebnisse spiegelten z. T. die Signaltransduktion im Modell der akuten ersten Entzündung bei Colitis Ulcerosa wider. Nachfolgend wurden Veränderungen in den Signalwegen in Z-Zellkulturen, dem Modell der chronischen, nicht aktiven Colitis Ulcerosa ermittelt. Erste Untersuchungen an den Z-Zellkulturen hatten wie in 1.5 zusammengefasst, Zeichen einer malignen Transformation und eine dysregulierte DNA-Schadensantwort ergeben. So wurde für die Z-Zellkulturen Z1-Z10 ein verminderter Level an γ H2A.X und eine verringerte p21^{WAF1}-Expression trotz DNA-Schaden publiziert (Poehlmann et al., 2013b). Weiterhin wurden die gesteigerte Proliferation und der Verlust der Zell-Zell-Kontakthemmung auf eine dysregulierte JNK-Aktivierung zurückgeführt. Es zeigte sich neben einer permanenten JNK-Inaktivierung eine pJNK p46 Hoch- und eine p-p54 Herunterregulation, was eine Zelltransformation zu begünstigen schien.

Da eine veränderte Regulation von JNK, p21^{WAF1} und γ H2A.X eine veränderte Zellzyklusverteilung erwarten ließ, wurden Zellzyklusanalysen exemplarisch an Z3-, Z5- und Z10-Zellen im Vergleich zu HCEC durchgeführt.

3.2.1 Unveränderte Zellzykluskontrolle in Z1-Z10

Zellzyklusanalysen von HCEC, Z3-, Z5- und Z10-Zellen ohne Reiz zeigten eine annähernde Gleichverteilung (**Abb. 14**). Bei diesen Zelllinien befand sich die größte Zellzahl in der G1-Phase. Da in den Z-Zellkulturen pJNK p54 um etwa 50 % herunterreguliert war und pJNK p46 auf das 1,3fache hochreguliert vorlag (Poehlmann et al., 2013b), jedoch kein Arrest stattfand, kann man daraus ableiten, dass pJNK p46 offenbar in Z-Zellkulturen nicht für einen Arrest zuständig ist. pJNK p54 kann vermutlich aufgrund der Herabregulation keine Arreste induzieren. Auch pChk1 schien in den Z-Zellkulturen in der Erholung nach oxidativem Stress trotz konstitutiver Hochregulation keine Arreste zu induzieren. Diese Zellzyklusverteilung spricht für die bereits für die Z-Zellkulturen gezeigte fehlerhafte Schadensmeldung und geht mit der Hochregulation der entsprechenden Zytokine einher.

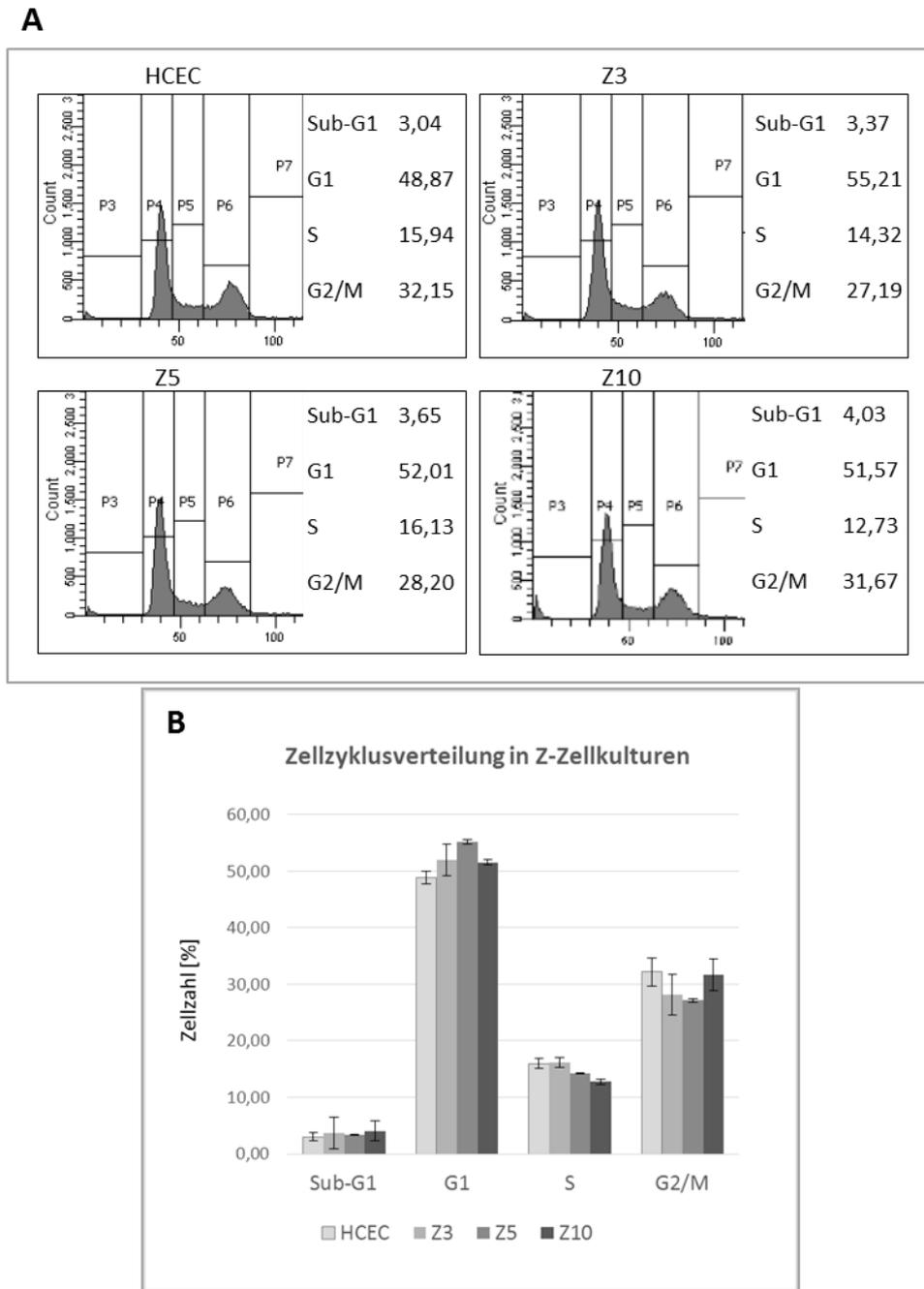


Abb. 14: Unveränderte Zellzykluskontrolle trotz akkumuliertem DNA-Schaden und hohen pChk1^{S317}-Level in den Z-Zellkulturen. (A) Zellzyklusanalysen mittels FACS von Z3, Z5 und Z10 ohne H₂O₂-Behandlung und unbehandelten HCEC. **(B)** Zellzyklusverteilung in HCEC, Z3-, Z5- und Z10-Zellen ohne H₂O₂-Behandlung. Zellzahl in %. Mittelwerte aus zwei unabhängigen Versuchen mit Standardabweichung.

Von Interesse für die Aufklärung der, der malignen Transformation zugrunde liegenden, Mechanismen war allerdings auch, ob Chk1 eine Rolle in der veränderten Signaltransduktion in den Z-Zellkulturen spielt bzw. ob eine Suppression dessen vorliegt. Diese Ergebnisse werden nachfolgend vorgestellt.

3.2.2 Akkumulation von pChk1^{S317} und Herunterregulation von Chk1 in Z1-Z10

Zunächst zeigten sich in den Z-Zellkulturen ohne weitere Behandlung, also im ungereizten Zustand, Proteinlevel von Chk1 und pChk1^{S317/345}, die tendenziell denen in HCEC nach H₂O₂-Reiz entsprachen (Abb. 15, vgl. Abb. 9). Chk1 lag in den Z-Zellkulturen vermindert vor, wurde aber trotzdem deutlich stärker an S317 und zunehmend auch an S345 phosphoryliert.

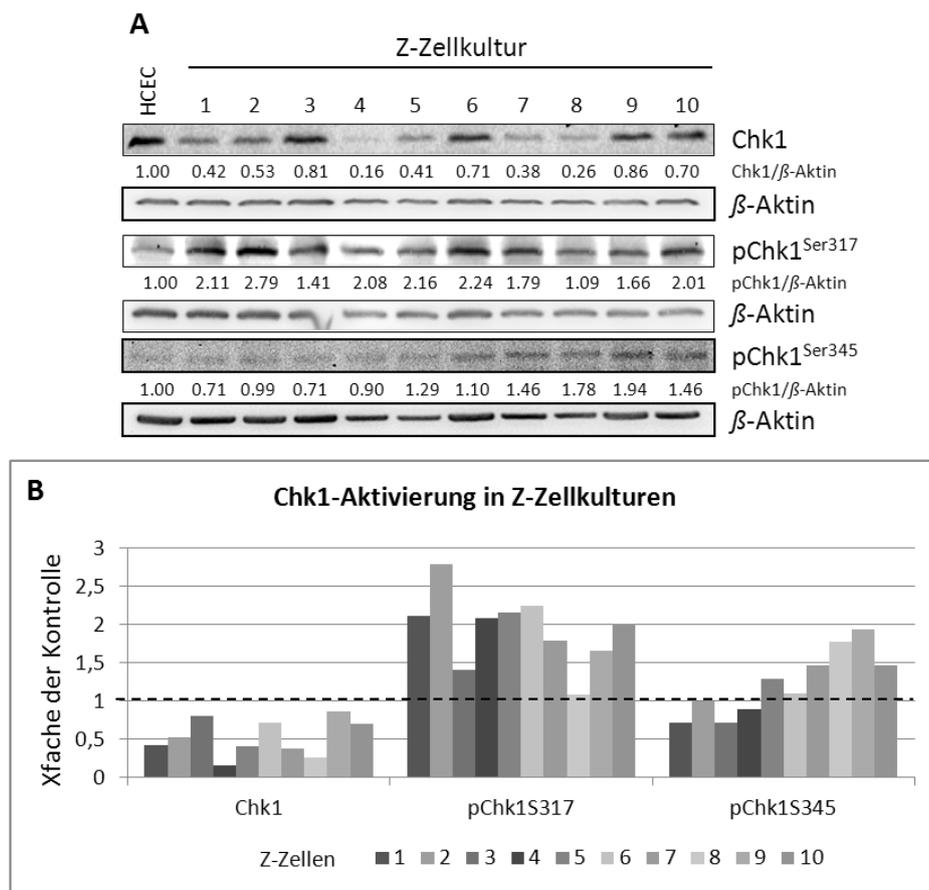


Abb. 15: Akkumulation von pChk1^{S317} und Reduktion von Chk1 in den Z-Zellkulturen Z1-Z10. (A) Western Blot-Analysen ohne H₂O₂-Behandlung von Z1 bis Z10 im Vergleich zu unbehandelten HCEC. Proteinlevel im Vergleich zum *housekeeping*-Gen β -Aktin. (B) graphische Darstellung von (A). (z. T. Pöhlmann unpublished data)

In HCEC wurde die gegenseitige Beeinflussung des pChk1- und pJNK-Signalweges gezeigt. Diese Zusammenhänge wurden nun in Z-Zellkulturen ohne H₂O₂-Behandlung untersucht.

3.2.3 pJNK supprimiert pChk1 in Z-Zellkulturen

In HCEC nach H₂O₂-Behandlung war die Aktivierung von Chk1 als pJNK-supprimiert gezeigt worden. Um diesen Zusammenhang in den Z-Zellkulturen zu prüfen, wurden

JNK-Inhibitor-Experimente an Z3, Z5 und Z10 im Vergleich zu HCEC durchgeführt. In den Z-Zellkulturen wurde JNK als dysreguliert publiziert (Poehlmann et al., 2013b), mit vermindertem p-p46- und erhöhtem p-p54-Level. Daher wurde bei entsprechender Behandlung mit SP600125 vorrangig vermutlich die Funktion von p-p46 JNK inhibiert.

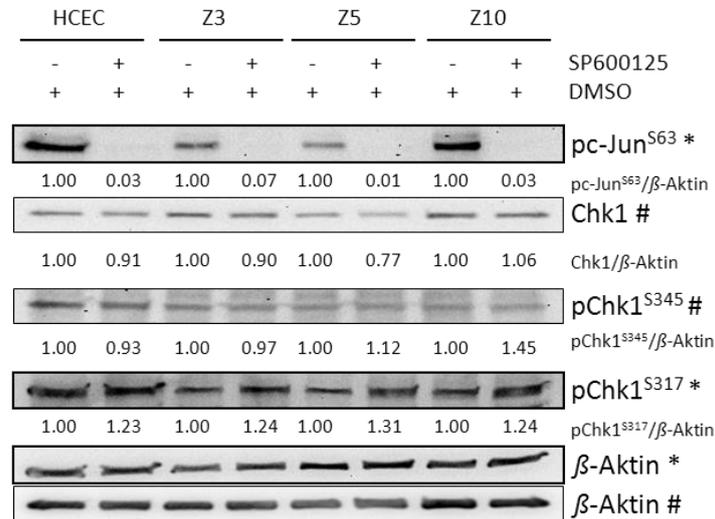


Abb. 16: pJNK supprimiert die Aktivierung von Chk1 in den Z-Zellkulturen. Western Blot-Analysen 24 h nach JNK-Inhibition bzw. DMSO-Kontrolle ohne H₂O₂-Behandlung von Z3, Z5 und Z10 im Vergleich zu unbehandelten HCEC. Proteinlevel im Vergleich zur unbehandelten und DMSO-Kontrolle und zum *housekeeping*-Gen β-Aktin.

Wie die **Abb. 16** zeigt, gelang in HCEC, Z3-, Z5- und Z10-Zellen die Inhibition der pJNK-Aktivität. Diese Inhibition von pJNK hatte allerdings keinen zusätzlichen Einfluss auf die ohnehin verminderte Expression von Chk1 in HCEC, Z3- und Z10-Zellen. Lediglich in Z5-Zellen wurde Chk1 nach pJNK-Inhibition noch geringer exprimiert. Chk1 war in den Z-Zellkulturen als aktiviert gezeigt worden (**Abb. 15**). Da die Aktivierung von Chk1 nach JNK-Inhibition wieder zunimmt, hemmt pJNK auch in den Z-Zellkulturen z. T. die Phosphorylierung von Chk1.

3.2.4 Chk1 supprimiert den pJNK-Signalweg in Z-Zellkulturen

In HCEC nach H₂O₂-Behandlung supprimierte Chk1 die pJNK-abhängige DNA-Schadensantwort. Um einen möglichen Einfluss auf den pJNK-Signalweg auch in den Z-Zellkulturen zu untersuchen wurden Chk1-siRNA-Behandlungen an Z3-, Z5- und Z10-Zellen durchgeführt. Die Ergebnisse sind in **Abb. 17** dargestellt.

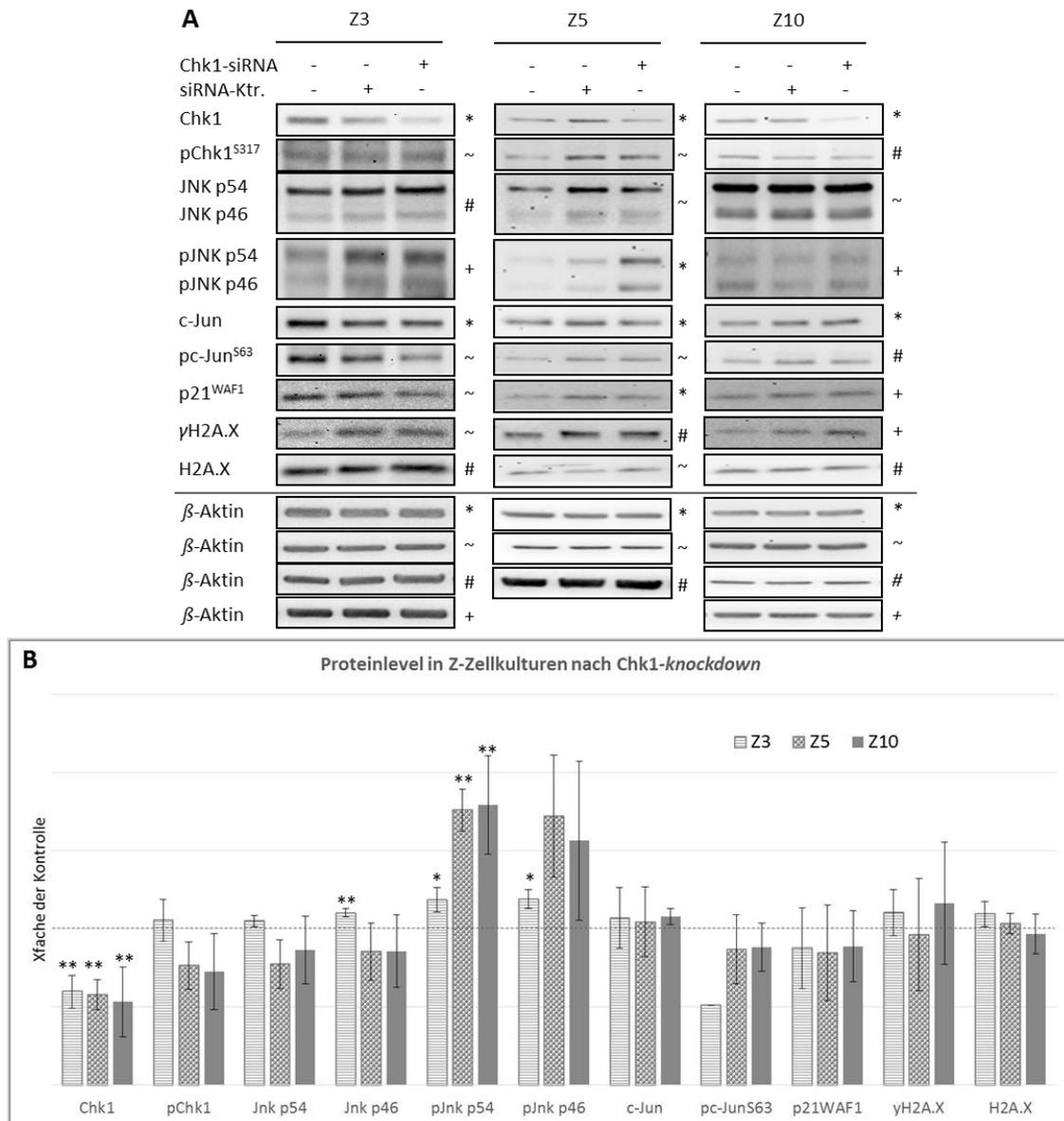


Abb. 17: Chk1/pChk1 supprimiert z. T. den pJNK-Signalweg in Z-Zellkulturen. (A) Western Blot-Analysen von Z3-, Z5- und Z10-Zellen 24 h nach Chk1-siRNA-Behandlung. Proteinlevel im Vergleich zur siRNA-Kontrolle und zum *housekeeping*-Gen β -Aktin. **(B)** Z3-, Z5- und Z10-Zellen. Veränderung (Xfache) der Proteine 24 h nach Chk1-siRNA-Behandlung im Vergleich zur siRNA-Kontrolle (gestrichelte Linie, K=1.0). Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen mit Standardabweichung. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Nach signifikantem Chk1-knockdown auf ca. 60 % der siRNA-Kontrolle zeigte sich (**Abb. 17**) in Z3, Z5- und Z10-Zellen keine Beeinflussung des pChk1-Levels (**Abb. 10**). Die Expression von JNK p54 in Z3-, Z5- und Z10-Zellen unbeeinflusst. JNK p46 wurde mit Ausnahme in Z3-Zellen ebenfalls unverändert exprimiert. Nichtsdestotrotz waren die Level an aktiviertem JNK p54 und p46 in allen Zelllinien zumeist signifikant erhöht, p-p54 mit steigender Tendenz von Z3 (1,19fach) über Z5 (1,76fach) bis Z10 (1,89fach). Die Expressionslevel von c-Jun blieben unbeeinflusst. Trotz Hochregulation aktivierten JNKs wurde c-Jun in Z3-Zellen vermindert aktiviert bzw. lag unbeeinflusst vor (Z5, Z10). Der JNK-abhängige Zellzyklusregulator p21^{WAF1} wurde nicht beeinflusst. Auch der

Schadensmelder γ H2A.X blieb unverändert aktiviert bei nahezu gleichbleibenden H2A.X-Leveln in allen Zelllinien. Somit können die in HCEC nach H₂O₂-Behandlung und Chk1-*knockdown* gezeigten Zusammenhänge (**Abb. 10**) auf die ungereizten Z-Zellkulturen übertragen werden: Das vermindert exprimierte aber stärker aktivierte Chk1 (**Abb. 15**) supprimierte auch hier z. T. die pJNK-Varianten.

3.3 Rolle von Chk1 bei erneuter Entzündungssimulation im Modell der chronischen Colitis Ulcerosa

Um die Relevanz der bisher in den Z-Zellkulturen ermittelten Veränderungen für die Stressantwort bzw. die DNA-Schadensantwort untersuchen zu können, wurden nachfolgend Experimente exemplarisch an Z10-Zellen nach erneuter H₂O₂-Behandlung durchgeführt. Das experimentelle Design spiegelt die aktive Phase der chronischen Entzündung am Übergang von Z10-Zellen zu Z11-Zellen wider.

3.3.1 Akuter Stressreiz induziert die Aktivierung von c-Jun und H2A.X in Z10-Zellen

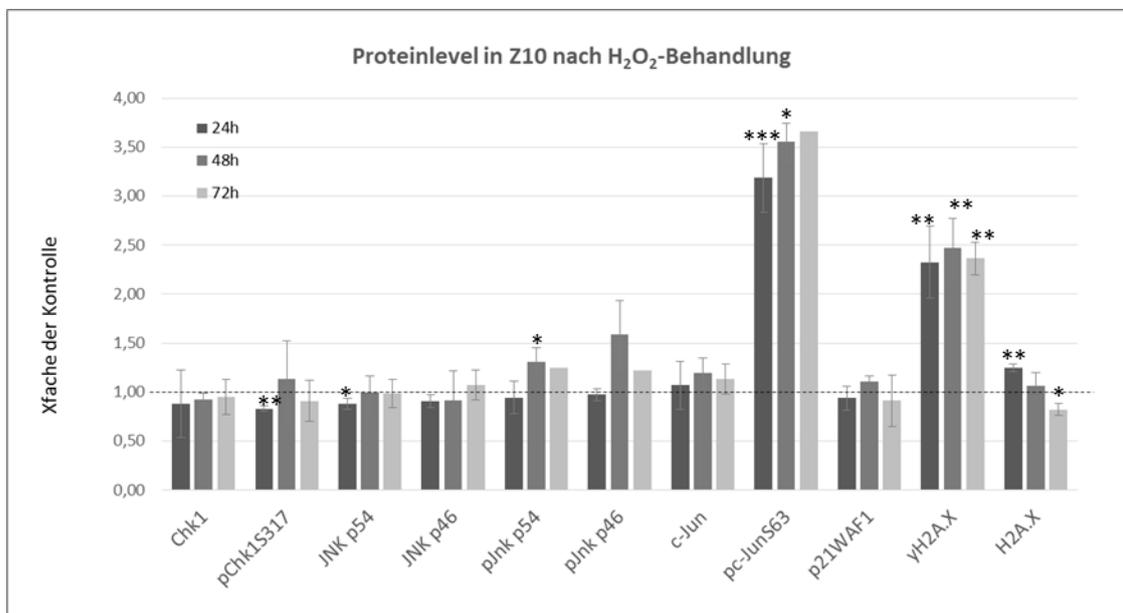


Abb. 18: Akuter Stressreiz führt in Z10-Zellen zur Aktivierung von c-Jun und H2A.X. Western Blot-Analysen von Z10-Zellen 24 h nach H₂O₂-Behandlung. Proteinlevel im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (gestrichelte Linie, K=1.0). Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen mit Standardabweichung. * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001.

Die erneute Behandlung der Z10-Zellen mit H₂O₂ führte zu keiner Änderung des permanent verminderten Chk1-Levels. Die aktivierte Form, pChk1S317, lag unter diesen Bedingungen nach 24 h um etwa 15 % vermindert vor. Für die bisher in Z10-Zellen ohne akuten Stressreiz gezeigte dysregulierte JNK-Aktivierung (Poehlmann et al., 2013b), ergaben sich auch nach erneuter H₂O₂-Behandlung keine Änderungen (**Abb. 18**). Auch die zuvor ermittelte JNK-Inaktivierung blieb nach erneutem Reiz stabil. p21^{WAF1} und γ H2A.X waren in Z10-Zellen ohne Reiz vermindert exprimiert bzw. aktiviert worden. Nach erneuter Behandlung blieb der Proteinlevel an p21^{WAF1} unverändert, H2A.X hingegen wurde mehr als doppelt so stark aktiviert. Und zusätzlich wurde c-Jun an Ser63 um mehr als das Dreifache stärker phosphoryliert.

3.3.2 Chk1 supprimiert die DNA-Schadensmarkierung in Z10-Zellen nach erneutem Stressreiz

Durch Chk1-*knockdown* mit anschließender H₂O₂-Behandlung wurde der Einfluss von Chk1 auf den JNK-Signalweg in Z10-Zellen nach erneutem Stressreiz untersucht.

In den Z10-Zellen ohne H₂O₂-Reiz supprimierte Chk1 die JNK-Aktivierung (**Abb. 17**). Nach H₂O₂-Behandlung hingegen unterdrückte Chk1, wie aus **Abb. 19** hervorgeht, keine Variante von aktiviertem JNK. Allerdings wurden nach erneutem oxidativen Stress auch c-Jun (1,30fach) und γ H2A.X (2,36fach) durch Chk1 supprimiert.

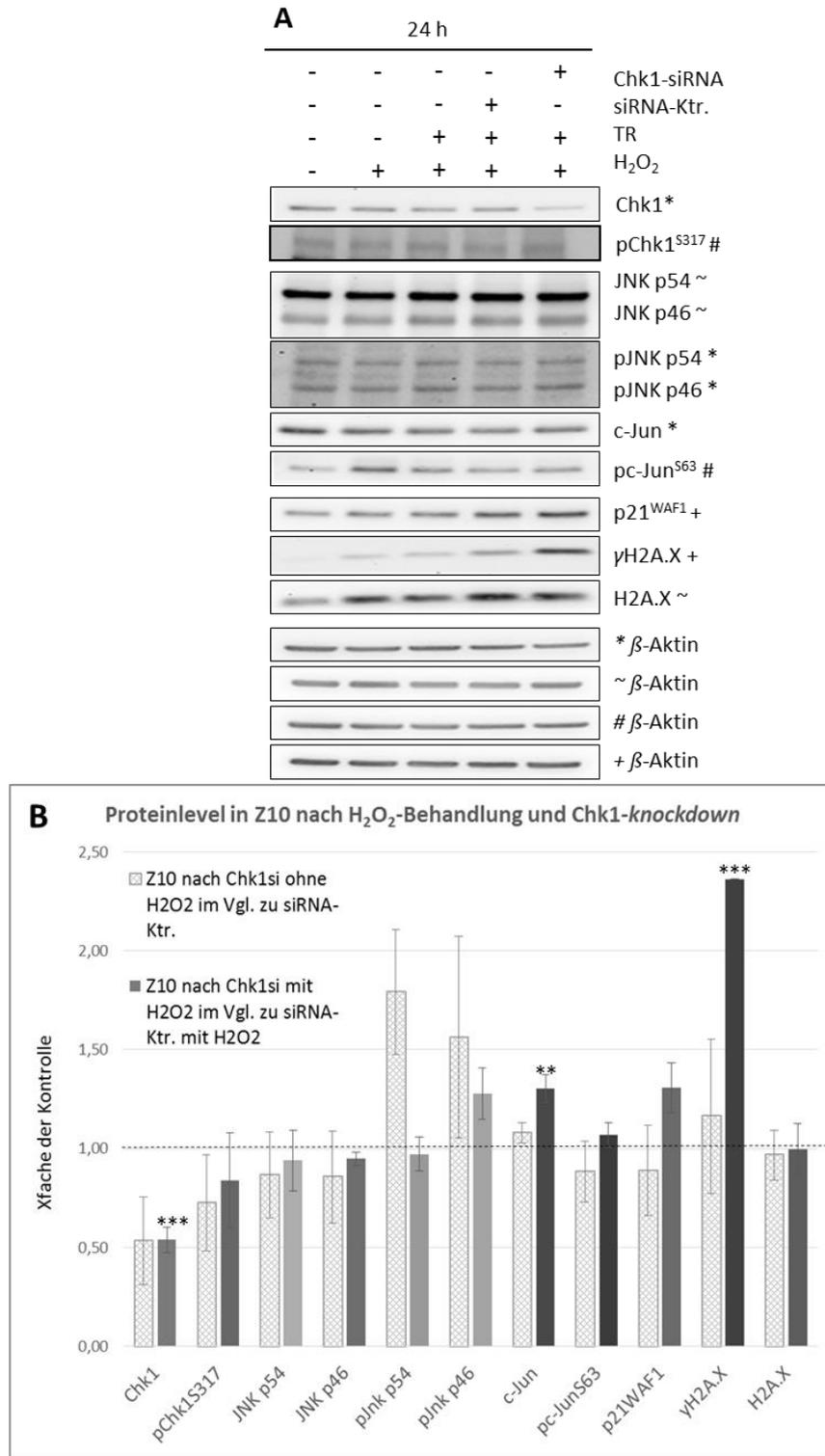


Abb. 19: Chk1 supprimiert die pJNK-abhängige DNA-Schadensantwort in Z10-Zellen nach H₂O₂-Reiz. (A) Western Blot-Analysen von Z10 nach Chk1-siRNA-Behandlung und 24 h nach H₂O₂-Behandlung. Proteinlevel im Vergleich zur Kontrolle und zum *housekeeping*-Gen β -Aktin. TR Transfektionsreagenz. **(B)** Z10-Zellen. Veränderung (Xfache) der Proteine nach Chk1-siRNA-Behandlung, 24h ohne und mit H₂O₂-Behandlung im Vergleich zur jeweiligen siRNA-Kontrolle (gestrichelte Linie, K=1.0). Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen mit Standardabweichung. ** p<0,01; *** p<0,001.

3.3.3 Chk1 spielt in Z10-Zellen im Zellzyklus nach erneutem Stressreiz eine marginale Rolle im G2/M-Arrest

Für die Zellzykluskontrolle in Z10-Zellen (vgl. auch **Abb. 14**) 24 h nach H₂O₂-Behandlung wurden wie in HCEC nach 24 h H₂O₂-Behandlung (**Abb. 12**) S- und G2/M-Arreste publiziert (Poehlmann et al., 2013b). Ebenso wie in HCEC konnten in Z10-Zellen zu späteren Zeitpunkten die S- und G2/M-Arreste nicht aufrechterhalten werden, allerdings kam es nicht zur Apoptoseinduktion sondern zur Apoptoseresistenz, zum Wiedereintritt in den Zellzyklus und damit zur Kontrollpunktadaptation (Poehlmann et al., 2013b). Da diese Adaptation die Überwindung der zunächst aktivierten Zellzykluskontrolle bedingt - vor allem des G2/M-Arrestes, in dem Chk1 eine große Rolle einnimmt - wurden Zellzyklusanalysen mittels FACS an Z10-Zellen nach Chk1-*knockdown* und 24 h, 48 h und 72 h nach H₂O₂-Behandlung durchgeführt und der Einfluss von Chk1 ermittelt.

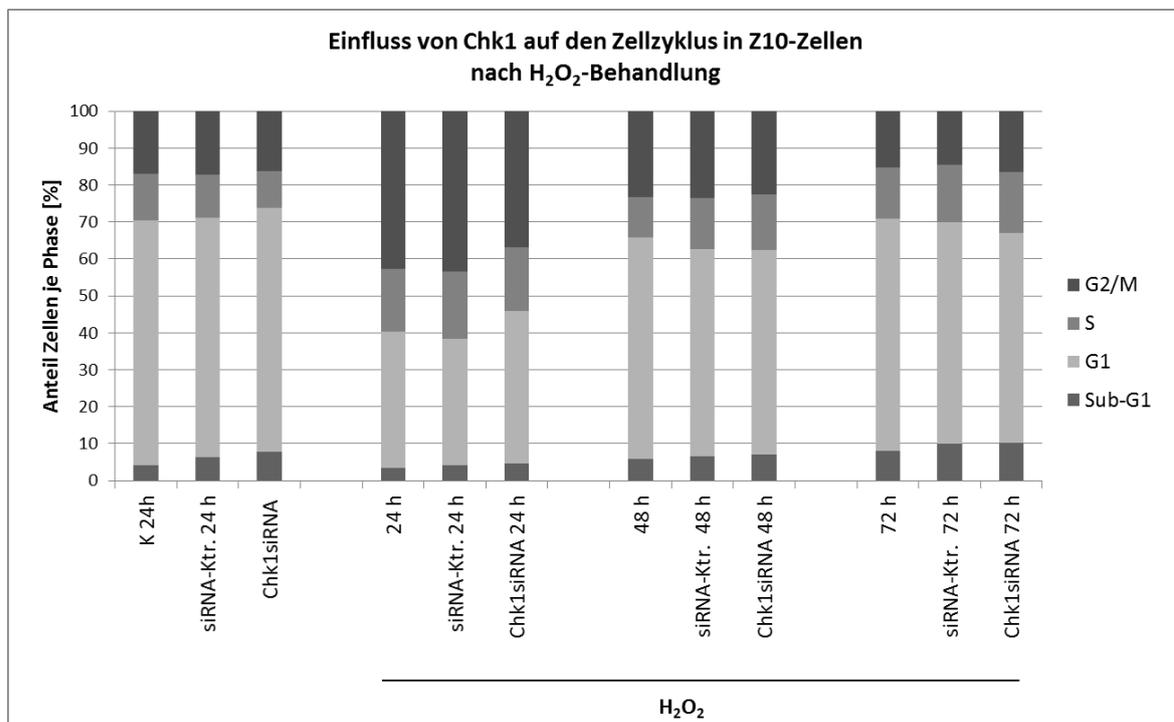


Abb. 20: Rolle von Chk1 im Zellzyklus von Z10 nach erneutem Stressreiz. Zellzyklusanalyse von Z10-Zellen nach Chk1-*knockdown* und 24 h bzw. 48 h und 72 h nach H₂O₂-Behandlung mittels FACS. Änderung der Zellzyklusverteilung im Vergleich zur jeweiligen unbehandelten bzw. siRNA-Kontrolle bzw. Chk1-*knockdown* ohne H₂O₂. Mittelwerte aus zwei unabhängigen Versuchen.

Bei den in **Abb. 20** dargestellten Mittelwerten dreier unabhängiger Versuche wurden nur Veränderungen größer 5 % als relevant betrachtet. Dabei zeigte sich zunächst, dass der Stressreiz durch H₂O₂-Behandlung auch in Z10-Zellen sowohl einen S- (+ 5,24 %) vor allem aber einen G2/M-Arrest (+ 25,44 %) induzierte. Zu späteren Zeitpunkten kam es nicht zur Apoptoseinduktion sondern zur Apoptoseresistenz und dem Wiedereintritt in den

Zellzyklus, was sich durch eine um 23,02 % erhöhte G1-Phase zeigte (S -5,91 %, G2/M - 19,50 %). Auch nach 72 h befand sich die Mehrzahl der Zellen in der G1-Phase (G2/M - 7,95 %). Nach Chk1-*knockdown* und 24 h nach H₂O₂-Behandlung war der G2/M-Arrest minimal um 7 % rückläufig, zugunsten der G1 Phase. Nach 48 h und 72 h kam es durch den Chk1-*knockdown* zu keinerlei Veränderung gegenüber der entsprechenden Kontrolle. Chk1 hat somit in den Z10-Zellen nur eine marginale Rolle im Aufrechterhalten des G2/M-Arrestes nach H₂O₂-Behandlung.

3.4 Rolle von Chk1 am Chromatin im Modell der Colitis Ulcerosa

Um die epigenetische Rolle von Chk1 in einer Chromatinmodulation zu ermitteln, wurde zunächst die Methode der subzellulären Fraktionierung etabliert. Um die am Chromatin gebundenen Proteine untersuchen zu können, wurden von HCEC und Z10-Zellen mit/ohne H₂O₂-Behandlung sowie mit/ohne Chk1-*knockdown* Zellpellets von je 3 Mio. Zellen gesammelt und aus diesen durch verschiedene Puffer die Fraktionen verschiedener subzellulärer Kompartimente herausgelöst. Durch Aufschluss der Zellmembran konnte zunächst die zytoplasmatische Proteinfraction (Zytosol) heraus gelöst werden. Nachfolgend wurden die membrangebundenen Proteine (Membran), die löslich-nukleären Proteine (Lösl. nukleär) sowie die chromatingebundene Fraktion (Chromatin) und die Bestandteile des Zytoskeletts (Zytoskelett) separiert. **Abb. 21** zeigt exemplarisch die gelungene Trennung der Proteine. Als Nachweis für die einzelnen Fraktionen dienten dabei verschiedene Proteine wie das zytosolische Chaperon HSP90, der membranständige Rezeptor TRAIL-R1/DR4, der Transkriptionsfaktor SP1 bzw. Orc2 (*origin recognition complex 2*) für die löslich-nukleäre Fraktion, Histon 1 (H1) für die bis dahin ans Chromatin gebundenen Proteine und das Intermediärfilament Vimentin für die zytoskelettal gebundene Fraktion.

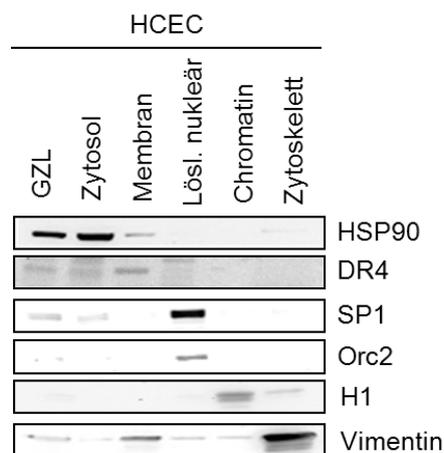


Abb. 21: Nachweis der erfolgreichen Fraktionierung. Western Blot-Analysen von HCEC nach subzellulärer Fraktionierung. Ganzzelllysate (GZL), identisch mit Standard WB-Pellets. Nähere Erläuterungen siehe Text.

Wie von Shimada *et al.* beschrieben, reguliert Chk1 die transkriptionelle Antwort nach DNA-Schaden (Shimada et al., 2008). Für diese Regulation ist die Bindung von Chk1 am Chromatin bzw. das Loslösen dessen von besonderer Bedeutung. Um diesen Mechanismus in HCEC und Z10-Zellen untersuchen zu können, wurden HCEC und Z10-Zellen mit und ohne H₂O₂-Behandlung der Fraktionierung unterzogen. Anschließend wurden die Proteinmengen von Chk1, pChk1^{S317} und assoziierten bzw. an der Signalkette beteiligten Proteinen in den einzelnen Fraktionen ermittelt.

3.4.1 Chk1 akkumuliert in Z10-Zellen am Chromatin

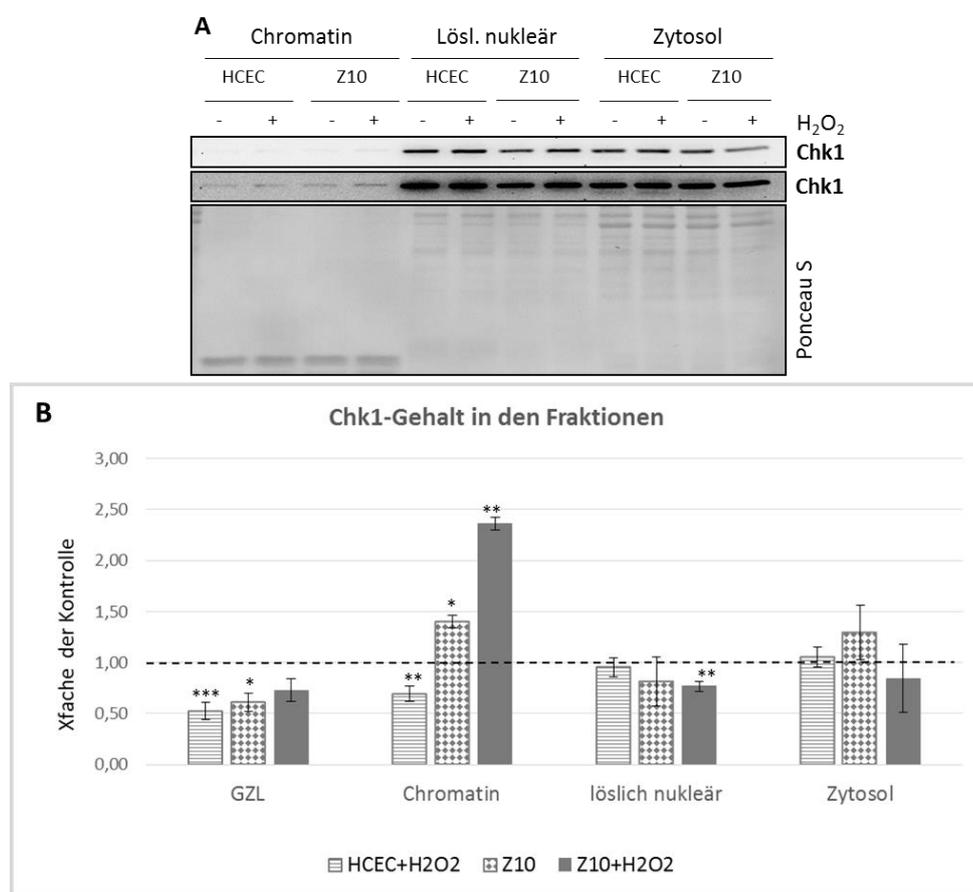


Abb. 22: Chk1-Gehalt in verschiedenen Fraktionen von HCEC und Z10-Zellen. (A) Beispiel Western Blot-Analyse nach Fraktionierung von HCEC und Z10-Zellen ohne/mit H₂O₂-Behandlung. Identische Chk1-AK-Banden nach unterschiedlich langer Belichtungszeit. Ladekontrolle: Ponceau S-Färbung. (B) Mittelwerte mehrerer unabhängiger Versuche mit Standardabweichung. Wie (A). Normiert an der Ladekontrolle und im Vergleich zu unbehandelten Kontrolle (HCEC, gestrichelte Linie, K=1.0). GZL: Ganzzelllysat, Chromatin: chromatingebundene Fraktion, löslich-nukleär: nukleär gelöst vorliegende Proteine, Zytosol: zytosolische Proteinfraktion. * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001.

Wie aus **Abb. 22** hervor geht kam es in HCEC nach H₂O₂-Behandlung wie bereits gezeigt (**Abb. 9**) zu einer etwa 50 %igen Reduktion des Chk1-Levels im Ganzzelllysat (GZL). Auch

am Chromatin kam es zu einer etwa 30 %igen Reduktion von Chk1, verglichen mit unbehandelten HCEC. In den anderen Fraktionen löslich-nukleärer und zytosolischer Proteine gab es nach H₂O₂-Behandlung keine Änderung des Chk1-Gehaltes im Vergleich zu unbehandelten HCEC. Auch in Z10-Zellen war der Gesamt-Chk1-Gehalt vermindert (39 %) (vgl. auch **Abb. 15**). Allerdings kam es am Chromatin zu einer signifikanten Akkumulation von Chk1 von zusätzlich 40 %. In der löslich-nukleären Fraktion und in der Fraktion zytosolischer Proteine in Z10-Zellen gab es keine Änderungen der Chk1-Menge im Vergleich zu HCEC ohne und mit H₂O₂-Behandlung. Nach H₂O₂-Behandlung war der Gesamt-Chk1-Gehalt in Z10-Zellen nur noch um etwa 27 % im Vergleich zu unbehandelten HCEC vermindert. In der Fraktion Chromatin-assoziiierter Proteine der Z10-Zellen nach H₂O₂-Behandlung war Chk1 im Vergleich zu unbehandelten HCEC um ca. 136 % erhöht. In der Fraktion löslich-nukleärer Proteine der Z10-Zellen nach H₂O₂-Behandlung lag Chk1 leicht vermindert vor. In der Fraktion zytosolischer Proteine kam es in Z10-Zellen auch nach H₂O₂-Behandlung zu keiner Änderung des Chk1-Levels im Vergleich zu HCEC ohne und mit H₂O₂-Behandlung.

Zusammenfassend ließ sich feststellen, dass Chk1 in Z10-Zellen ohne, vor allem aber nach H₂O₂-Behandlung stärker am Chromatin assoziiert war, als in HCEC mit und ohne H₂O₂-Behandlung.

3.4.2 Erhöhte pChk1^{S317}-Level in den Fraktionen akut und chronisch gestresster Zellen

In HCEC nach H₂O₂-Behandlung, Z10-Zellen und Z10-Zellen nach H₂O₂-Behandlung war der Gehalt an pChk1^{S317} (**Abb. 23**) generell erhöht (vgl. auch **Abb. 15**), in HCEC nach H₂O₂-Behandlung stärker als in Z10-Zellen ohne und mit H₂O₂-Behandlung. Die Fraktionierung zeigte, dass pChk1^{S317} am Chromatin akkumulierte. Die pChk1^{S317}-Level der löslich-nukleären Proteinfraction von HCEC mit H₂O₂-Behandlung und Z10-Zellen ohne und mit H₂O₂-Behandlung unterschieden sich kaum voneinander. Lediglich in der Fraktion der zytosolischer Proteine lag pChk1^{S317} nach H₂O₂-Behandlung in den Z10-Zellen deutlich erhöht vor.

Zusammenfassend ließ sich feststellen, dass der Level an pChk1^{S317} in HCEC nach H₂O₂-Behandlung, Z10 und Z10-Zellen nach H₂O₂-Behandlung in allen Fraktionen erhöht war.

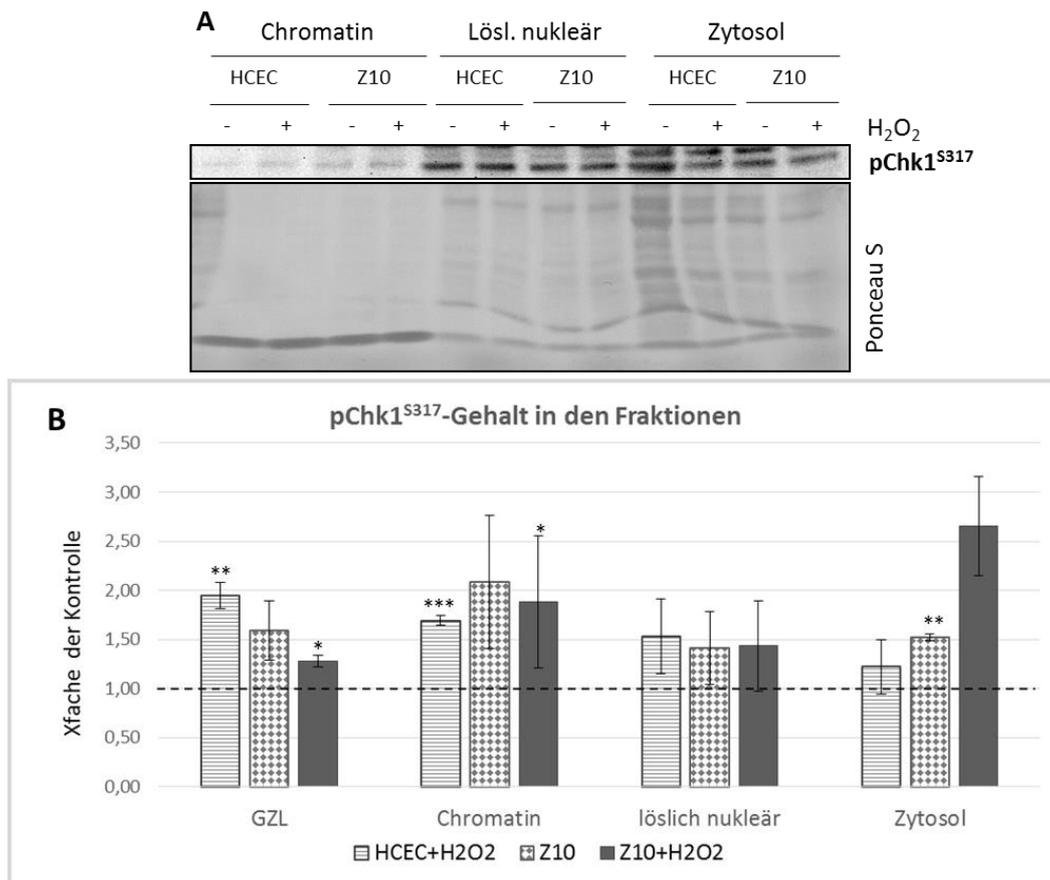


Abb. 23: pChk1^{S317}-Gehalt in verschiedenen Fraktionen von HCEC und Z10-Zellen. (A) Beispiel Western Blot-Analyse nach Fraktionierung von HCEC und Z10-Zellen mit/ohne H₂O₂-Behandlung. Ladekontrolle Ponceau S-Färbung. (B) Mittelwerte mehrerer unabhängiger Versuche mit Standardabweichung. Wie (A). Normiert an der Ladekontrolle und im Vergleich zu unbehandelten Kontrolle (HCEC, gestrichelte Linie, K=1.0). GZL: Ganzzelllysat, Chromatin: chromatingebundene Fraktion, löslich-nukleär: nukleär gelöst vorliegende Proteine, Zytosol: zytosolische Proteinfraction. * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001.

3.4.3 Veränderte Histonmodifikationen in Z10-Zellen

Da Chk1 wie eingangs beschrieben durch Phosphorylierung von Histon H3 an Threonin 11 (T11) als Chromatin-modifizierender Transkriptionsfaktor wirken kann (Enders, 2008; Shimada et al., 2008), wurde zunächst der Level an pH3^{T11} in HCEC und Z10-Zellen mit und ohne H₂O₂-Behandlung am Chromatin ermittelt.

Wie aus **Abb. 24** hervorgeht kam es in HCEC nach H₂O₂-Behandlung zu einer signifikanten Erhöhung des pH3^{T11}-Levels in der Chromatinfraction. In Z10-Zellen allerdings akkumulierte pH3^{T11} deutlich am Chromatin (1,63fach), vor allem nach Behandlung mit H₂O₂ (1,67fach).

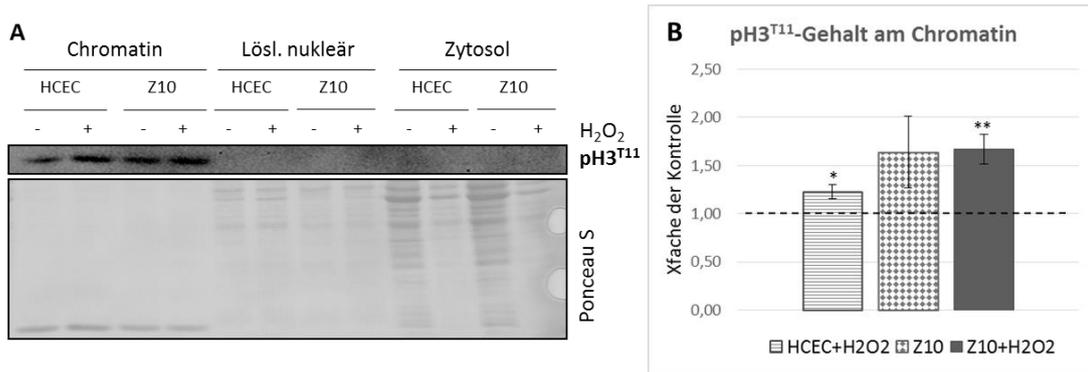


Abb. 24: pH3^{T11}-Gehalt am Chromatin von HCEC und Z10-Zellen. (A) Beispiel Western Blot-Analyse nach Fraktionierung von HCEC und Z10-Zellen mit/ohne H₂O₂-Behandlung. Ladekontrolle Ponceau S-Färbung. (B) Mittelwerte mehrerer unabhängiger Versuche mit Standardabweichung. Wie (A). Normiert an der Ladekontrolle und im Vergleich zu unbehandelten Kontrolle (HCEC, gestrichelte Linie, K=1.0). * p<0,05; ** p<0,01.

Da Shimada *et al.* eine erhöhte GCN₅-Bindung bzw. GCN₅-bedingte Acetylierung von Histon H3 nach Phosphorylierung von H3 an T11 beschrieben haben (Shimada et al., 2008) und diese Histonacetyltransferase in höheren Z-Zellkulturen erhöht vorlag (vgl. **Abb. A 1**), wurde anschließend der GCN₅-Level in den einzelnen Fraktionen von HCEC und Z10-Zellen mit und ohne H₂O₂-Behandlung ermittelt.

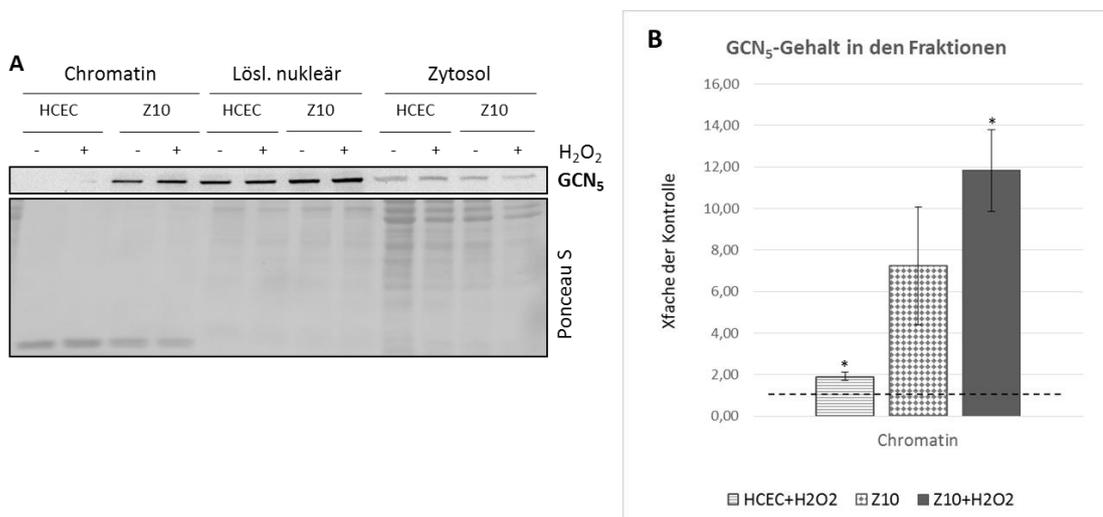


Abb. 25: GCN₅-Gehalt am Chromatin von HCEC und Z10-Zellen. (A) Beispiel Western Blot-Analyse nach Fraktionierung von HCEC und Z10-Zellen mit/ohne H₂O₂-Behandlung. Ladekontrolle Ponceau S-Färbung. (B) Mittelwerte aus zwei unabhängigen Versuchen mit Standardabweichung. Wie (A). Normiert an der Ladekontrolle und im Vergleich zu unbehandelten Kontrolle (HCEC, gestrichelte Linie, K=1.0). * p<0,05.

Die Menge an GCN₅ in der Chromatinfraktion lag in HCEC nach H₂O₂-Behandlung nahezu verdoppelt (1,91fach), in Z10-Zellen um das 7,23fache und in Z10-Zellen nach H₂O₂-Behandlung um mehr als das 10fache erhöht vor (**Abb. 25**). In den Fraktionen

löslich-nukleärer und zytosolischer Proteine gab es keinerlei Unterschiede bezüglich der Menge an GCN₅ im Vergleich zu HCEC.

Da eine erhöhte Menge der Histonacetyltransferase GCN₅ die verstärkte Acetylierung von Histonen, im Besonderen H3 an Lysin 9 (K9) bedingen kann und zu einem geringeren Teil H3 auch an anderen Stellen und auch H4 acetyliert, wurden im nächsten Schritt Histonmodifikationen in HCEC und Z10-Zellen mit und ohne H₂O₂-Behandlung untersucht.

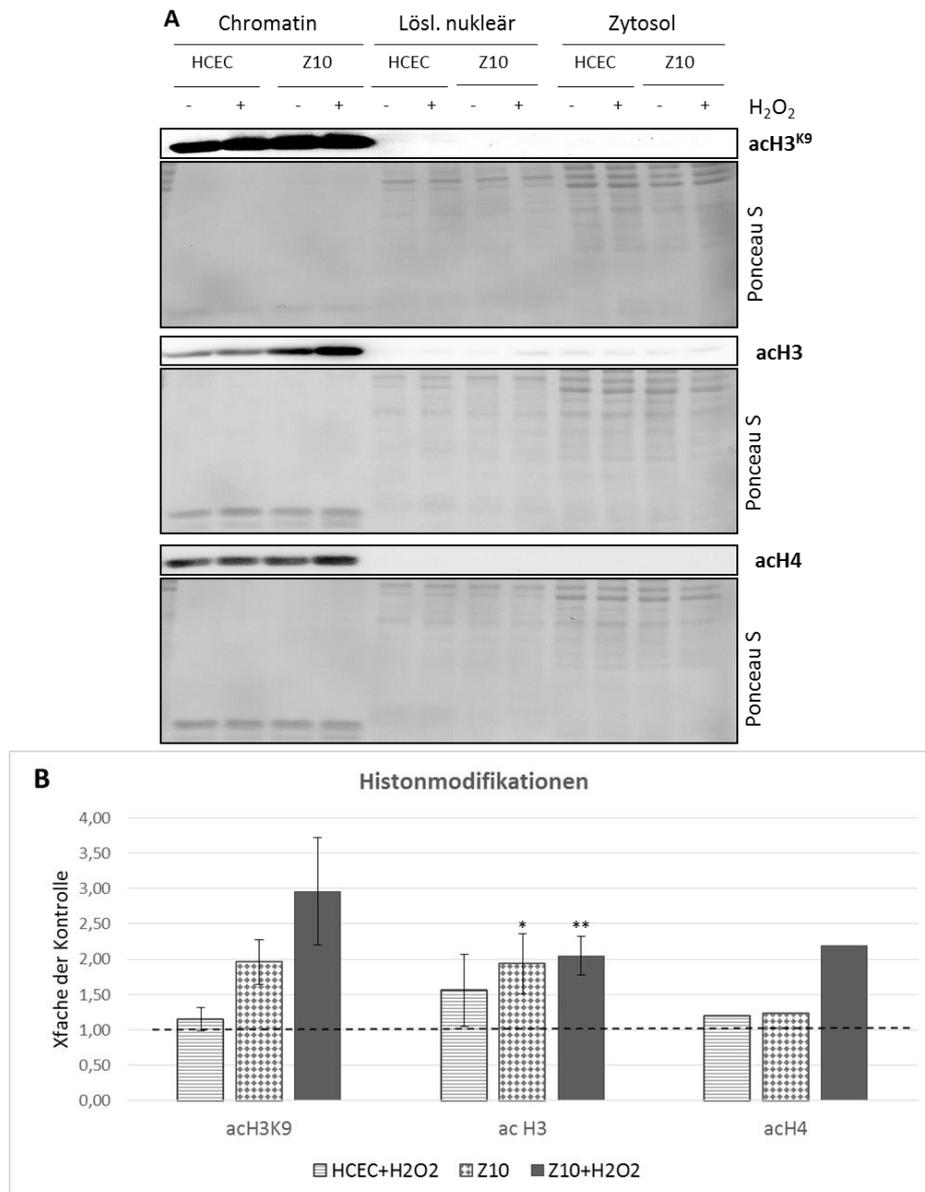


Abb. 26: Histonmodifikationen am Chromatin von HCEC und Z10-Zellen. (A) Beispiel Western Blot-Analyse nach Fraktionierung von HCEC und Z10-Zellen mit/ohne H₂O₂-Behandlung. Ladekontrolle Ponceau S-Färbung. **(B)** Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen mit Standardabweichung. Wie (A). Normiert an der Ladekontrolle und im Vergleich zu unbehandelten Kontrolle (HCEC, gestrichelte Linie, K=1.0). * p<0,05; ** p<0,01.

Aus **Abb. 26** geht hervor, dass in der Chromatinfraction von Z10-Zellen ohne und mit H₂O₂-Behandlung H3 entsprechend der stark erhöhten Level an GCN₅ (**Abb. 25**) verstärkt an K9 acetyliert wurde, wohingegen der Level in HCEC nach H₂O₂-Behandlung gleich bleibt. Die Menge an mehrfach (K9, K14) acetyliertem (ac)H3 war in HCEC nach H₂O₂-Behandlung nicht, in Z10-Zellen ohne und mit H₂O₂-Behandlung hingegen als signifikant erhöht zu detektieren (**Abb. 26**). H4 lag in HCEC nach H₂O₂-Behandlung und Z10-Zellen nur leicht vermehrt acetyliert vor. In Z10-Zellen nach H₂O₂-Behandlung wurde es allerdings deutlich stärker modifiziert.

Da Histone auch durch andere Histonacetyltransferasen als GCN₅ modifiziert werden können und die HATs p300/CBP (z. T.) und PCAF in den Z-Zellkulturen allgemein verstärkt exprimiert vorlagen (vgl. **Abb. A 1**), wurde die Menge an p300/CBP und PCAF in der Chromatinfraction der HCEC und Z10-Zellen untersucht.

Wie aus **Abb. 27** hervorgeht, lag in HCEC nach H₂O₂-Behandlung PCAF nahezu in doppelter Menge vor. In Z10-Zellen ohne und mit H₂O₂-Behandlung lagen sowohl PCAF (um 3,47fach bzw. 4,23fach) als auch p300/CBP (7,19fach bzw. 12,33fach) stark erhöht vor. Weiterhin geht aus **Abb. 27** hervor, dass das für die Dissoziation von Chk1/pChk1 vom Chromatin wichtige PCNA in allen Zelllinien und Behandlungen unverändert vorlag.

Zusammenfassend ließ sich feststellen, dass es in Z10-Zellen sowie HCEC und Z10-Zellen nach erneutem Stressreiz zu Histonmodifikationen kommt, die nach dem Modell von Shimada *et al.* eine erhöhte Transkription bedingen könnten (Shimada *et al.*, 2008).

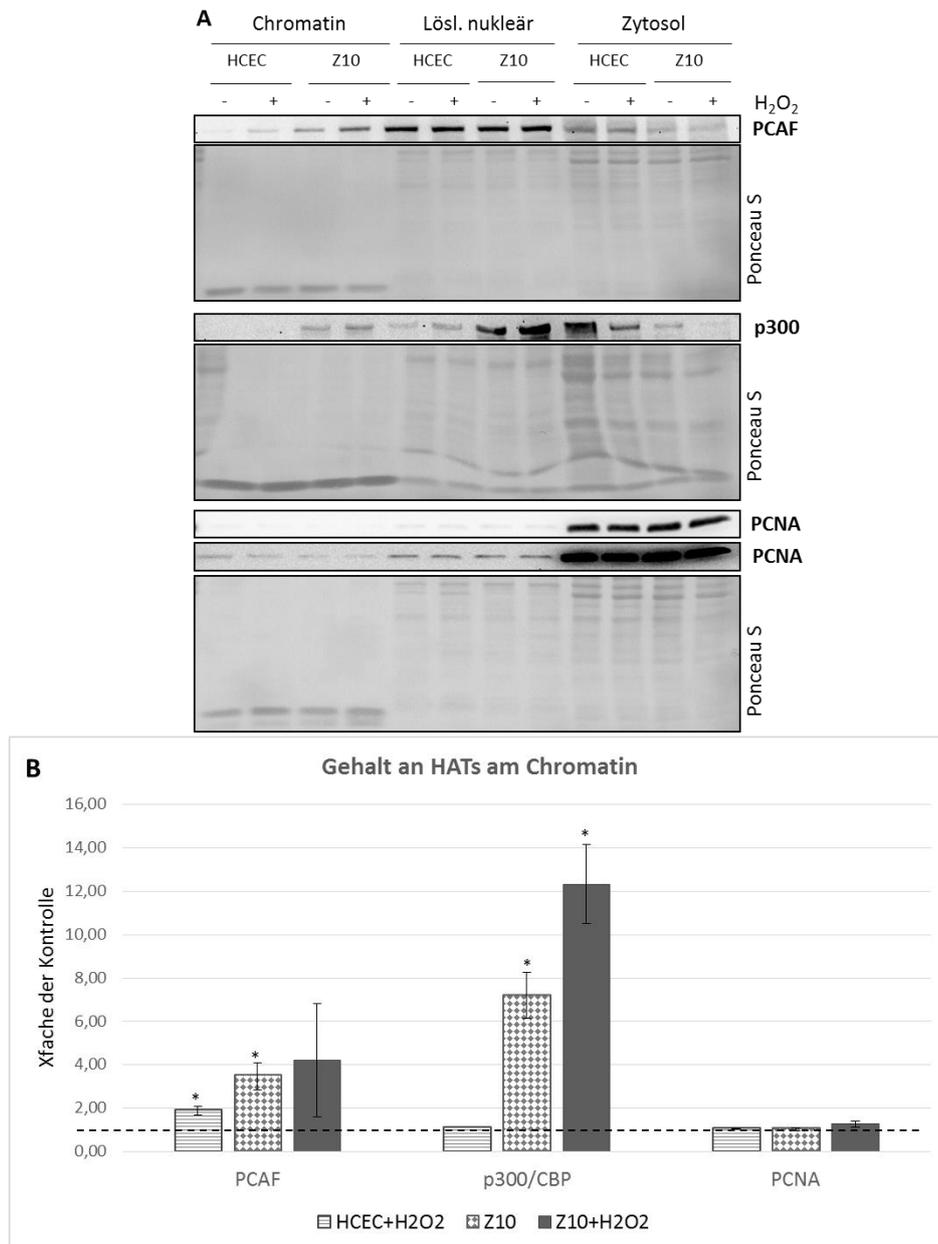


Abb. 27: Akkumulation von Histonacetylasen am Chromatin von HCEC und Z10-Zellen. (A) Beispiel Western Blot-Analyse nach Fraktionierung von HCEC und Z10-Zellen mit/ohne H₂O₂-Behandlung. Ladekontrolle Ponceau S-Färbung. (B) Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen mit Standardabweichung. Wie (A). Normiert an der Ladekontrolle und im Vergleich zu unbehandelten Kontrolle (HCEC, gestrichelte Linie, K=1.0). * p<0,05.

3.4.4 Effekte des Chk1-knockdown in den Fraktionen

Um die Abhängigkeit dieser Histonmodifikationen von Chk1 zu untersuchen, bzw. die Rolle von Chk1 als Chromatin-modifizierender Transkriptionsfaktor untersuchen zu können, wurden anschließend Fraktionierungen von HCEC und Z10-Zellen ohne und mit H₂O₂-Behandlung nach Chk1-knockdown durchgeführt und analysiert. In **Abb. 28** ist nun

für die einzelnen Fraktionen und Zelllinien der jeweilige Vergleich der Kontrolle, der siRNA-Kontrolle und des Chk1-*knockdown* mit unbehandelten HCEC dargestellt.

Es ist erkennbar (**Abb. 28**), dass es in HCEC nach H₂O₂-Behandlung zu einer Reduktion des Chk1-Levels am Chromatin kam, unabhängig vom *knockdown*. Zusätzlich kam es in der Chromatinfraction von Z10-Zellen ohne und mit H₂O₂-Behandlung zu einer deutlich Abnahme der Chk1-Menge, in Z10-Zellen auf ca. 50 % des HCEC-Niveau. In Z10-Zellen mit H₂O₂-Behandlung sank der Chk1-Level von etwa 2fach auf 1,16fach des HCEC-Niveaus. In den Fraktionen löslich-nukleärer und zytosolischer Proteine kam es in HCEC nach H₂O₂-Behandlung und Z10-Zellen ohne und mit H₂O₂-Behandlung zu einer deutlichen Reduktion von Chk1 nach *knockdown*, um 38 bis 71 %.

Der Einfluss des Chk1-*knockdowns* auf die Menge an phosphoryliertem Chk1 in den einzelnen Fraktionen ist in **Abb. 29** dargestellt. In HCEC und Z10-Zellen ohne und mit H₂O₂-Behandlung lag pChk1^{S317} am Chromatin akkumuliert vor (vgl. **Abb. 23**). Wie aus **Abb. 29** hervorgeht hatte der Chk1-*knockdown* dabei keinen Einfluss. In den Proben der löslich-nukleären Fraktionen blieb der Level an pChk1^{S317} in HCEC nach H₂O₂-Behandlung signifikant erhöht, unabhängig von der siRNA-Behandlung. In der zytosolischen Fraktion kam es in HCEC nach H₂O₂-Behandlung und siRNA-Behandlung zu einer unspezifischen, nur durch siRNA-Behandlung erzielten, leichten Zunahme an pChk1^{S317}. In Z10-Zellen gab es mit H₂O₂-Behandlung keine weitere Änderung, ohne H₂O₂-Behandlung kam es zu einer leichten Abnahme (17 %) an pChk1^{S317} nach Chk1-*knockdown*, der Level blieb aber über HCEC-Niveau.

Die Effektivität des Chk1-*knockdowns* auf den Gehalt an Chk1/pChk1^{S317} in den einzelnen Fraktionen lässt sich wie folgt zusammenfassen: In HCEC nach H₂O₂-Behandlung, in denen der Chk1-Level am Chromatin ohnehin vermindert war, gelang durch siRNA-Behandlung keine zusätzliche Reduktion des Chk1-Gehaltes am Chromatin. In Z10-Zellen, in denen Chk1 am Chromatin akkumuliert vorlag hingegen, gelang durch Chk1-*knockdown* die Reduktion des Chk1-Levels auf das Niveau der HCEC nach H₂O₂-Behandlung. Nach H₂O₂-Behandlung und *knockdown* von Z10-Zellen konnte das stark akkumuliert vorliegende Chk1 am Chromatin nahezu auf das Niveau unbehandelter HCEC reduziert werden. In den Fraktionen löslich-nukleärer und zytosolischer Proteine der drei Zelllinien/Behandlungsbedingungen konnte der Level an Chk1 um mindestens 38 % unter HCEC-Niveau reduziert werden. Bezüglich des generell in HCEC, Z10-Zellen ohne und mit H₂O₂-Behandlung erhöht vorliegenden pChk1^{S317}-Levels konnte durch den *knockdown*, abgesehen von Z10-Zellen im Zytosol, keine Reduktion erzielt werden. Alle nach Chk1-*knockdown* untersuchten und als divergent ermittelten Histonmodifikationen sind somit auf den veränderten Chk1-Level zurück zu führen, da die Phosphorylierung offenbar unbeeinflusst stattfand.

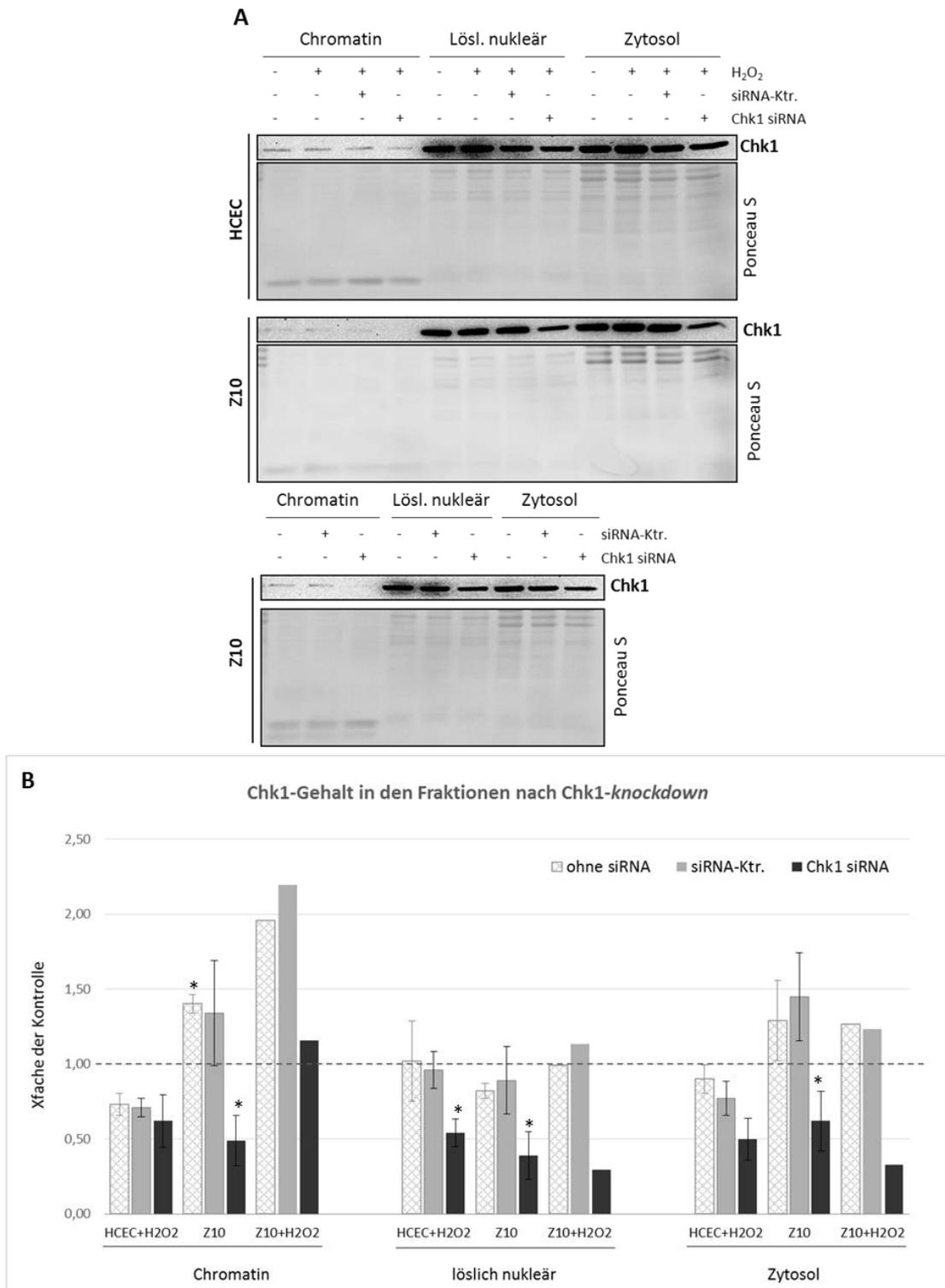


Abb. 28: Chk1-Gehalt am Chromatin von HCEC und Z10-Zellen nach Chk1-knockdown. (A) Beispiel Western Blot-Analyse nach Fraktionierung von HCEC und Z10-Zellen mit/ohne H₂O₂-Behandlung und Chk1-knockdown. Ladekontrolle Ponceau S-Färbung. (B) Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen mit Standardabweichung. Wie (A). Normiert an der Ladekontrolle und im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (gestrichelte Linie, K=1.0). Chromatin: chromatingebundene Fraktion, löslich-nukleär: nukleär gelöst vorliegende Proteine, Zytosol: zytosolische Proteinfraction. * p<0,05.

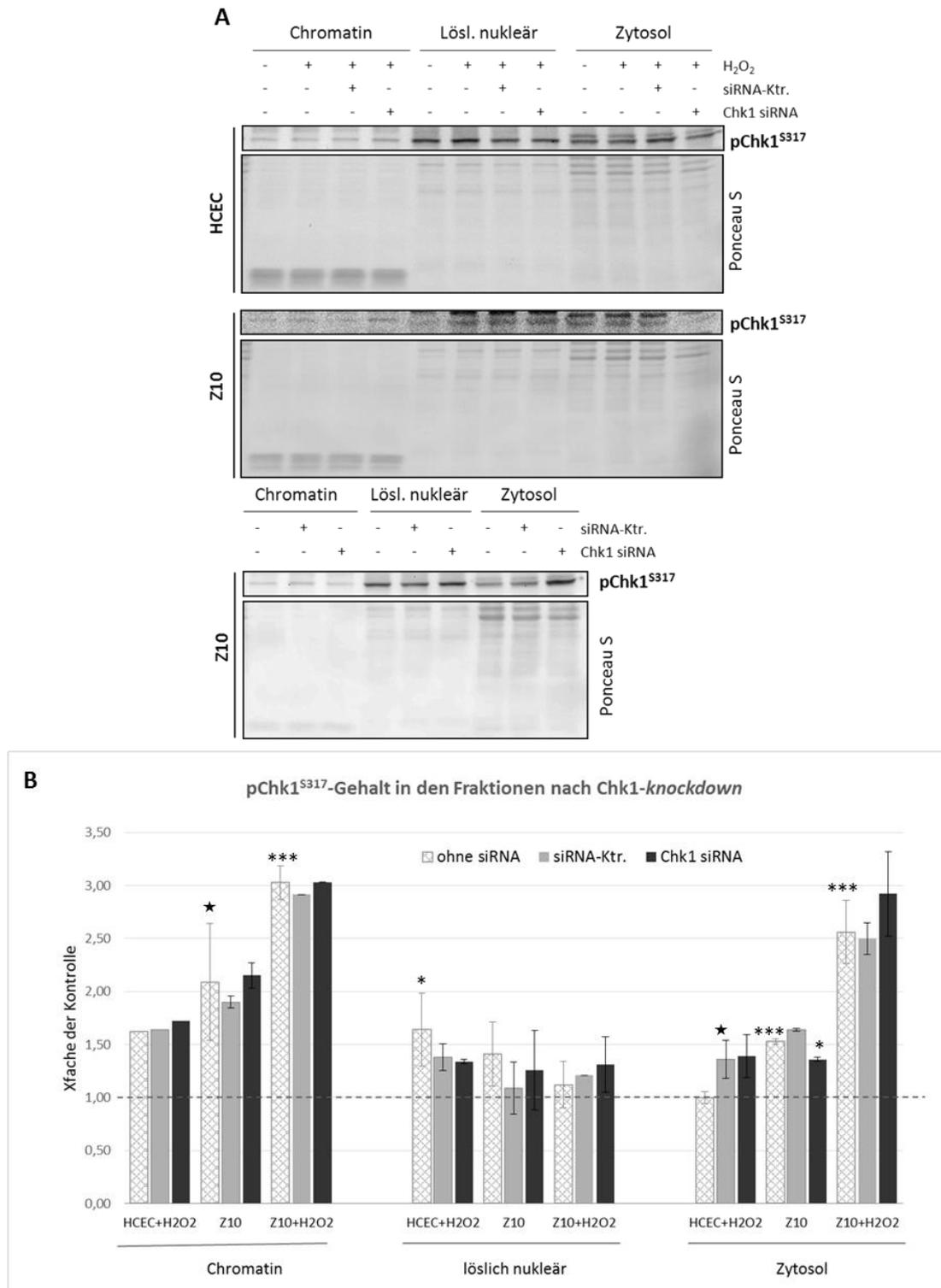


Abb. 29: pChk1^{S317}-Gehalt am Chromatin von HCEC und Z10-Zellen nach Chk1-knockdown. (A) Beispiel Western Blot-Analyse nach Fraktionierung von HCEC und Z10-Zellen mit/ohne H₂O₂-Behandlung und Chk1-knockdown. Ladekontrolle Ponceau S-Färbung. **(B)** Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen mit Standardabweichung. Wie (A). Normiert an der Ladekontrolle und im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (gestrichelte Linie, K=1.0). GZL: Ganzzelllysat, Chromatin: chromatingebundene Fraktion, löslich-nukleär: nukleär gelöst vorliegende Proteine, Zytosol: zytosolische Proteinfraction. * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001; ★ p=0,054/0,058.

3.4.5 Abhängigkeit der Histonmodifikationen von Chk1

Nach der Ermittlung der Chk1- und pChk1^{S317}-Level in den Fraktionen nach Chk1-*knockdown* wurde untersucht, ob eine veränderte Rekrutierung bzw. transkriptionelle Aktivierung histonmodifizierender Proteine im Sinne von Shimada *et al.* vorlag. Daher werden nachfolgend die relevanten Histonmodifikationen und die Proteinlevel potentiell beteiligter HATs vor und nach Chk1-*knockdown* miteinander verglichen.

Die Untersuchung der pH3^{T11}- und GCN5-Level nach Chk1-*knockdown* (**Abb. 30** bis **Abb. 31**) ergab keine Änderung des pH3^{T11}-Levels in HCEC nach H₂O₂-Behandlung, entsprechend der nach Chk1 siRNA-Behandlung unveränderten CHK1- und pChk1^{S317}-Level (vgl. **Abb. 28** und **Abb. 29**). Der erfolgreiche Chk1-*knockdown* in Z10-Zellen ohne und mit H₂O₂-Behandlung hatte keinen Einfluss auf den pH3^{T11}-Level am Chromatin (**Abb. 30**).

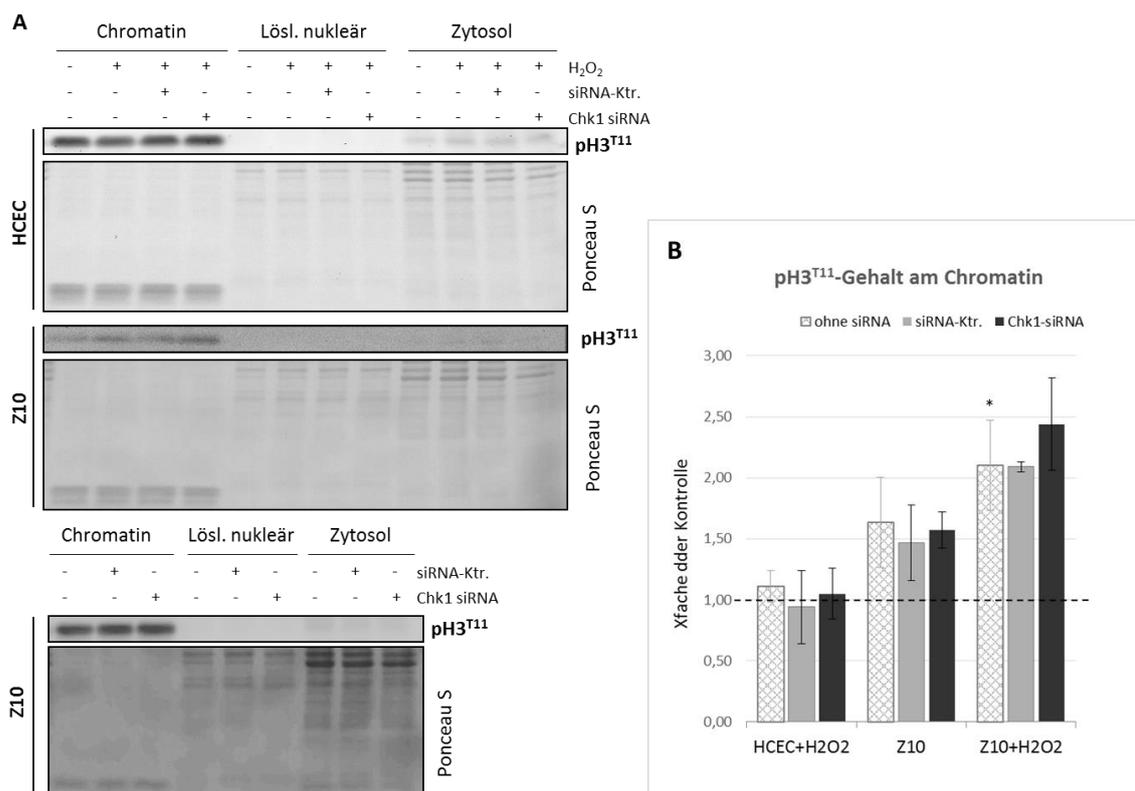


Abb. 30: pH3^{T11}-Gehalt am Chromatin von HCEC und Z10-Zellen nach Chk1-*knockdown*.

(A) Beispiel Western Blot-Analysen nach Fraktionierung von HCEC und Z10-Zellen mit/ohne H₂O₂-Behandlung und Chk1-*knockdown*. Ladekontrolle Ponceau S-Färbung. (B) Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen mit Standardabweichung. Wie (A). Normiert an der Ladekontrolle und im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (gestrichelte Linie, K=1.0). * p<0,05.

Die Menge an GCN₅ in der Chromatinfraktion, die in HCEC nach H₂O₂-Behandlung und Z10-Zellen erhöht vorlag (vgl. **Abb. 25**), blieb auch nach Chk1-*knockdown* auf dem gleichen hohen Level. Nach H₂O₂-Behandlung in den Z10-Zellen kam es zu einem weiteren starken Anstieg des zuvor ebenfalls erhöhten Levels an GCN₅ in der Chromatinfraktion nach Chk1-*knockdown* auf mehr als das Doppelte der Kontrolle. In den Fraktionen löslich-nukleärer bzw. zytosolischer Proteine kam es, wie schon zuvor (vgl. **Abb. 25**) zu keinerlei Änderungen der GCN₅-Level.

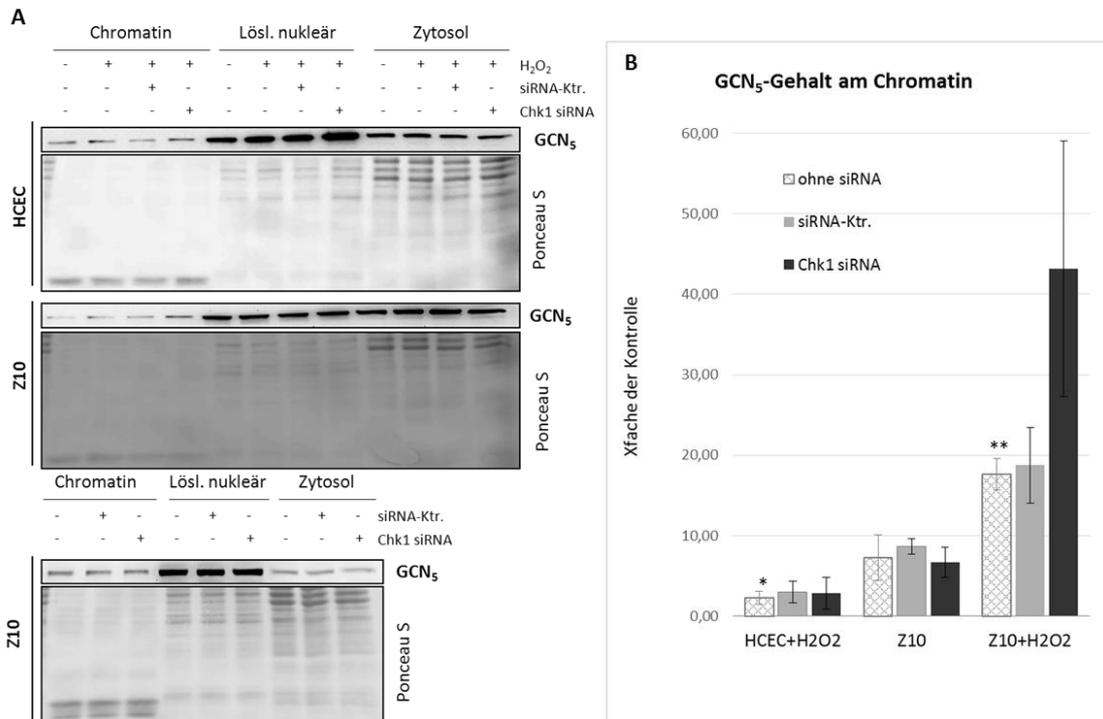


Abb. 31: GCN₅-Gehalt am Chromatin von HCEC und Z10-Zellen nach Chk1-*knockdown*.

(A) Beispiel Western Blot-Analysen nach Fraktionierung von HCEC und Z10-Zellen ohne/mit H₂O₂-Behandlung und Chk1-*knockdown*. Ladekontrolle Ponceau S-Färbung.

(B) Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen mit Standardabweichung. Wie (A). Normiert an der Ladekontrolle und zu unbehandelten Kontrolle (gestrichelte Linie, K=1.0).

* p<0,05; ** p<0,01.

Histon H3 blieb an K⁹ auch nach Chk1-*knockdown* in HCEC nach H₂O₂-Behandlung auf HCEC-Niveau acetyliert (**Abb. 31**). Auch in Z10-Zellen und Z10-Zellen nach H₂O₂-Behandlung gab es keine Änderung der Level an acH₃^{K⁹} nach Chk1-*knockdown* im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (**Abb. 32**).

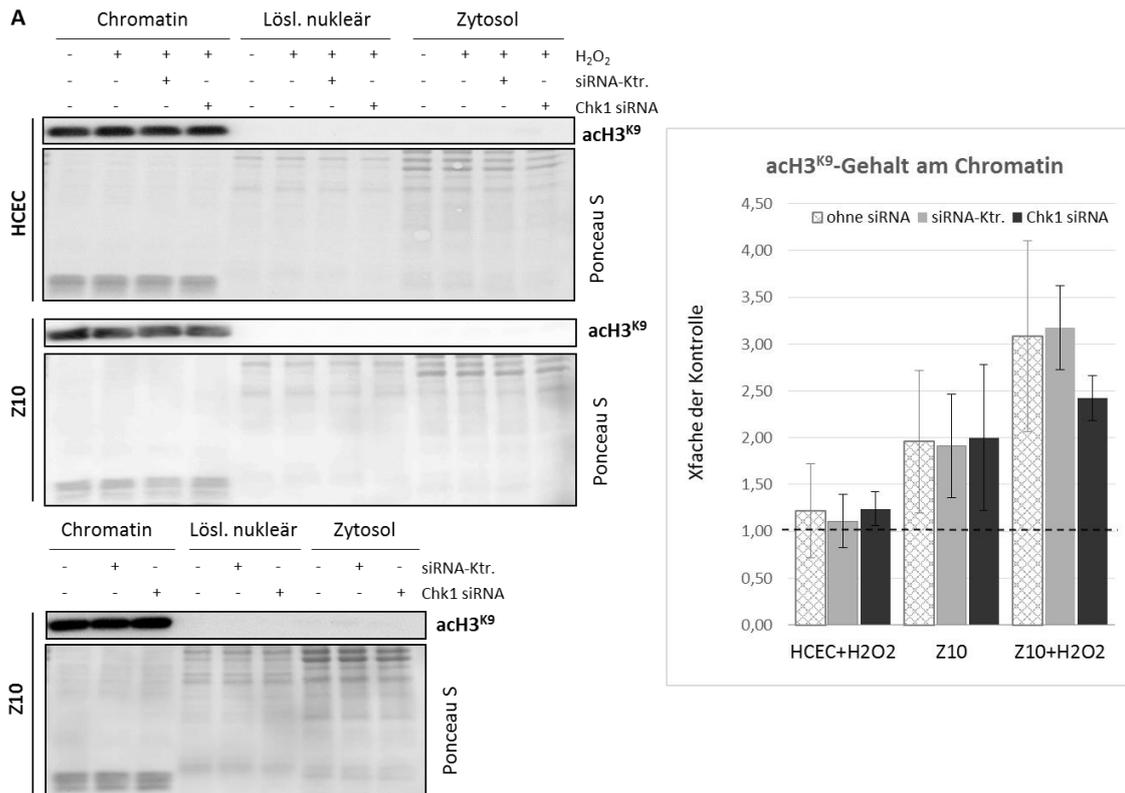


Abb. 32: acH3^{K9}-Gehalt am Chromatin von HCEC und Z10-Zellen nach Chk1-knockdown.

(A) Beispiel Western Blot-Analysen nach Fraktionierung von HCEC und Z10-Zellen mit/ohne H₂O₂-Behandlung und Chk1-knockdown. Ladekontrolle Ponceau S-Färbung.

(B) Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen mit Standardabweichung. Wie (A). Normiert an der Ladekontrolle und zu unbehandelten Kontrolle (gestrichelte Linie, K=1.0).

* p<0,05.

Andere Lysinreste an H3 (**Abb. 33**) wurden nach Chk1-knockdown in HCEC nach H₂O₂-Behandlung unverändert acetyliert. In Z10-Zellen kam es nach siRNA-Behandlung unspezifisch zu einem Abfall des acH3-Niveaus nahezu auf HCEC-Niveau. In Z10-Zellen nach H₂O₂-Behandlung führte die siRNA-Behandlung zu einem Anstieg der acH3-Level im Vergleich zu HCEC. Die Acetylierung an H4 (**Abb. 34**) war in HCEC nach H₂O₂-Behandlung und Chk1-knockdown unbeeinflusst, in Z10-Zellen kam es unspezifisch zu einem Anstieg nach siRNA-Behandlung, aber keiner Änderung nach Chk1-knockdown. Nach H₂O₂-Behandlung von Z10-Zellen stieg die Acetylierung an H4 signifikant an. Nach Chk1-knockdown wurde acH4 geringer, 1,69fach statt 2,43fach, acetyliert.

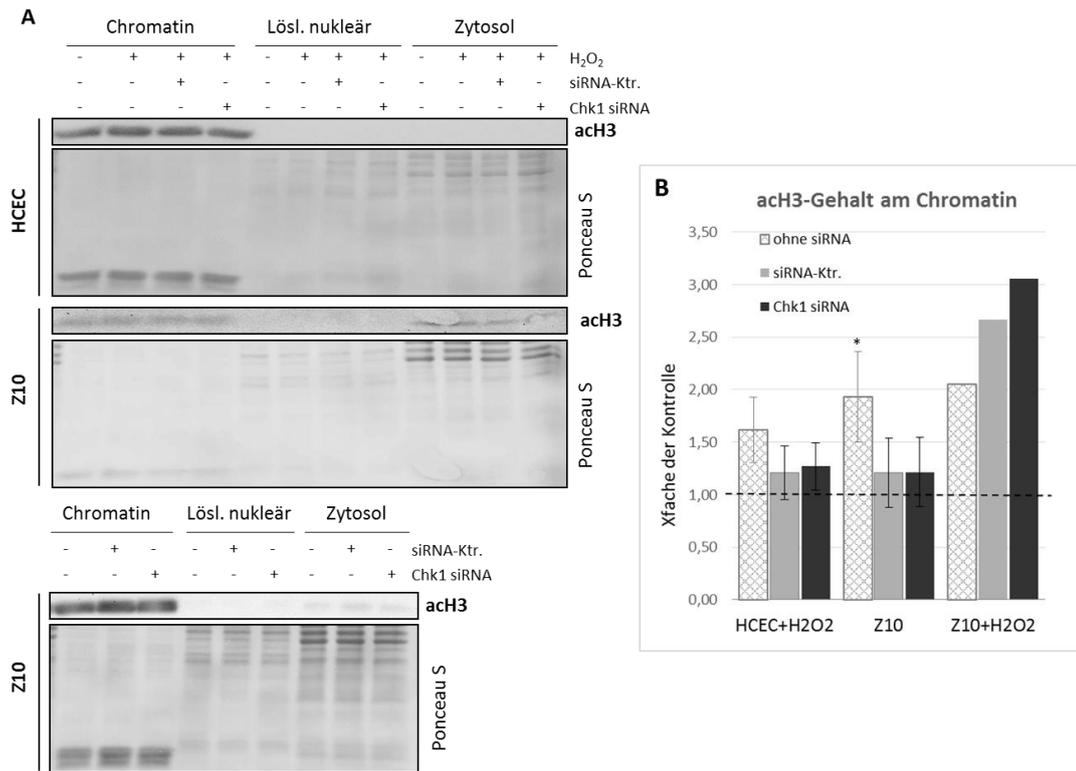


Abb. 33: acH3-Gehalt am Chromatin von HCEC und Z10-Zellen nach Chk1-knockdown.
(A) Beispiel Western Blot-Analysen nach Fraktionierung von HCEC und Z10-Zellen mit/ohne H₂O₂-Behandlung und Chk1-knockdown. Ladekontrolle Ponceau S-Färbung.
(B) Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen mit Standardabweichung. Wie (A). Normiert an der Ladekontrolle und zu unbehandelten Kontrolle (gestrichelte Linie, K=1.0).
 * p<0,05.

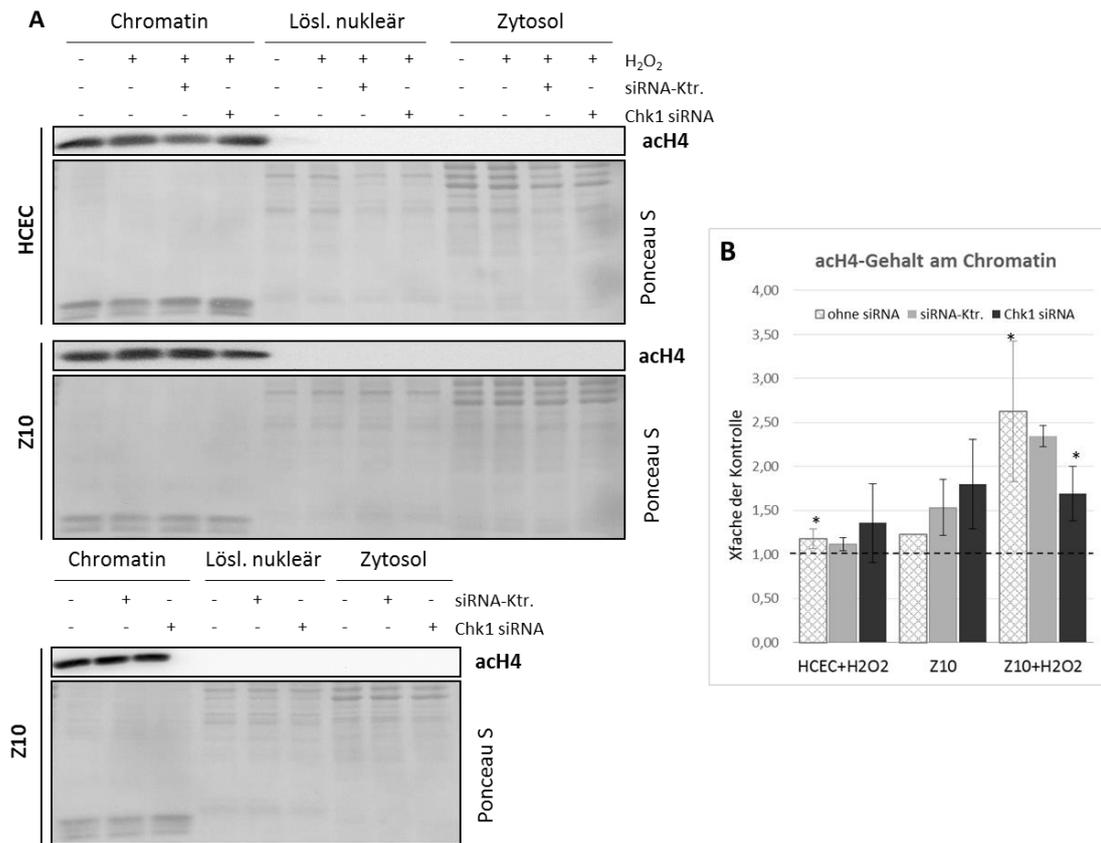


Abb. 34: acH4-Gehalt am Chromatin von HCEC und Z10-Zellen nach Chk1-knockdown.
(A) Beispiel Western Blot-Analysen nach Fraktionierung von HCEC und Z10-Zellen mit/ohne H₂O₂-Behandlung und Chk1-knockdown. Ladekontrolle Ponceau S-Färbung.
(B) Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen mit Standardabweichung. Wie (A). Normiert an der Ladekontrolle und zu unbehandelten Kontrolle (gestrichelte Linie, K=1.0).
 * p<0,05.

In HCEC nach H₂O₂-Behandlung blieb der Level an der Histonacetyltransferase PCAF auch nach Chk1-knockdown unverändert im Vergleich zu HCEC (**Abb. 35**, vgl. **Abb. 27**). In den Z10-Zellen lag der Level an PCAF signifikant erhöht vor im Vergleich zu HCEC, unabhängig von Chk1. Nach H₂O₂-Behandlung von Z10-Zellen allerdings kam es Chk1-spezifisch zu einem Abfall des zuvor mehr als 4fachen Levels an PCAF auf das 2,12fache der Kontrolle.

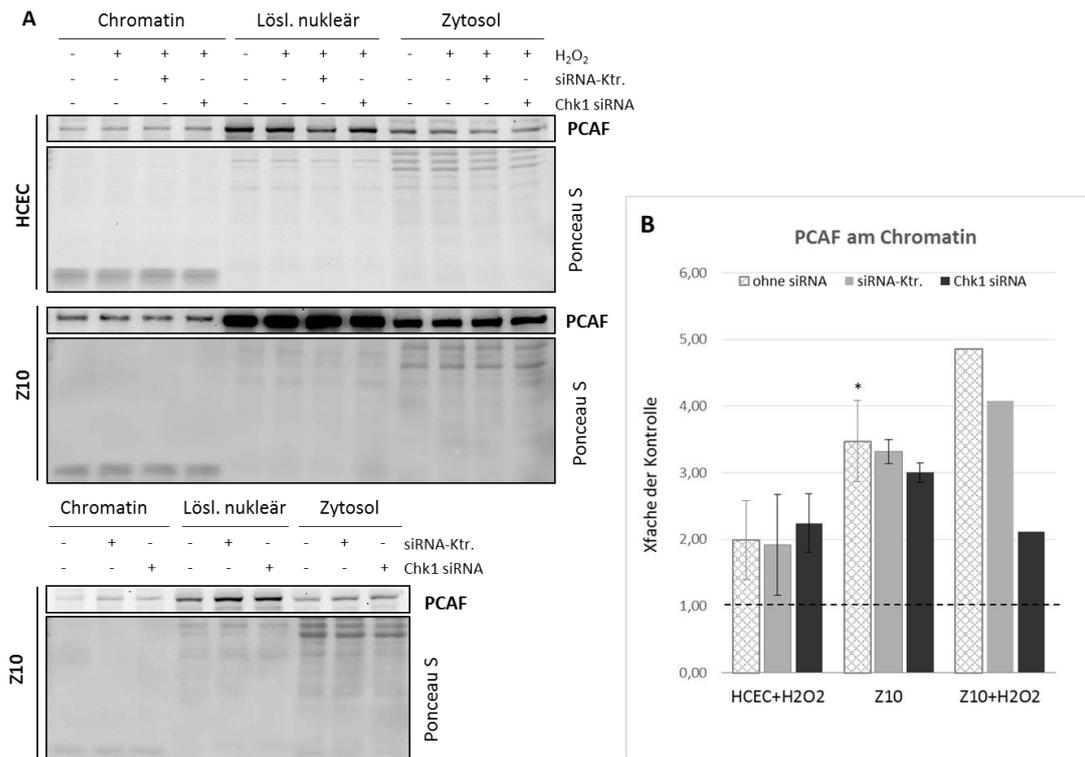


Abb. 35: PCAF-Gehalt am Chromatin von HCEC und Z10-Zellen nach Chk1-knockdown.
(A) Beispiel Western Blot-Analyse nach Fraktionierung von HCEC und Z10-Zellen mit/ohne H₂O₂-Behandlung und Chk1-knockdown. Ladekontrolle Ponceau S-Färbung.
(B) Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen mit Standardabweichung. Wie (A). Normiert an der Ladekontrolle und zu unbehandelten Kontrolle (gestrichelte Linie, K=1.0).
 * p<0,05.

Die Ergebnisse der untersuchten Abhängigkeit der Histonmodifikationen und Histonacetyltransferasen von Chk1 können für die Chromatinfractionierung wie folgt zusammengefasst werden: Die erhöhten Level an pH3^{T11} in Z10-Zellen ohne und mit H₂O₂-Behandlung erwiesen sich als Chk1-unabhängig. Allerdings wurde, trotz des nahezu gleich stark erhöhten Levels an pH3^{T11}, GCN5 in H₂O₂-behandelten Z10-Zellen Chk1-abhängig stärker ans Chromatin rekrutiert bzw. dort gebunden. Die Acetylierung von H3^{K9} blieb in HCEC mit H₂O₂-Behandlung und in Z10-Zellen gleich, war in Z10-Zellen mit H₂O₂-Behandlung Chk1-abhängig reduziert. An anderen Lysinresten wurde H3 nur in Z10-Zellen nach H₂O₂-Behandlung Chk1-abhängig stärker acetyliert. Für H4 ergab sich Chk1-abhängig für HCEC mit H₂O₂-Behandlung und Z10-Zellen keine veränderte Acetylierung. Für Z10-Zellen nach H₂O₂-Behandlung zeigte sich eine Chk1-abhängig verminderte Acetylierung. Auch die HAT PCAF blieb in HCEC mit H₂O₂-Behandlung und in Z10-Zellen gleichstark am Chromatin assoziiert. Lediglich in Z10-Zellen mit H₂O₂-Behandlung kam es Chk1-abhängig zu einer Reduktion des entsprechenden Levels.

4 DISKUSSION

Der bereits 1863 von Rudolf Virchow vermutete Zusammenhang zwischen Entzündung und Karzinogenese wurde seitdem durch viele klinische und epidemiologische Studien bestätigt. Die Entzündung als ein Merkmal von Krebs ist nachweislich ein wichtiger Faktor für die Tumorpromotion, -invasion und Metastasierung (Balkwill und Mantovani, 2001; Hussain und Harris, 2007; Mantovani et al., 2008). Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen (CED) wurden bereits 2003 von Hussein et al. als „*oxyradical overload disease*“ bezeichnet (Hussain et al., 2003). Besonders ROS und RNS spielen eine bedeutende Rolle in der Tumorgenese (Terzic et al., 2010). Der oxidative Stress in CED, ausgelöst durch die Entzündung, und die verminderte antioxidative Abwehr führen zu Schäden am kolorektalen Epithel (Mitamura et al., 2002; Baumgart und Carding, 2007; Bülbül et al., 2014). Die erhöhte Permeabilität der Mukosa begünstigt weiterhin DNA-Schäden durch Karzinogene. Auch die entzündungsbedingt erhöhte Zellumsatzrate führt zu Replikationsfehlern und beschleunigt epigenetische Veränderungen (Seril et al., 2003), und begünstigt so die maligne Transformation. Bis heute konnte allerdings die Frage, ob Entzündung allein zur Tumoruminitiation genügt, nicht ausreichend beantwortet werden (Coussens und Werb, 2002).

In dem von Dr. A. Pöhlmann entwickelten zellulären *in vitro* Modell der Colitis Ulcerosa mit oxidativem Stress-simulierendem H_2O_2 legten erste Untersuchung eine durch die akute Behandlung aktivierte DNA-Schadenskontrolle in HCEC offen, resultierend in Zellzyklusarresten (S, G2/M), und der Aktivierung des JNK-Signalweges und des Zellzyklusregulators $p21^{WAF1}$. Infolge der Simulation chronischen Stresses konnten bereits nach wenigen Behandlungszyklen in den generierten Zelllinien (Z-Zellkulturen) Zeichen einer malignen Transformation beobachtet werden (Poehlmann et al., 2013b). Neben dem Verlust der Zell-Zell-Kontaktinhibition und der Überwindung der Seneszenz kam es zu einer erhöhten Proliferationsrate (Poehlmann et al., 2013b). Die Untersuchung der, nach oxidativem Stress zugrundeliegenden molekularen Mechanismen, ergab nach Ausschluss für kolorektale Karzinome bekannter, genetischer Alterationen intrazellulär erhöhte ROS-Level und eine veränderte Signaltransduktion in den Colonepithelzelllinien (Z-Zellkulturen) (Poehlmann et al., 2013a; Poehlmann et al., 2013b). Die veränderte JNK-Aktivierung, $p21^{WAF1}$ -Herabregulation und $\gamma H2A.X$ -Reduktion führten offenbar zur Maskierung des induzierten DNA-Schadens. Weiterhin wurde die Hochregulation von Zellzyklusregulatoren, proinflammatorischer Zytokine und onkogener Transkriptionsfaktoren ermittelt (Poehlmann et al., 2013b).

Da die Proliferation der Z-Zellkulturen trotz DNA-Schäden die Umgehung der DNA-Schadenskontrolle erfordert und bereits die Überwindung der Zellzyklusarreste G1/S und intra-S als JNK- und Caspase-abhängig gezeigt werden konnten (Poehlmann et al., 2013a; Poehlmann et al., 2013b), stellte sich die Frage, wie verbleibende

Zellzykluskontrollpunkte in den Z-Zellkulturen umgangen werden konnten, um die Zellzyklusprogression voranzutreiben. Aufgrund der Bedeutung von Chk1 in der DNA-Schadens- und der Zellzykluskontrolle sollten in der vorliegenden Arbeit weitere molekulare Mechanismen der veränderten Signaltransduktion und Zellzyklusregulation in Abhängigkeit von Chk1 untersucht werden. Zusätzlich sollte die erst kürzlich beschriebene Rolle von Chk1 in der Chromatinmodulation im Zusammenhang mit der Bindung onkogener Transkriptionsfaktoren ermittelt werden.

4.1 Rolle von Chk1 im Modell der akuten Entzündung

Für das Modell der akuten Entzündungssituation konnte bisher die Aktivierung des JNK-Signalweges durch pJNK-Hochregulation und pJNK-abhängige Zellzyklusarreste S und G2/M gezeigt werden (Poehlmann et al., 2013a). Die erhöhten Level der pJNK-regulierten Proteine γ H2A.X und p21^{WAF1} führten zur Schadensmeldung und zum Zellzyklusarrest. Die ebenfalls durch pJNK regulierten Caspasen wurden wie auch JNK mit einer anti-apoptotischen Funktion assoziiert (Poehlmann et al., 2013a). Zusammen vermittelten beide außerdem den Übergang der Kontrollpunkte G1/S und Intra-S und verhinderten zunächst Apoptose nach oxidativem Stress. Der später resultierende G2/M-Arrest konnte nicht überwunden werden, sondern es kam zum apoptotischen Zelltod aus dieser Zellzyklusphase.

Der durch Behandlung mit H₂O₂ simulierte, akute oxidative Stress aktivierte in HCEC den zumeist ATR-abhängigen Schadenssensor Chk1 durch Phosphorylierung an S317 und S345 (3.1.1). Gleichzeitig wurde der Chk1-Protein-Level reduziert. Im Allgemeinen werden der Aktivierung von Chk1 vielfältige Bedeutungen beigemessen. pChk1^{S317} reguliert den mitotischen Spindelkontrollpunkt, den Fortlauf der Replikation, stabilisiert die Replikationsgabel und regelt so den Mitosestartzeitpunkt (Sanchez et al., 1997; Walker et al., 2009; Chen et al., 2012). Infolge von DNA-Schäden vermittelte Chk1 die Aktivierung der Zellzykluskontrollpunkte G1/S, Intra-S und G2/M (Dai und Grant, 2010; Poehlmann und Roessner, 2010). Da durch H₂O₂ in HCEC nachweislich DNA-Schäden und S- und G2/M-Zellzyklusarreste induziert worden waren (Poehlmann et al., 2013a), ist davon auszugehen, dass Chk1 am S- und/oder G2/M-Kontrollpunkt ATR-abhängig, oder infolge stockender Replikation durch induzierte DNA-Schäden an S317/S345 aktiviert wurde. Eine parallele Aktivierung von JNK und Chk1 nach DNA-Schäden war bereits von Wang *et al.* gezeigt worden (Wang et al., 2009b). Durch Phosphorylierung an S1981 aktiviertes ATM vermochte sowohl den Chk1/2-Signalweg, der zum Zellzyklusstopp (G2/M-Arrest) führte, als auch parallel den JNK-Signalweg, der über Phosphorylierung von H2A.X an S139 Apoptose einleitete, zu aktivieren. Somit konnte ATM die Schadensmeldung durch H2A.X-Phosphorylierung direkt, und indirekt über JNK-Signalweg regulieren.

Die Tatsache, dass nur in p53-kompetenten, nicht-transformierten Zellen die alleinige Aktivierung von Chk1, p38 oder JNK für die Induktion und Aufrechterhaltung der Arreste nach Replikationsstress genügte (Llopis et al., 2014b), in HCEC und Z-Zellkulturen aber p53 inaktiv vorlag, untermauert die Vermutung, dass in diesen Zellen ein Zusammenspiel bzw. eine gegenseitige Regulation von JNK und Chk1 für die korrekte Zellzykluskontrolle notwendig ist. Für eine wechselseitige Regulation der beiden Proteine spricht weiterhin die Tatsache, dass die Chk1-Aktivierung in HCEC nach akut induziertem Stress als JNK-abhängig supprimiert ermittelt (3.1.4) und die als pJNK-abhängig gezeigte DNA-Schadensantwort in HCEC nach akutem Stressreiz als Chk1-supprimiert gezeigt wurde (3.1.2). Im Einzelnen wurden 24 h nach Chk1-*knockdown* stressreizspezifisch (3.1.2) JNK p54, pJNK p46 und p54 stärker aktiviert bzw. hochreguliert. Auch die pJNK-Targets γ H2A.X als DNA-Schadensmarker, p21^{WAF1} als Zellzyklusregulator, H2A.X und der Transkriptionsfaktor c-Jun wurden verstärkt exprimiert, letzterer auch stärker durch Phosphorylierung an S63 aktiviert. Auch 48 h nach der Behandlung lagen pJNK p46 (bis 72 h), pc-Jun^{S63} und γ H2A.X verstärkt vor. Chk1 supprimiert somit trotz seines geringen Levels, vermutlich aber aufgrund seiner stärkeren Aktivierung z. T. die DNA-Schadensantwort über pJNK in HCEC nach oxidativen Stress, was eine Akkumulation von DNA-Schäden ermöglichen könnte. Durch die Suppression des DNA-Schadensmarkers und Reparaturproteins γ H2A.X, vermutlich über die pJNK-Suppression, sorgt Chk1 für eine verminderte Schadensmeldung. Gleichzeitig wird durch die Reduktion von p21^{WAF1} die Zellzykluskontrolle erschwert. 24 h nach akuter H₂O₂-Behandlung befand sich der Großteil der HCEC in der S-Phase (Arrest), in dem Chk1, wie von Syljuåsen *et al.* gezeigt, zur Vermeidung aberranter Replikationsereignisse eine wichtige Rolle spielt. Durch Behandlung mit unterschiedlichen Chk1-Inhibitoren oder Chk1-siRNA konnte die Forschergruppe um Syljuåsen u. a. in kolorektalen Zellen zeigen, dass S-Arrest-abhängig über CDK2 die erhöhte Bindung des Replikationsmarkers RPA stattfand. Dadurch wurden weitere ATR-*targets* wie Chk1 selbst (S317), p53, vor allem aber H2A.X ATM-unabhängig phosphoryliert (Syljuåsen et al., 2005; Goto et al., 2012). Durch die fehlende Kontrolle in der S-Phase bei Chk1-*knockdown* oder -Inhibition kam es zügig zur Replikation, was zu massiver CDK2-abhängiger H2A.X-Phosphorylierung führte gefolgt von der Induktion massiver DNA-Strangbrüche. Gemäß Syljuåsen *et al.* wäre denkbar, dass in akut gestressten HCEC, die sich in der S-Phase befinden, nach Chk1-*knockdown* die massive H2A.X-Phosphorylierung tatsächlich z. T. durch pJNK-Induktion oder aber CDK2/ATR-abhängig aufgrund des reduzierten Chk1-Levels induziert wurde. Untermauert werden kann Letzteres auch durch Daten nach Chk1-siRNA- und ohne H₂O₂-Behandlung (3.1.2). Der Chk1-*knockdown* ohne stressinduzierte JNK-Aktivierung und DNA-Schäden führte zu massiver H2A.X-Aktivierung. Somit könnte die ermittelte Chk1-abhängige Suppression der H2A.X-Aktivierung zum einen, bedingt durch den zusätzlich reduzierten Chk1-Level aufgrund der siRNA-Behandlung, ATR-abhängig, und zum anderen über die Chk1-abhängige Suppression der JNK-Aktivierung erfolgen. Die reduzierten Chk1-Level in HCEC nach akut induziertem oxidativem Stress würden somit zusätzlich zur möglichen

Akkumulation von DNA-Schäden beitragen. Gleichzeitig würde gerade durch Chk1-*knockdown* die Aktivierung von Chk1 getriggert werden. Von daher ist es nicht verwunderlich, dass pChk1^{S317} auch bei geringen Chk1-Leveln auf einem relativ hohen Niveau bleibt.

Im Allgemeinen ist Chk1 nicht essentiell für den G2-Arrest nach anhaltendem DNA-Schaden in ATM/p53/p21- intakten Zellen, p21 hingegen schon (Lossaint et al., 2011). In Zellen, in denen die ATM/p53/p21-Achse gestört ist, wird Chk1 allerdings essentiell für den G2-Arrest, da ein *crossstalk* zwischen p21^{WAF1} und Chk1 ein Umschalten der Abhängigkeit auf Chk1 möglich macht (Reinhardt et al., 2007; Lossaint et al., 2011). Da in HCEC SV40-induziert p53 inaktiv vorliegt, muss von einer gestörten ATM/p53/p21-Achse ausgegangen werden, was die Bedeutung von Chk1 für den G2-Arrest unterstreicht. In akut gestressten HCEC konnte nach Chk1-*knockdown* allerdings nur eine minimale Beteiligung von Chk1 an der Ausbildung der Arreste ausgemacht werden (3.1.3), da die Zellzyklusverteilung nahezu unverändert blieb. Es ist anzumerken, dass an S317 aktiviertes Chk1 durch Chk1-*knockdown* dabei wie gesamt-Chk1 ebenfalls nur um etwa ein Viertel von 198 % auf einen weiterhin hohen Level von 150 % reduziert wurde. Da die Zellzykluskontrolle im Allgemeinen durch die aktivierte Variante pChk1^{S317} ausgeübt wird (Liu et al., 2000; Bartek und Lukas, 2003) und diese Form von Chk1 im zellulären Modell, auch nach *knockdown*, erhöht blieb, kann angenommen werden, dass pChk1^{S317}-Abhängigkeiten im G2/M-Arrest aufgrund der geringen Reduktion nicht gezeigt werden konnten. Da zudem JNK-Inhibitor-Studien am zellulären Modell eine pJNK-abhängige Teilsuppression von pChk1^{S317/S345} in HCEC nach akut induziertem oxidativen Stress aufzeigten, ist weiterhin anzunehmen, dass eine gegenseitige Regulation der Signalwege vorliegt. Außerdem ist denkbar, dass infolge von verlangsamter Replikation, das frühzeitig aktivierte Chk1 seiner Funktion gerecht werdend Zellzyklusarreste einleitet, die, begründet durch inaktives p53, durch später aktiviertes JNK unterstützt und aufrecht erhalten werden (Llopis et al., 2014b). Chk1 wird in ATR-abhängiger Weise eine Rolle in der Aufrechterhaltung des G2/M-Arrestes zugesprochen (Liu et al., 2000; Takai et al., 2000; Brown, 2003; Shibata et al., 2010; Llopis et al., 2014a). Da es langfristig in HCEC nach H₂O₂-Behandlung allerdings nicht zu ausreichender Reparatur sondern zur Apoptose kommt (Poehlmann et al., 2013a), scheint der Schadenslevel nicht tolerierbar und irreparabel. Des Weiteren kann auch ein Fehler in der Reparatur zur Aufhebung des Arrestes führen. Die Funktion von Chk1 in der Aufrechterhaltung des Arrestes ist auch abhängig von Fehlern die in der homologen Replikation verankert sind (Shaltiel et al., 2015). So kann der G2-Kontrollpunkt nicht aufrechterhalten werden, wenn Proteine, die die parallele Annäherung der DNA-Moleküle vermitteln, fehlen (Menzel et al., 2011). Weiterhin kann die zusätzliche Unterstützung durch ATR-abhängige Aktivierung von p38 in HCEC nicht greifen, da kein p-p38 in HCEC nach induziertem oxidativen Stress detektiert werden konnte (Poehlmann

et al., 2013a). Somit kommt es unweigerlich zur Häufung von DNA-Schäden, die zur Induktion der Apoptose führen.

4.2 Rolle von Chk1 im Modell der chronischen Entzündung

Für das Modell der chronischen, nicht aktiven Colitis Ulcerosa, die Z-Zellkulturen, wurden in Pöhlmann et al. 2013b eine durch extrazelluläre ROS induzierte intrazelluläre ROS-Bildung nachgewiesen. Weiterhin wurden die generelle p21^{WAF1}- und γ H2A.X-Herunterregulation trotz DNA-Schaden publiziert. Zusätzlich waren die positiven Zellzyklusregulatoren CDK6 und Zyklin D2 überexprimiert, ebenso wie β -Catenin und die Onkogene *c-Myc* und *c-Fos*. Die gesteigerte Proliferation der Z-Zellkulturen und der Verlust der Zell-Zell-Kontakthemmung wurden auf eine dysregulierte JNK-Aktivierung zurückgeführt, da JNK und p-JNK p54 in den Z-Zellkulturen permanent vermindert vorlagen, p-JNK p46 jedoch verstärkt aktiviert wurde. Die verminderte p-JNK-p54-Expression ist dabei vermutlich auf die verminderte Caspasen-Expression zurückzuführen. Zusammenfassend ließ sich feststellen, dass die Maskierung des DNA-Schadens, die Herabregulation von Zellzykluskontrollproteinen und die Hochregulation entsprechender Zytokine und Zykline zu gesteigerter Proliferation führten und die Zelltransformation vorantrieben (Poehlmann et al., 2013b).

Die erhöhte Proliferation der Z-Zellkulturen trotz DNA-Schaden und deren Zellzyklusverteilungen, die sich nicht von denen unbehandelter HCEC unterschieden, erfordern den ständigen proliferativen Stimulus durch z. B. intrazelluläre ROS-Bildung und die Überwindung der Zellzykluskontrolle. Bei Letzterem können zum einen Schadensmelder und zum anderen Kontrollpunktregulatoren dysreguliert vorliegen. Eine veränderte Zellzykluskontrolle der JNK- und Caspase-abhängigen Kontrollpunkte G1 und S und die verminderte Schadensmeldung durch γ H2A.X-Herunterregulation führen vermutlich zunächst zur Akkumulation von DNA-Schäden. Die Überwindung der Zellzykluskontrollpunkte G2/M, Replikations- und mitotischer Spindelkontrollpunkt könnte durch Chk1 reguliert werden, welches hier eine wichtige Rolle ausübt (Zachos et al., 2007; Matsuyama et al., 2011; Goto et al., 2012).

Bei vermindertem Gesamtlevel, konnte Chk1 trotz konstitutiver Aktivierung in den Z-Zellkulturen keine Zellzyklusarreste induzieren (3.3.3). Zwar wurde kürzlich von Llopis *et al.* gezeigt, dass auch eine ATR-unabhängige p38- und JNK-Aktivierung in Abwesenheit von Chk1 zum Zellzyklusarrest nach Replikationsschäden durch Inaktivierung der Zykline B1/Ckd1 am Übergang der G2/M-Phase führen kann (Llopis et al., 2014a). Jedoch lag in den Z-Zellkulturen eine veränderte JNK-Aktivierung vor, die mit der verminderten Schadensmeldung in Verbindung gebracht wurde (Poehlmann et al., 2013b) und vermutlich ebenso wenig Zellzyklusarreste aufgrund der p21^{WAF1}-Reduktion induzieren konnte. Auch p38 wurde zwar aktiviert, konnte aber die von Reinhardt *et al.*

beschriebenen Rolle in der Induktion der G1/S- und G2/M-Arreste in p53-defizienten Zellen (Reinhardt et al., 2007) offenbar nicht ausüben. Da laut Reinhardt *et al.* Chk1 und p38/MK2 (*MAPK-activated protein kinase 2*) bei p53-Defizienz Arreste über Cdc25A induzieren, könnte eine gestörte Cdc25A-Repression trotz Aktivierung von Chk1 und p38 die Ausübung der Zellzykluskontrolle verhindern. Zwar konnten de Oliveira *et al.* an der kolorektalen Zelllinie HCT116 p53-unabhängig zeigen, dass eine stockende Replikation infolge von Hypoxie zum Zellzyklusarrest durch Cdc25A-Repression ohne Chk1-Aktivierung führt, allerdings war p21^{WAF1} für die Ausbildung des Arrestes von Nöten (Queiroz de Oliveira et al., 2009). Da in den Z-Zellkulturen p21^{WAF1} JNK-abhängig herabreguliert und vermindert exprimiert vorlag (Poehlmann et al., 2013b), würde die repressive Wirkung auf Cdc25A entfallen. Es ist denkbar, dass die mangelnde Cdc25A-Repression durch fehlendes p21^{WAF1} der Cdc25A-Inhibition durch aktiviertes Chk1 entgegenwirkt. Da die Stabilität der p21^{WAF1}-mRNA auch über microRNAs (miR) reguliert werden kann (Bartel, 2004; He und Hannon, 2004; Carthew, 2006) und diese, im Besonderen miR-21, u. a. für kolorektale Tumoren als dysreguliert beschrieben wurden (Michael et al., 2003), könnte zusätzlich zu der für die Z-Zellkulturen gezeigten JNK-abhängigen p21^{WAF1}-Herunterregulation eine Modulation der basalen p21-Aktivierung durch weitere Mechanismen vorliegen. Die erhöhte Anzahl an miR-21 wurde zudem mit Zelltransformation, Tumorwachstum, -invasion und Metastasierung in Verbindung gebracht (Si et al., 2007; Zhu et al., 2007; Lu et al., 2008). Die Tatsache, dass auf diese Weise die transkriptionelle Repression durch p21^{WAF1} am Promotor von *cdc25A* und *myc* entfällt (Vigneron et al., 2006), und Cdc25A in Chk1-kompetenten, p53-inaktiven Krebszelllinien zusätzlich als überexprimiert gezeigt wurde (Dixon et al., 1998; Wang et al., 2009a), unterstützt die These, dass aktiviertes Chk1 allein nicht der Arrestinduktion genügt und ein proliferativer Vorteil im Überlebenssinne geschädigter Zellen vorliegt. Die für die Z-Zellkulturen gezeigte Überexpression von c-Myc (Poehlmann et al., 2013b) unterstützt diese Vermutung zusätzlich, da Galaktionov *et al.* die Cdc25-Expression als c-Myc abhängig gezeigt haben (Galaktionov et al., 1996). Da Chk1 nach Autophosphorylierung außerdem wie von Kasahara *et al.* gezeigt, Cdc25A über Komplexbildung mit 14-3-3 γ phosphoryliert und damit inaktiviert, könnte andererseits eine Störung dieser Inhibition vorliegen (Kasahara et al., 2010). Nicht zuletzt wird die inhibierende Wirkung von Chk1 auf Cdc25A durch von Chk1 aktiviertes NEK11 vermittelt, wobei Cdc25A parallel durch Chk1 und NEK11 phosphoryliert werden muss (Shen und Huang, 2012), was gleichzeitig als Signal für die Cdc25A-Proteolyse dient. Für die parallele Phosphorylierung von Cdc25A durch Chk1 und NEK11 ist die Cdc25A-Chk1-14-3-3 γ -Komplexbildung unerlässlich (Kasahara et al., 2010).

Liang *et al.* haben kürzlich gezeigt, dass der Wiedereintritt in den Zellzyklus nach G2-Arrest auch mit vorhandenem Schaden geschieht und eine Kontrollpunktadaptation darstellt (Liang et al., 2014). Der Fortgang des Zellzyklus war dabei nicht von der Reparatur der Schäden abhängig sondern vom *Polo-like kinase 1* (Plk1)-Level. Dieser stieg

graduell während des Arrestes an, und sobald ein bestimmter Level erreicht wurde, erfolgte trotz andauerndem DNA-Schaden der Mitosestart. Dabei spielen aber bisher nicht identifizierte zusätzliche Faktoren eine Rolle. Gleichzeitig können Schäden in G2 markiert und in der folgenden Mitose ausgelassen werden. Diese markierten Schäden sollten in der G1-Phase der Tochterzellen die DNA-Schadensantwort initiieren (Lee et al., 2014; Shaltiel et al., 2015), ein Mechanismus, der durch die veränderte Schadensmeldung und Zellzykluskontrolle in Z-Zellkulturen vermutlich gestört ist.

Der Fortgang des Zellzyklus ist abhängig von der p21^{WAF1}-regulierten Lokalisation von Cdc25A (Shaltiel et al., 2015). So fördert nukleäres Cdc25A über zytosolisches CDK1-ZyclinB1 die Mitose, wohingegen p21^{WAF1} zur nukleären Ansammlung von CDK1-ZyclinB1 führt, was den nukleären Ausschluss von Cdc25A und damit den Arrest bedingt. Es ist daher möglich, dass die JNK-abhängige p21^{WAF1}-Repression die Proliferation fördert, da Cdc25A aufgrund der nukleären Lokalisation vermehrt durch CDK1 aktiviert werden kann. Weiterhin vermag nukleäres Chk1 CDK1 zu inhibieren (Goto et al., 2012). Durch ebenfalls Plk1-abhängige initiale CDK1 Aktivierung kann nachfolgend auch Chk1 aktiviert werden um am G2/M-Kontrollpunkt vom Zellkern in das Zytoplasma geschleust zu werden (Shiromizu et al., 2006). Der Chk1-Export wiederum würde die Aktivierung von CDK1 und damit die Zellzyklusprogression fördern. Somit könnte zum einen die Lokalisation eine mangelnde Suppression von Cdc25A durch Chk1 bedingen, zum anderen würde die Cdc25A/Plk1-abhängige CDK1-Aktivierung über den nukleären Export von Chk1 die Proliferation weiter vorantreiben. Auch die Überwindung der verbleibenden Kontrollpunkte könnte ebenfalls Chk1-abhängig sein. So haben Demidova *et al.* gezeigt, dass p53 als transkriptioneller Repressor von Cdc25A im Replikationskontrollpunkt wirken kann (Demidova et al., 2009). Die im Modell der akuten Entzündung gezeigte Chk1-Herunterregulation könnte zusätzlich ein Hinweis auf einen defekten mitotischen Spindelkontrollpunkt sein (Carrassa et al., 2009; Löffler et al., 2014) und war in den Z-Zellkulturen ebenso manifestiert wie die konstitutive pChk1^{S317/S345}-Aktivierung (3.2.1). Speroni *et al.* haben durch Chk1-Inhibitor-Studien gezeigt, dass Chk1 den Replikationsfortgang durch Aufrechterhaltung der Replikationsgabel trotz UV-geschädigter DNA unabhängig von seiner Kinasefunktion fördern kann (Speroni et al., 2012). Ob der verbleibende Chk1-Level für die Replikation geschädigter DNA-Templates genügt, oder andere Mechanismen greifen, konnte aus den vorliegenden Daten nicht geschlussfolgert werden. Durch die JNK-Dysregulation in den Z-Zellkulturen ist von einer verminderten Schadensmeldung auszugehen, die zusätzlich, ebenso wie in HCEC nach induziertem oxidativen Stress, durch Chk1 z. T. supprimiert scheint (3.2.4). Dies zeigte sich vor allem an der Hochregulation der beiden pJNK-Varianten nach Chk1-*knockdown* in den untersuchten Z-Zellkulturen. Da vermutlich die von Liang *et al.* gezeigte, Plk1-abhängige Kontrollpunktadaptation hinzukommt, können die Zellen trotz DNA-Schäden weiter proliferieren (Liang et al., 2014). Die unveränderten Zellzyklusverteilungen (3.3.3) in Z10-Zellen nach Chk1-*knockdown* ohne

akut induzierten oxidativen Stress untermauern diese These. Die Level an basalem und aktiviertem Chk1 in den Z-Zellkulturen entsprachen denen in HCEC nach akut induziertem oxidativen Stress, Chk1 lag vermindert, aktiviertes Chk1 erhöht vor (3.2.2). Der verbleibende basale Chk1-Level und die Menge an aktiviertem Chk1 in den Z-Zellkulturen genügten aber offensichtlich für die Zellzykluskontrolle im ungestörten Zellzyklus mit maskiertem Schaden. Der Chk1-*knockdown* in den Z-Zellkulturen führte zwar zur zusätzlichen Reduktion von Chk1, aktiviertes Chk1 hingegen blieb nahezu unverändert (3.2.4). Des Weiteren bedingt JNK die Suppression von aktiviertem Chk1, wobei der basale Chk1-Level nahezu unberührt blieb (3.2.3). Da die p54-Variante an aktiviertem JNK in den Z-Zellkulturen reduziert und die p46-Variante hochreguliert vorlag, kann aus den Daten der Inhibitorstudie nicht hinreichend geklärt werden, welche Variante für die Chk1-Suppression verantwortlich ist. Da sowohl eine zusätzliche Verminderung an aktiviertem JNK p54 als auch eine generelle Reduktion des erhöhten p-p46 zum vorliegenden Ergebnis führen können.

Für die Rolle von Chk1 im zellulären Modell der chronisch, nicht aktiven Colitis Ulcerosa kann geschlussfolgert werden, dass aktiviertes Chk1 allein für die Arrestinduktion nicht genügt. Chk1 supprimiert die DNA-Schadensantwort z. T. zusätzlich und hat vermutlich durch Aufrechterhaltung der Replikation eine Funktion in der Überwindung der verbleibenden Kontrollpunkte inne.

4.3 Rolle von Chk1 bei erneuter Entzündungssimulation im Modell der chronischen Entzündung

Für die Z10-Zellen nach akut induziertem Stressreiz war bisher eine Kontrollpunktadaptation beschrieben worden, da die Zellen im Gegensatz zu den HCEC nach akuter Induktion oxidativen Stresses nach zunächst eingeleitetem S- und G2/M-Arrest nicht die Apoptose einleiteten, sondern Apotoseresistenz aufwiesen (Poehlmann et al., 2013b). Im Gegensatz zu nicht akut gestressten Z10-Zellen erfolgte nach akut induziertem oxidativem Stress die Aktivierung von c-Jun und γ H2A.X, Chk1 blieb auf niedrigem Basallevel und gleichstark aktiviert, auch die JNK-Dysregulation blieb unverändert. Entgegen der Chk1-abhängigen JNK-Suppression in nicht zusätzlich gestressten Z10-Zellen lag nach akutem Stressreiz keine Suppression der p54-Variante an aktiviertem JNK vor (3.3.2). Lediglich p46 JNK und zusätzlich c-Jun und p21^{WAF1} wurden leicht durch Chk1 supprimiert. Somit liegt nahe, dass Chk1 in akut gestressten Z10-Zellen den Zellzyklusregulator p21^{WAF1} zusätzlich supprimiert. Auch γ H2A.X lag nach Chk1-*knockdown* mehr als verdoppelt vor. Zum einen könnten die Zellen, die zwar an latente Schäden adaptiert sind, nun nach neu induziertem oxidativen Stress eine effektive Schadensmeldung durchzusetzen versuchen, zum anderen könnte die von Syljasen *et al.* beschriebene massive Hochregulation an γ H2A.X durch den zusätzlich verminderten

Chk1-Level im Zuge des Chk1-*knockdown* und die damit verbundene massive CDK2-abhängige Induktion von Strangbrüchen induziert werden (Syljuasen et al., 2005).

Für die Z10-Zellen war bereits eine Kontrollpunktadaption durch Überwindung der zunächst induzierten Arreste S und G2/M gezeigt worden. Aus den vorliegenden Daten (3.3.3) konnte nicht geschlussfolgert werden, ob Chk1 seine Rolle in der Aufrechterhaltung der Zellzyklusarreste ebenso wie für Z-Zellkulturen vermutlich durch Dysregulation beteiligter Regulatoren wie p21^{WAF1} und/oder Cdc25A oder vermittelnde Faktoren wie NEK1 nicht ausüben konnte, oder andere Mechanismen greifen. Vermutlich ist Chk1 an der Induktion und Aufrechterhaltung der Arreste beteiligt, durch die konstitutive Hochregulation an aktiviertem Chk1 auch nach *knockdown* konnte jedoch eine Chk1-Abhängigkeit nicht ermittelt werden. Eindeutig hingegen ist die starke c-Jun-Aktivierung bis zu 72 h nach akut induziertem Stressreiz (Kapitel) die jedoch im Gegensatz zu HCEC nach akutem oxidativen Stress nicht Chk1-abhängig supprimiert wurde. Da die permante c-Jun-Aktivierung die Apoptoseresistenz und Progression durch die G1-Phase (Wisdom et al., 1999; Poehlmann et al., 2013b) und somit die Proliferation der Z10-Zellen trotz DNA-Schäden begünstigt, sollte die fehlende Suppression der c-Jun-Aktivierung trotz konstitutiv aktivem Chk1 daher zukünftig detaillierter untersucht werden. Weiterhin haben Rokavec *et al.* eine Beteiligung von c-Jun hinsichtlich der Transformation und Tumorgenese in Abhängigkeit von einer IL-6-Hochregulation gezeigt (Rokavec et al., 2012). Da auch in Z10-Zellen erhöhte IL-6-Level publiziert wurden (Poehlmann et al., 2013b), liegt die Vermutung nahe, dass dieser Mechanismus z. B. über eine miR-200c-Suppression (Rokavec et al., 2012) in Z10-Zellen eine Rolle spielen könnte.

4.4 Rolle von Chk1 am Chromatin

Durch die Bindung ans Chromatin und das Rekrutieren von Histonacetyltransferasen nimmt Chk1 eine Rolle als Chromatin-modulierender Faktor ein (Smits et al., 2006; Shimada et al., 2008). Bisher haben mehrere Forschergruppen die Dissoziation von Chk1 vom Chromatin infolge von DNA-Schäden gezeigt (Jiang et al., 2003; Zhang et al., 2005; Smits et al., 2006). Es besteht eine streng inverse Korrelation zwischen der Menge an chromatingebundenem Chk1 und dem Ausmaß an DNA-Schäden (González Besteiro und Gottifredi, 2015). In ungestörten Zellen befinden sich etwa 20 % des zellulären Chk1 chromatingebunden (Smits et al., 2006), gehäuft an neu synthetisierter DNA, begründet durch die Rolle in der Aufrechterhaltung der Replikationsgabel (Min et al., 2013). DNA-Schadens-abhängig vermindert Chk1 wie nachfolgend beschrieben die Bindung der Histonacetyltransferase GCN₅ an die Promotoren der Gene *Cyclin B1* und *CDK 1* (Shimada et al., 2008). Durch Dissoziation vom Chromatin reduziert Chk1 infolge von DNA-Schaden die Phosphorylierung von H3 an T11, wodurch die GCN₅-Bindung gemindert wird und eine verringerte Acetylierung des Histon H3 an K9 und/oder K14 nach sich zieht. Auf diese Weise hemmt Chk1 die Mitose geschädigter Zellen, unabhängig vom p53-Status (Shimada

und Nakanishi, 2006; Shimada et al., 2008; Shimada und Nakanishi, 2008; Shimada et al., 2010). Die Dissoziation korreliert direkt mit der Phosphorylierung von Chk1 durch ATR/ATM (Smits et al., 2006), gefolgt von einer nukleoplasmatischen Ansammlung von Chk1 (Kasahara et al., 2010). Im Einzelnen kann die ATR-abhängige Phosphorylierung von Chk1 an Ser317, nicht aber an Ser345, die Dissoziation des Chk1 vom Chromatin triggern (Smits et al., 2006). Die nukleoplasmatische Verteilung von Chk1 wiederum wurde als nicht zwingend ATR-abhängig gezeigt (Min et al., 2013).

Überraschender Weise führten die in HCEC durch H₂O₂-Behandlung induzierten DNA-Schäden und die vermehrte Phosphorylierung von Chk1 an S317 nicht zur vollständigen Dissoziation von aktiviertem Chk1 vom Chromatin (3.4.1). Entgegen der von Shimada *et al.* gezeigten Zusammenhänge, wurde Chk1 in HCEC nach oxidativem Stress zwar vermehrt aktiviert (S317), dissoziierte jedoch in der aktivierten Form nicht in gleichem Maße vom Chromatin wie in unbehandelten HCEC. Da die Dissoziation von Chk1, wie kürzlich gezeigt, auch Kinase-unabhängig über PCNA-abhängige Bindungsregulation erfolgen kann (Scorah et al., 2008; Speroni et al., 2012; Min et al., 2013), besteht die Möglichkeit, dass die Phosphorylierung von Chk1 nicht unmittelbar zur Freisetzung in das Kernplasma führt (González Besteiro und Gottifredi, 2015). Trotz des konstitutiv aktivierten und gebundenen Chk1 kam es zur Phosphorylierung von H3 an T11 (3.4.3), was folgerichtig vermehrt die HAT GCN₅ rekrutierte, aber keine veränderte Acetylierung der Histone nach sich zog.

In Z10-Zellen ohne akuten oxidativen Stress akkumulierte sowohl aktiviertes als auch basales Chk1 am Chromatin (3.4.1). Auch hier erfolgte eine verstärkte Rekrutierung der GCN₅ infolge erhöhter pH3^{T11}-Level, was allerdings zu verstärkter Histonacetylierung führte (3.4.3). Auf diese Weise könnte die transkriptionelle Aktivierung im Besonderen der Zellzyklusregulatoren die Proliferation der Z-Zellen begünstigen. Auch die für Z10-Zellen nach erneutem H₂O₂-Reiz ermittelte Akkumulation von zytosolischem pChk1 kann mit erhöhter Proliferation in Verbindung gebracht werden, da Al-kaabi *et al.* kürzlich die zytoplasmatische Expression von pChk1 in Brustkrebs-Gewebeschnitten mit schlechter Prognose und einen hohen proliferativen Status assoziieren konnten (Al-kaabi et al., 2015). Die erneut simulierte Entzündungssituation führte außerdem in Z10-Zellen analog der HCEC nach Stressreiz zu weit mehr Chromatin-assoziiertem Chk1 (3.4.1) als in ungeretzten Z10-Zellen, wobei weder die Menge an akkumuliertem aktiviertem Chk1 zunahm, noch der Level an pH3^{T11} (3.4.3). Nichtsdestotrotz wurde vermehrt GCN₅ rekrutiert, was zu stärkerer Acetylierung der Histone führte (3.4.3). Die erhöhte Menge an GCN₅ könnte auf einen kürzlich von Imoberdorf *et al.* beschriebenen erhöhten Basallevel zurückgeführt werden (Imoberdorf et al., 2005). Weiterhin wurde kürzlich eine Rolle von GCN₅ in der epigenetischen Regulation von PI3K/Akt von Kikuchi *et al.* gezeigt. Dabei wurde das Überleben nach ROS, induziert durch H₂O₂-Exposition, durch Hochregulation der PI3K/Akt in GCN₅-abhängiger Weise beobachtet (Kikuchi et al., 2005; Kikuchi et al., 2011). Demzufolge könnte die verstärkte Bindung von GCN₅ in Z10-Zellen mit und ohne

Reiz die epigenetische Regulation von PI3K/Akt und damit das Überleben der Zellen nach induziertem oxidativen Stress fördern. Gleichzeitig könnte Akt über c-Myc, welches in Z-Zellkulturen als hochreguliert vorlag (Poehlmann et al., 2013b), und CDK6 bzw. über CDK2 die G1/S- und die G2/M-Transition beschleunigen (Xu et al., 2012). Und nicht zuletzt ist denkbar, dass die gezeigte, verstärkte Bindung der Histonacetyltransferasen PCAF und p300/CBP (3.4.2) die transkriptionelle Aktivierung von Genen durch verstärkte Histonacetylierung bedingen (Cohen et al., 2011; Chen et al., 2012).

Da in HCEC nach akutem Stressreiz durch *Chk1-knockdown* die Menge an Chromatin-assoziiertem Chk1 nicht weiter reduziert werden konnte (3.4.4) und auch der Level an aktiviertem Chk1 in der Chromatinfraction unverändert blieb, konnte der Einfluss von Chk1/pChk1^{S317} auf die Histonmodifikationen nicht weiter untersucht werden.

In Z10-Zellen blieb das konstitutiv aktivierte Chk1 unabhängig von einem erneuten Stressreiz und dem erfolgreichen *Chk1-knockdown* mit dem Chromatin assoziiert (3.4.4). Die Aktivierung von H3 an T11 durch Phosphorylierung (3.4.5) blieb entgegen Shimada *et al.* vom veränderten Chk1-Level unbeeinflusst (Shimada und Nakanishi, 2006; Shimada et al., 2008; Shimada und Nakanishi, 2008; Shimada et al., 2010). Entsprechend dieses unverändert gebundenen pH3^{T11} wurde in nicht akut gestressten Z10-Zellen folgerichtig nicht mehr HAT (GCN₅) rekrutiert und H3 an K9 acetyliert (3.4.5). Nach zusätzlich appliziertem akutem Stressreiz erfolgte in den Z10-Zellen pH3^{T11}-unabhängig die Rekrutierung von GCN₅. Weiterhin war der Acetylierungsstatus von H3 an K9 und H4 nach *Chk1-knockdown* im Gegensatz zu den stark erhöhten GCN₅-Leveln in diesen Zellen vermindert. Chk1 supprimiert die Rekrutierung pH3^{T11}-unabhängig von GCN₅. Allerdings kann der erhöhte Level an K14 acetyliertem H3 in Z10-Zellen nach akutem Stressreiz und *Chk1-knockdown* ein Hinweis darauf sein, dass GCN₅ Histone bei reduzierter Chk1-Bindung auch an anderen Lysinresten zu modifizieren vermag. Die Tatsache, dass die HAT PCAF in den Z10-Zellen nach akutem Stressreiz und *Chk1-knockdown* in reduzierter Menge am Chromatin assoziiert vorlag, gibt ebenfalls einen Hinweis auf eine direkte oder indirekte Beeinflussung der HAT-Rekrutierung durch Chk1.

Allerdings kann Chk1 über die ATR-Chk1-CDK-(PP1 γ)-Signalkette auch eine wichtige Rolle im zellulären Überleben nach DNA-Schäden einnehmen (Shimada et al., 2010). Bei ineffizienter Dissoziation vom Chromatin hingegen blockiert Chk1 die effiziente Rekrutierung der DNA-Polymerase η nach UV-Reiz (Speroni et al., 2012). ATR-abhängig aktiviertes Chk1 dissoziiert von den Promotorregionen der Zellzyklusregulatoren vom Chromatin und unterdrückt so indirekt die CDK-Aktivität. Dadurch wird PP1 γ aktiviert, was zur Dephosphorylierung von pH3^{T11} führt und die Transkription der Zellzyklusregulatoren hemmt (Shimada et al., 2010).

4.5 Ausblick und Fazit

Für die eingangs gestellte Frage einer Beteiligung von Chk1 in der veränderten Signaltransduktion der DNA-Schadensantwort infolge von induziertem oxidativen Stress im zellulären *in vitro* Modell der CU ergibt sich folgendes Fazit: Chk1 wurde im zellulären Modell der akuten CU aktiviert und spielt in der Schadensantwort durch teilweise Unterdrückung der pJNK-abhängigen DNA-Schadensmeldung eine Rolle. Gleichzeitig zeigte die pJNK-abhängige Regulation der Chk1-Aktivierung ein Zusammenspiel der beiden Moleküle bzw. die gegenseitige Regulation der Signalwege auf. Auch im zellulären Modell der chronischen, nicht aktiven CU, den generierten Z-Zellkulturen (Z1-Z10), konnte eine Chk1-abhängige Suppression der pJNK-vermittelten Signalisierung von DNA-Schäden gefunden werden. Allerdings führten die Aktivierung von Chk1 und die anschließende Akkumulation von pChk1 nicht zum Zellzyklusarrest und folgerichtig nicht zur Schadensreparatur, sodass es trotz DNA-Schäden zur stärkeren Proliferation dieser Z-Zellkulturen kam. Nach zusätzlich akut induziertem oxidativen Stress in den Z10-Zellen zeigte sich eine Adaptation der Zellzykluskontrolle, an der Chk1 durch Unterdrückung der pJNK-abhängigen Schadensmeldung beteiligt war. Somit spielt Chk1 auch im zellulären *in vitro* Modell der chronischen, und der chronisch, aktiven CU eine Rolle. Im Besonderen muss hier geschlussfolgert werden, dass aktiviertes Chk1 der Arrestinduktion nicht genügt. Chk1 supprimiert die DNA-Schadensmeldung z. T. zusätzlich und trägt durch Aufrechterhalten der Replikation vermutlich zur Überwindung der verbleibenden Zellzykluskontrollpunkte bei. In welcher Weise Chk1 die JNK-abhängige p21^{WAF1}-Repression unterstützt und welchen Einfluss Chk1 auf die Regulation von Cdc25A im zellulären *in vitro* Modell hat müssen weiterführende Studien zeigen. Dabei sollten auch vermittelnde Faktoren wie NEK1 und involvierte miRNAs untersucht werden. Weiterhin könnten Studien mit einem Chk1-Inhibitor zur effektiven Chk1/pChk1-Reduktion führen und zur Aufklärung der Rolle von Chk1 beitragen. Chk1 gilt aufgrund des durch p53-Defizienz verursachten, fehlenden G1-Zellzykluskontrollpunktes in Tumorzellen mit seiner Funktion im S- und G2/M-Kontrollpunkt als ein attraktives Zielprotein in der Krebstherapie (Dai und Grant, 2010). Der Einsatz von Chk1-Inhibitoren scheint derzeit noch wenig effektiv, da viele klinische Studien aufgrund der Toxizität einer generellen Chk1-Inhibition oder aus Kostengründen abgebrochen wurden (Sakurikar und Eastman, 2015). Dennoch könnte die Aufdeckung der regulativen Rolle von Chk1 für *downstream* gelegene Zielproteine hinsichtlich Prävention und Therapie hilfreich sein. Es bedarf daher weiterer Untersuchungen zum Verständnis der veränderten Signaltransduktion in durch chronischen oxidativen Stress geschädigten kolorektalen Epithelzellen.

Für die zweite eingangs gestellte Frage nach einer potentiellen Rolle von Chk1 als Chromatin-modulierender Faktor kann für das zelluläre *in vitro* Modell folgendes geschlossen werden: Trotz einer Akkumulation von Chk1 am Chromatin in Z10-Zellen und

Z10-Zellen nach H₂O₂-Behandlung, sowie pChk1 am Chromatin von HCEC nach H₂O₂-Behandlung, Z10-Zellen und Z10-Zellen nach H₂O₂-Behandlung kam es zu Histonmodifikationen, die eine erhöhte Transkription begünstigen. Durch die siRNA-Behandlung konnte zwar eine Reduktion des Chk1-Levels erzielt werden, die aktivierte Form, pChk1, blieb jedoch davon unberührt. Die Chk1-Abhängigkeit der Phosphorylierung von H3 an T11 konnte für das zelluläre *in vitro* Model der CU nicht bestätigt werden. Trotzdem blieben nachfolgende regulative Mechanismen der Histonmodifikation trotz fehlender Chromatin-Dissoziation von pChk1 erhalten. Für das Verständnis der erhöhten Chromatin-Bindung von Chk1 im zellulären Modell sollten daher bindungsvermittelnde Faktoren wie PI3K, 14-3-3 und Weitere in zukünftigen Studien untersucht werden.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Untersuchung der Rolle von Chk1 in der entzündungsbasierten kolorektalen Karzinogenese anhand eines zellulären Colitis Modells

Für die Weiterentwicklung der Prävention der Krebsentstehung infolge chronischer Entzündung ist die Aufklärung von Signalwegen, die eine Tumorentstehung bedingen, von großer Bedeutung. Entzündliche Darmerkrankungen, wie die Colitis Ulcerosa, erhöhen das Risiko der Entstehung kolorektaler Karzinome. Zudem gilt die entzündungsbedingte ROS-Bildung in der Tumorentstehung als pathogener Faktor. Bis zum jetzigen Zeitpunkt ist allerdings unklar, ob allein die Entzündung zur Tumorentstehung genügt. Anhand eines etablierten zellulären *in vitro* Modells der Colitis Ulcerosa in humanen kolorektalen Epithelzellen (HCEC) wurden Veränderungen in der Signaltransduktion durch induzierten oxidativen Stress festgestellt. Von besonderem Interesse war dabei die Rolle von Chk1, einem Protein mit multiplen Funktionen in der DNA-Schadensantwort und im Zellzyklus. Für das Modell der akuten Entzündung konnte die Aktivierung und Beteiligung von Chk1 in der DNA-Schadensantwort nachgewiesen werden, welches durch Suppression von pJNK z. T. die DNA-Schadensmeldung in HCEC unterdrückt. Gleichzeitig zeigte die pJNK-abhängige Regulation der Chk1-Aktivierung ein Zusammenspiel der beiden Moleküle bzw. die gegenseitige Regulation der Signalwege. Im Modell der chronischen, nicht aktiven Colitis Ulcerosa, den generierten Z-Zellkulturen (Z1-Z10), konnte ebenso wie in HCEC eine Chk1-abhängige Suppression der pJNK-vermittelten Signalisierung von DNA-Schäden gefunden werden. Die Aktivierung und anschließende Akkumulation von Chk1 führte keine Arretierung des Zellzyklus in den generierten Zelllinien herbei und es kam trotz DNA-Schäden zur stärkeren Proliferation dieser Z-Zellkulturen. Nach zusätzlich akut induziertem oxidativen Stress zeigte sich in den Z10-Zellen eine Adaptation der Zellzykluskontrolle, an der Chk1 durch Unterdrückung der pJNK-abhängigen Schadensmeldung beteiligt war. Somit spielt Chk1 auch im Modell der chronischen, aktiven Colitis Ulcerosa eine Rolle. Bezug nehmend auf eine weitere Funktion des Chk1-Proteins, die epigenetische Modulation von Chromatin, konnte für HCEC nach Induktion von oxidativem Stress eine mangelnde Dissoziation von pChk1 vom Chromatin und damit eine veränderte Histonmodifikation durch die verstärkte Phosphorylierung an H3^{T11} gezeigt werden. Dies bewirkte die verstärkte Rekrutierung der Histonacetyltransferasen GCN₅ und könnte eine veränderte Transkriptionsregulation, im Besonderen zellzyklusregulatorischer Gene wie *Cyclin B1* und *CDK1* bedingen. Die ebenfalls für Z10-Zellen ohne akute Stresssimulation ermittelte Akkumulation von Chk1/pChk1^{S317} am Chromatin kann die erhöhte Proliferation trotz DNA-Schaden begünstigen. Zudem gibt die verstärkte Rekrutierung der GCN₅ Hinweise auf überlebensfördernde Mechanismen nach induziertem oxidativen Stress in den Z10-Zellen nach akutem Stressreiz. Zusammengefasst zeigt die vorliegende Arbeit eine Beteiligung von Chk1 in der Antwort auf entzündungsbasierten oxidativen Stress sowohl im zellulären *in vitro* Modell der akuten, als auch der chronischen Colitis Ulcerosa.

6 ABSTRACT

The role of Chk1 in inflammation associated colorectal carcinogenesis in a cellular model of ulcerative colitis

To improve cancer prevention following chronic inflammation, clarification of the underlying signal transduction pathways is of great interest, especially regarding tumor initiation. Ulcerative colitis as an inflammatory bowel disease increases the risk of developing colorectal cancer. Furthermore, inflammation-associated ROS generation is considered a pathogenic factor in tumorigenesis. It is still unclear whether inflammation alone without carcinogen exposure can result in tumor initiation. In a cellular *in vitro* model of ulcerative colitis, recently established in human colorectal epithelial cells (HCEC), altered signal transduction following oxidative stress has been demonstrated. As ROS can induce DNA damage, the key protein checkpoint kinase Chk1, which has a role in DNA damage response and cell cycle regulation, is of special interest. In HCEC, Chk1 was activated and suppressed pJNK-dependent DNA damage signaling following acute inflammation. At the same time, pJNK suppressed Chk1 activation, revealing a cooperation of these molecules, respectively the interdependent regulation of both signal pathways. Even the model of chronic inflammation, the generated Z-cell cultures, revealed a Chk1 suppression of pJNK-dependent DNA damage signaling. Chk1 activation and accumulation in these cells failed to induce cell cycle arrest, contributing to increased proliferation despite DNA damage. Additionally, Chk1 participated in checkpoint adaptation after acute oxidative stress induction through suppression of pJNK-dependent DNA damage signaling. Hence, Chk1 also plays a role in the model of chronic, active colitis. Regarding the function of Chk1 in chromatin modulation, histone modifications in the cellular model were investigated. After oxidative stress-induced DNA damage, impaired dissociation of pChk1 from chromatin could be shown in HCEC, resulting in enhanced phosphorylation of Histon H3^{T11} and recruitment of histone acetyltransferase GCN₅. Therefore, increased GCN₅-dependent transcriptional activation of cell cycle regulatory genes, e. g. *Cyclin B1* and *CDK1*, can result in enhanced cell cycle progression. Thus, accumulation of Chk1/pChk1^{S317} on chromatin in Z10-cells without additional stress induction may have led to increased proliferation, despite DNA damage. Moreover, enhanced recruitment of GCN₅ gives evidence to increased survival after acute oxidative stress in Z10-cells. Taken together, this study demonstrated an involvement of Chk1 in inflammation-associated oxidative stress in cellular models of acute and chronic colitis.

7 LITERATURVERZEICHNIS

- Al-kaabi, M.M.**, Alshareeda, A.T., Jerjees, D.A., Muftah, A.A., Green, A.R., Alsubhi, N.H., Nolan, C.C., Chan, S., Cornford, E., and Madhusudan, S., et al. (2015). Checkpoint kinase1 (CHK1) is an important biomarker in breast cancer having a role in chemotherapy response. *Br J Cancer* *112*, 901-911.
- Balkwill, F.**, and Mantovani, A. (2001). Inflammation and cancer: back to Virchow? *The Lancet* *357*, 539-545.
- Bartek, J.**, and Lukas, J. (2003). Chk1 and Chk2 kinases in checkpoint control and cancer. *Cancer Cell* *3*, 421-429.
- Bartel, D.P.** (2004). MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* *116*, 281-297.
- Baumgart, D.C.**, and Carding, S.R. (2007). Gastroenterology 1 - Inflammatory bowel disease: cause and immunobiology. *Lancet* *369*, 1627-1640.
- Baylin, S.B.**, and Jones, P.A. (2011). A decade of exploring the cancer epigenome - biological and translational implications. *Nature reviews. Cancer* *11*, 726-734.
- Blum, S.**, Pfeifer, A., and Tromvoukis, Y. (2001). IMMORTALIZED ADULT HUMAN COLON EPITHELIAL CELL LINE US6194203.pdf.
- Bonner, W.M.**, Redon, C.E., Dickey, J.S., Nakamura, A.J., Sedelnikova, O.A., Solier, S., and Pommier, Y. (2008). [gamma]H2AX and cancer. *Nat Rev Cancer* *8*, 957-967.
- Boonstra, J.**, and Post, J.A. (2004). Molecular events associated with reactive oxygen species and cell cycle progression in mammalian cells. *Gene* *337*, 1-13.
- Brown, E.J.** (2003). Essential and dispensable roles of ATR in cell cycle arrest and genome maintenance. *Genes & Development* *17*, 615-628.
- Bülbul, N.**, Pala, E., İğci, Y.Z., Göğebakan, B., Öztuzcu, S., Cengiz, B., Bayraktar, R., Dağ, M.S., and Aydınli, M. (2014). NADPH oxidase p22phox gene expression in ulcerative colitis. *The Turkish journal of gastroenterology : the official journal of Turkish Society of Gastroenterology* *25*, 634-638.
- Buschmann, T.**, Yin, Z., Bhoumik, A., and Ronai, Z. (2000). Amino-terminal-derived JNK Fragment Alters Expression and Activity of c-Jun, ATF2, and p53 and Increases H2O2-induced Cell Death. *J.Biol.Chem.* *275*, 16590-16596.
- Carrassa, L.**, Sanchez, Y., Erba, E., and Damia, G. (2009). U2OS cells lacking Chk1 undergo aberrant mitosis and fail to activate the spindle checkpoint. *Journal of cellular and molecular medicine* *13*, 1565-1576.
- Carthew, R.W.** (2006). Gene regulation by microRNAs. *Current Opinion in Genetics & Development* *16*, 203-208.
- Chen, H.**, Lin, R.J., Schiltz, R.L., Chakravarti, D., Nash, A., Nagy, L., Privalsky, M.L., Nakatani, Y., and Evans, R.M. (1997). Nuclear Receptor Coactivator ACTR Is a Novel Histone Acetyltransferase and Forms a Multimeric Activation Complex with P/CAF and CBP/p300. *Cell* *90*, 569-580.
- Chen, P.**, Luo, C., Deng, Y., Ryan, K., Register, J., Margosiak, S., Tempczyk-Russell, A., Nguyen, B., Myers, P., and Lundgren, K., et al. (2000). Implications for Chk1 Regulation: The 1.7 Å Crystal Structure of Human Cell Cycle Checkpoint Kinase Chk1. *Cell* *100*, 681-692.
- Chen, T.**, Stephens, P.A., Middleton, F.K., and Curtin, N.J. (2012). Targeting the S and G2 checkpoint to treat cancer. *Drug Discovery Today* *17*, 194-202.

- Chen, Y.**, Caldwell, J.M., Pereira, E., Baker, R.W., and Sanchez, Y. (2009). ATRMec1 phosphorylation-independent activation of Chk1 in vivo. *The Journal of biological chemistry* *284*, 182-190.
- Cobb, M.H.** (1999). MAP kinase pathways. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* *71*, 479-500.
- Cohen, I.**, Poręba, E., Kamieniarz, K., and Schneider, R. (2011). Histone modifiers in cancer: friends or foes? *Genes & cancer* *2*, 631-647.
- Colotta, F.**, Allavena, P., Sica, A., Garlanda, C., and Mantovani, A. (2009). Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability. *Carcinogenesis* *30*, 1073-1081.
- Costelloe, T.**, Fitzgerald, J., Murphy, N.J., Flaus, A., and Lowndes, N.F. (2006). Chromatin modulation and the DNA damage response. *Experimental Cell Research* *312*, 2677-2686.
- Coussens, L.M.**, and Werb, Z. (2002). Inflammation and cancer. *Nature* *420*, 860-867.
- Cunningham, J.M.**, Christensen, E.R., Tester, D.J., Kim, C.-Y., Roche, P.C., Burgart, L.J., and Thibodeau, S.N. (1998). Hypermethylation of the hMLH1 Promoter in Colon Cancer with Microsatellite Instability. *Cancer Res* *58*, 3455-3460.
- Dai, Y.**, and Grant, S. (2010). New Insights into Checkpoint Kinase 1 in the DNA Damage Response Signaling Network. *Clin Cancer Res* *16*, 376-383.
- D'Amato, M.**, and Rioux, J.D. (2013). Molecular genetics of inflammatory bowel disease.
- Danese, S.**, and Fiocchi, C. (2011). Ulcerative Colitis.
- Demidova, A.R.**, Aau, M.Y., Zhuang, L., and Yu, Q. (2009). Dual regulation of Cdc25A by Chk1 and p53-ATF3 in DNA replication checkpoint control. *The Journal of biological chemistry* *284*, 4132-4139.
- Dixon, D.**, Moyana, T., and King, M.J. (1998). Elevated Expression of the cdc25A Protein Phosphatase in Colon Cancer. *Experimental Cell Research* *240*, 236-243.
- Enders, G.H.** (2008). Expanded roles for Chk1 in genome maintenance. *The Journal of biological chemistry* *283*, 17749-17752.
- Enomoto, M.**, Goto, H., Tomono, Y., Kasahara, K., Tsujimura, K., Kiyono, T., and Inagaki, M. (2009). Novel Positive Feedback Loop between Cdk1 and Chk1 in the Nucleus during G2/M Transition. *J.Biol.Chem.* *284*, 34223-34230.
- Esteller, M.** (2011). Epigenetic changes in cancer. *F1000 biology reports* *3*, 9.
- Fang, J.Y.**, and Richardson, B.C. (2005). The MAPK signalling pathways and colorectal cancer. *The Lancet Oncology* *6*, 322-327.
- Fearon, E.F.**, and Vogelstein, B. (1990). A Genetic Model for Colorectal Tumorigenesis *1990*.
- Federico, A.**, Morgillo, F., Tuccillo, C., Ciardiello, F., and Loguercio, C. (2007a). Chronic inflammation and oxidative stress in human carcinogenesis. *International Journal of Cancer* *121*, 2381-2386.
- Francescone, R.**, Hou, V., and Grivennikov, S.I. (2015). Cytokines, IBD, and Colitis-associated Cancer. *Inflamm Bowel Dis* *21*, 409-418.
- Galaktionov, K.**, Chen, X., and Beach, D. (1996). Cdc25 cell-cycle phosphatase as a target of c-myc. *Nature* *382*, 511-517.
- González Besteiro, M.A.**, and Gottifredi, V. (2015). The fork and the kinase: A DNA replication tale from a CHK1 perspective. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* *763*, 168-180.

- Goto, H.**, Izawa, I., Li, P., and Inagaki, M. (2012). Novel regulation of checkpoint kinase 1: Is checkpoint kinase 1 a good candidate for anti-cancer therapy? *Cancer Science* *103*, 1195-1200.
- Grivennikov, S.I.** (2013). Inflammation and colorectal cancer: colitis-associated neoplasia. *Seminars in immunopathology* *35*, 229-244.
- Grivennikov, S.I.**, and Karin, M. (2010). Inflammation and oncogenesis: a vicious connection. *Current Opinion in Genetics & Development* *20*, 65-71.
- Grivennikov, S.I.**, and Karin, M. (2011). Inflammatory cytokines in cancer: tumour necrosis factor and interleukin 6 take the stage. *Annals of the rheumatic diseases* *70 Suppl 1*, i104-8.
- Gutierrez, G.J.**, Tsuji, T., Cross, J.V., Davis, R.J., Templeton, D.J., Jiang, W., and Ronai, Z.A. (2010). JNK-mediated Phosphorylation of Cdc25C Regulates Cell Cycle Entry and G2/M DNA Damage Checkpoint. *J.Biol.Chem.* *285*, 14217-14228.
- Hake, S.B.**, Xiao, A., and Allis, C.D. (2004). Linking the epigenetic 'language' of covalent histone modifications to cancer. *British journal of cancer* *90*, 761-769.
- Hanahan, D.**, and Weinberg, R.A. (2000). The Hallmarks of Cancer. *Cell* *100*, 57-70.
- He, L.**, and Hannon, G.J. (2004). MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat. Rev. Genet.* *5*, 522-531.
- Herbst, U.**, Fuchs, J.I., Teubner, W., and Steinberg, P. (2006). Malignant transformation of human colon epithelial cells by benzo[c]phenanthrene dihydrodiolepoxides as well as 2-hydroxyamino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine. *Toxicology and applied pharmacology* *212*, 136-145.
- Huang, Y.-W.**, Kuo, C.-T., Stoner, K., Huang, T.H.-Y., and Wang, L.-S. (2011). An overview of epigenetics and chemoprevention. *FEBS letters* *585*, 2129-2136.
- Hussain, S.P.**, Amstad, P., Raja, K., Ambs, S., Nagashima, M., Bennett, W.P., Shields, P.G., Ham, A.J., Swenberg, J.A., and Marrogi, A.J., et al. (2000). Increased p53 mutation load in noncancerous colon tissue from ulcerative colitis: a cancer-prone chronic inflammatory disease. *Cancer Res* *60*, 3333-3337.
- Hussain, S.P.**, and Harris, C.C. (2007). Inflammation and cancer: an ancient link with novel potentials. *International journal of cancer. Journal international du cancer* *121*, 2373-2380.
- Hussain, S.P.**, Hofseth, L.J., and Harris, C.C. (2003). Radical causes of cancer. *Nature reviews. Cancer* *3*, 276-285.
- Imoberdorf, R.M.**, Topalidou, I., and Strubin, M. (2005). A Role for Gcn5-Mediated Global Histone Acetylation in Transcriptional Regulation. *Mol.Cell.Biol.* *26*, 1610-1616.
- Jackson, S.P.**, and Bartek, J. (2009). The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature* *461*, 1071-1078.
- Jaeschke, A.**, Karasarides, M., Ventura, J.J., Ehrhardt, A., Zhang, C., Flavell, R.A., Shokat, K.M., and Davis, R.J. (2006). JNK2 Is a Positive Regulator of the cJun Transcription Factor. *Molecular Cell* *23*, 899-911.
- Jeltsch, A.** (2002). Beyond Watson and Crick: DNA Methylation and Molecular Enzymology of DNA Methyltransferases.
- Jiang, K.C.**, Pereira, E., Maxfield, M., Russell, B., Godelock, D.M., and Sanchez, Y. (2003). Regulation of Chk1 includes chromatin association and 14-3-3 binding following phosphorylation on Ser-345. *J.Biol.Chem.* *278*, 25207-25217.
- Kardassis, D.**, Papakosta, P., Pardali, K., and Moustakas, A. (1999). c-Jun Transactivates the Promoter of the Human p21WAF1/Cip1 Gene by Acting as a Superactivator of the Ubiquitous Transcription Factor Sp1. *J.Biol.Chem.* *274*, 29572-29581.

- Karin, M.**, and Gallagher, E. (2005). From JNK to Pay Dirt: Jun Kinases, their Biochemistry, Physiology and Clinical Importance. *IUBMB Life* 57, 283-295.
- Kasahara, K.**, Goto, H., Enomoto, M., Tomono, Y., Kiyono, T., and Inagaki, M. (2010). 14-3-3 gamma mediates Cdc25A proteolysis to block premature mitotic entry after DNA damage. *EMBO J* 29, 2802-2812.
- Kikuchi, H.**, Kuribayashi, F., Takami, Y., Imajoh-Ohmi, S., and Nakayama, T. (2011). GCN5 regulates the activation of PI3K/Akt survival pathway in B cells exposed to oxidative stress via controlling gene expressions of Syk and Btk. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 405, 657-661.
- Kikuchi, H.**, Takami, Y., and Nakayama, T. (2005). GCN5: a supervisor in all-inclusive control of vertebrate cell cycle progression through transcription regulation of various cell cycle-related genes. *Gene* 347, 83-97.
- Kramer, A.**, Lukas, J., and Bartek, J. (2004). Checking out the centrosome. *Cell Cycle* 3, 1390-1393.
- Kraus, S.**, and Arber, N. (2009). Inflammation and colorectal cancer. *Current opinion in pharmacology* 9, 405-410.
- Kyriakis, J.M.**, and Avruch, J. (2012). Mammalian MAPK Signal Transduction Pathways Activated by Stress and Inflammation: A 10-Year Update. *Physiol.Rev.* 92, 689-737.
- Lee, D.-H.**, Acharya, S.S., Kwon, M., Drane, P., Guan, Y., Adelmant, G., Kalev, P., Shah, J., Pellman, D., and Marto, J.A., et al. (2014). Dephosphorylation Enables the Recruitment of 53BP1 to Double-Strand DNA Breaks. *Molecular Cell* 54, 512-525.
- Lemieux, E.**, Cagnol, S., Beaudry, K., Carrier, J., and Rivard, N. (2014). Oncogenic KRAS signalling promotes the Wnt/ β -catenin pathway through LRP6 in colorectal cancer. *Oncogene*.
- Li, J.** (1997). PTEN, a Putative Protein Tyrosine Phosphatase Gene Mutated in Human Brain, Breast, and Prostate Cancer. *Science* 275, 1943-1947.
- Li, X.**, Yao, X., Wang, Y., Hu, F., Wang, F., Jiang, L., Liu, Y., Wang, D., Sun, G., and Zhao, Y. (2013). MLH1 promoter methylation frequency in colorectal cancer patients and related clinicopathological and molecular features. *Plos One* 8, e59064.
- Liang, H.**, Esposito, A., De, S., Ber, S., Collin, P., Surana, U., and Venkitaraman, A.R. (2014). Homeostatic control of polo-like kinase-1 engenders non-genetic heterogeneity in G2 checkpoint fidelity and timing. *Nat Comms* 5.
- LihBrody, L.**, Powell, S.R., Collier, K.P., Reddy, G.M., Cerchia, R., Kahn, E., Weissman, G.S., Katz, S., Floyd, R.A., and McKinley, M.J., et al. (1996). Increased oxidative stress and decreased antioxidant defenses in mucosa of inflammatory bowel disease. *Digestive Diseases and Sciences* 41, 2078-2086.
- Lindahl, T.**, and Barnes, D.E. (2000). Repair of endogenous DNA damage. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 65, 127-133.
- Liu, Q.H.**, Guntuku, S., Cui, X.S., Matsuoka, S., Cortez, D., Tamai, K., Luo, G.B., Carattini-Rivera, S., DeMayo, F., and Bradley, A., 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, 1448-1459.
- Liu, S.-L.**, Lin, X., Shi, D.-Y., Cheng, J., Wu, C.-Q., and Zhang, Y.-D. (2002). Reactive oxygen species stimulated human hepatoma cell proliferation via cross-talk between PI3-K/PKB and JNK signaling pathways. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 406, 173-182.

- Liu, Y.**, Zheng, P., Liu, Y., Ji, T., Liu, X., Yao, S., Cheng, X., Li, Y., Chen, L., and Xiao, Z., et al. (2013). An epigenetic role for PRL-3 as a regulator of H3K9 methylation in colorectal cancer. *Gut* 62, 571-581.
- Llopis, A.**, Salvador, N., Ercilla, A., Guaita-Esteruelas, S., Barrantes, I.d.B., Gupta, J., Gaestel, M., Davis, R.J., Nebreda, A.R., and Agell, N. (2014a). The stress-activated protein kinases p38 α / β and JNK1/2 cooperate with Chk1 to inhibit mitotic entry upon DNA replication arrest. *Cell Cycle* 11, 3627-3637.
- Löffler, H.**, Rebacz, B., Ho, A.D., Lukas, J., Bartek, J., and Krämer, A. (2014). Chk1-Dependent Regulation of Cdc25B Functions to Coordinate Mitotic Events. *Cell Cycle* 5, 2543-2547.
- Lossaint, G.**, Besnard, E., Fisher, D., Piette, J., and Dulić, V. (2011). Chk1 is dispensable for G2 arrest in response to sustained DNA damage when the ATM/p53/p21 pathway is functional. *Oncogene* 30, 4261-4274.
- Lu, H.**, Ouyang, W., and Huang, C. (2006). Inflammation, a Key Event in Cancer Development. *Molecular Cancer Research* 4, 221-233.
- Lu, Z.**, Liu, M., Stribinskis, V., Klinge, C.M., Ramos, K.S., Colburn, N.H., and Li, Y. (2008). MicroRNA-21 promotes cell transformation by targeting the programmed cell death 4 gene. *Oncogene* 27, 4373-4379.
- MacFie, T.S.**, Poulosom, R., Parker, A., Warnes, G., Boitsova, T., Nijhuis, A., Suraweera, N., Poehlmann, A., Szary, J., and Feakins, R., et al. (2014). DUOX2 and DUOXA2 Form the Predominant Enzyme System Capable of Producing the Reactive Oxygen Species H₂O₂ in Active Ulcerative Colitis and are Modulated by 5-Aminosalicylic Acid. *Inflamm Bowel Dis* 20, 514-524.
- Maloy, K.J.**, and Powrie, F. (2011). Intestinal homeostasis and its breakdown in inflammatory bowel disease. *Nature* 474, 298-306.
- Mangerich, A.**, Dedon, P.C., Fox, J.G., Tannenbaum, S.R., and Wogan, G.N. (2013). Chemistry meets biology in colitis-associated carcinogenesis. *Free radical research* 47, 958-986.
- Mantovani, A.**, Allavena, P., Sica, A., and Balkwill, F. (2008). Cancer-related inflammation. *Nature* 454, 436-444.
- Matsuyama, M.**, Goto, H., Kasahara, K., Kawakami, Y., Nakanishi, M., Kiyono, T., Goshima, N., and Inagaki, M. (2011). Nuclear Chk1 prevents premature mitotic entry. *Journal of Cell Science* 124, 2113-2119.
- Meira, L.B.**, Bugni, J.M., Green, S.L., Lee, C.-W., Pang, B., Borenshtein, D., Rickman, B.H., Rogers, A.B., Moroski-Erkul, C.A., and McFaline, J.L., et al. (2008). DNA damage induced by chronic inflammation contributes to colon carcinogenesis in mice. *The Journal of clinical investigation* 118, 2516-2525.
- Menzel, T.**, Nähse-Kumpf, V., Kousholt, A.N., Klein, D.K., Lund-Andersen, C., Lees, M., Johansen, J.V., Syljuåsen, R.G., and Sørensen, C.S. (2011). A genetic screen identifies BRCA2 and PALB2 as key regulators of G2 checkpoint maintenance. *Embo Reports* 12, 705-712.
- Michael, M.Z.**, O' Connor, S.M., van Holst Pellekaan, N.G., Young, G.P., and James, R.J. (2003). Reduced accumulation of specific microRNAs in colorectal neoplasia. *Mol. Cancer Res.* 1, 882-891.
- Min, W.**, Bruhn, C., Grigaravicius, P., Zhou, Z.-W., Li, F., Krüger, A., Siddeek, B., Greulich, K.-O., Popp, O., and Meisezahl, C., et al. (2013). Poly(ADP-ribose) binding to Chk1 at stalled replication forks is required for S-phase checkpoint activation. *Nat Commun* 4.
- Mitamura, T.**, Sakamoto, S., Sassa, S., Suzuiki, S., Kudo, H., and Okayasu, I. (2002). The more an ulcerative colitis is repeated, the more the risk of colorectal carcinogenesis is increased in mice. *Anticancer Research* 22, 3955-3961.

- Neufert, C.**, Becker, C., and Neurath, M.F. (2007). An inducible mouse model of colon carcinogenesis for the analysis of sporadic and inflammation-driven tumor progression. *Nature protocols* *2*, 1998-2004.
- Niida, H.**, Katsuno, Y., Banerjee, B., Hande, M.P., and Nakanishi, M. (2007). Specific role of Chk1 phosphorylations in cell survival and checkpoint activation. *Mol.Cell.Biol.* *27*, 2572-2581.
- Patil, M.**, Pabla, N., and Dong, Z. (2013). Checkpoint kinase 1 in DNA damage response and cell cycle regulation. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* *70*, 4009-4021.
- Pei, H.**, Zhang, L., Luo, K., Qin, Y., Chesi, M., Fei, F., Bergsagel, P.L., Wang, L., You, Z., and Lou, Z. (2011). MMSET regulates histone H4K20 methylation and 53BP1 accumulation at DNA damage sites. *Nature* *470*, 124-128.
- Poehlmann, A.**, Reissig, K., Just, A., Walluscheck, D., Hartig, R., Schinlauer, A., Lessel, W., Guenther, T., Silver, A., and Steinberg, P., et al. (2013a). Non-apoptotic function of caspases in a cellular model of hydrogen peroxide-associated colitis. *Journal of cellular and molecular medicine* *17*, 901-913.
- Poehlmann, A.**, Reissig, K., Schönfeld, P., Walluscheck, D., Schinlauer, A., Hartig, R., Lessel, W., Guenther, T., Silver, A., and Roessner, A. (2013b). Repeated H₂ O₂ exposure drives cell cycle progression in an in vitro model of ulcerative colitis. *Journal of cellular and molecular medicine* *17*, 1619-1631.
- Poehlmann, A.**, and Roessner, A. (2010). Importance of DNA damage checkpoints in the pathogenesis of human cancers. *Pathol.Res.Pract.* *206*, 591-601.
- Potapova, O.**, Gorospe, M., Dougherty, R.H., Dean, N.M., Gaarde, W.A., and Holbrook, N.J. (2000). Inhibition of c-Jun N-Terminal Kinase 2 Expression Suppresses Growth and Induces Apoptosis of Human Tumor Cells in a p53-Dependent Manner. *Mol.Cell.Biol.* *20*, 1713-1722.
- Pravda, J.** (2004). Radical induction theory of ulcerative colitis.
- Queiroz de Oliveira, P.E., Zhang, L., Wang, Z., and Reese, C. (2009). Hypoxia-mediated regulation of Cdc25A phosphatase by p21 and miR-21. *Cell Cycle* *8*, 3157-3164.
- Reinhardt, H.C.**, Aslanian, A.S., Lees, J.A., and Yaffe, M.B. (2007). p53-Deficient Cells Rely on ATM- and ATR-Mediated Checkpoint Signaling through the p38MAPK/MK2 Pathway for Survival after DNA Damage. *Cancer Cell* *11*, 175-189.
- Reuter, S.**, Gupta, S.C., Chaturvedi, M.M., and Aggarwal, B.B. (2010). Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked? *Free radical biology & medicine* *49*, 1603-1616.
- Revet, I.**, Feeney, L., Bruguera, S., Wilson, W., Dong, T.K., Oh, D.H., Dankort, D., and Cleaver, J.E. (2011). Functional relevance of the histone gammaH2Ax in the response to DNA damaging agents. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *108*, 8663-8667.
- Richards, E.J.**, and Elgin, S.C.R. (2002). Epigenetic Codes for Heterochromatin Formation and Silencing. *Cell* *108*, 489-500.
- Roessner, A.**, Kuester, D., Malfertheiner, P., and Schneider-Stock, R. (2008). Oxidative stress in ulcerative colitis-associated carcinogenesis. *Pathology - Research and Practice* *204*, 511-524.
- Rokavec, M.**, Wu, W., and Luo, J.-L. (2012). IL6-Mediated Suppression of miR-200c Directs Constitutive Activation of Inflammatory Signaling Circuit Driving Transformation and Tumorigenesis. *Molecular Cell* *45*, 777-789.
- Sabapathy, K.**, Hochedlinger, K., Nam, S.Y., Bauer, A., Karin, M., and Wagner, E.F. (2004). Distinct Roles for JNK1 and JNK2 in Regulating JNK Activity and c-Jun-Dependent Cell Proliferation. *Molecular Cell* *15*, 713-725.

- Sakurikar, N.**, and Eastman, A. (2015). Will Targeting Chk1 Have a Role in the Future of Cancer Therapy? *Journal of Clinical Oncology* *33*, 1075-1077.
- Sanchez, Y.**, Wong, C., Thoma, R.S., Richman, R., Wu, R.Q., Piwnica-Worms, H., and Elledge, S.J. (1997). Conservation of the Chk1 checkpoint pathway in mammals: Linkage of DNA damage to Cdk regulation through Cdc25. *Science* *277*, 1497-1501.
- Scorah, J.**, Dong, M.-Q., Yates, J.R., Scott, M., Gillespie, D., and McGowan, C.H. (2008). A Conserved Proliferating Cell Nuclear Antigen-interacting Protein Sequence in Chk1 Is Required for Checkpoint Function. *J.Biol.Chem.* *283*, 17250-17259.
- Seril, D.N.**, Liao, J., Yang, G.Y., and Yang, C.S. (2003). Oxidative stress and ulcerative colitis-associated carcinogenesis: studies in humans and animal models. *Carcinogenesis* *24*, 353-362.
- Shaltiel, I.A.**, Krenning, L., Bruinsma, W., and Medema, R.H. (2015). The same, only different - DNA damage checkpoints and their reversal throughout the cell cycle. *Journal of Cell Science* *128*, 607-620.
- Shen, T.**, and Huang, S. (2012). The role of Cdc25A in the regulation of cell proliferation and apoptosis. *Anti-cancer agents in medicinal chemistry* *12*, 631-639.
- Shibata, A.**, Barton, O., Noon, A.T., Dahm, K., Deckbar, D., Goodarzi, A.A., Lobrich, M., and Jeggo, P.A. (2010). Role of ATM and the Damage Response Mediator Proteins 53BP1 and MDC1 in the Maintenance of G2/M Checkpoint Arrest. *Mol.Cell.Biol.* *30*, 3371-3383.
- Shibata, W.**, Maeda, S., Hikiba, Y., Yanai, A., Sakamoto, K., Nakagawa, H., Ogura, K., Karin, M., and Omata, M. (2008). c-Jun NH2-Terminal Kinase 1 Is a Critical Regulator for the Development of Gastric Cancer in Mice. *Cancer Res* *68*, 5031-5039.
- Shimada, M.**, Haruta, M., Niida, H., Sawamoto, K., and Nakanishi, M. (2010). Protein phosphatase 1 gamma is responsible for dephosphorylation of histone H3 at Thr 11 after DNA damage. *Embo Reports* *11*, 883-889.
- Shimada, M.**, and Nakanishi, M. (2006). DNA damage checkpoints and cancer. *Journal of Molecular Histology* *37*, 253-260.
- Shimada, M.**, and Nakanishi, M. (2008). Checkpoints meet the transcription at a novel histone milestone (H3-T11). *Cell Cycle* *7*, 1555-1559.
- Shimada, M.**, Niida, H., Zineldeen, D.H., Tagami, H., Tanaka, M., Saito, H., and Nakanishi, M. (2008). Chk1 is a histone H3 threonine 11 kinase that regulates DNA damage-induced transcriptional repression. *Cell* *132*, 221-232.
- Shiromizu, T.**, Goto, H., Tomono, Y., Bartek, J., Totsukawa, G., Inoko, A., Nakanishi, M., Matsumura, F., and Inagaki, M. (2006). Regulation of mitotic function of Chk1 through phosphorylation at novel sites by cyclin-dependent kinase 1 (Cdk1). *Genes Cells* *11*, 477-485.
- Si, M.-L.**, Zhu, S., Wu, H., Lu, Z., Wu, F., and Mo, Y.-Y. (2007). miR-21-mediated tumor growth. *Oncogene* *26*, 2799-2803.
- Smits, V.A.J.**, Reaper, P.M., and Jackson, S.P. (2006). Rapid PIKK-dependent release of Chk1 from chromatin promotes the DNA-damage checkpoint response. *Current Biology* *16*, 150-159.
- Speroni, J.**, Federico, M.B., Mansilla, S.F., Soria, G., and Gottifredi, V. (2012). Kinase-independent function of checkpoint kinase 1 (Chk1) in the replication of damaged DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *109*, 7344-7349.
- Syljuasen, R.G.**, Sorensen, C.S., Hansen, L.T., Fugger, K., Lundin, C., Johansson, F., Helleday, T., Sehested, M., Lukas, J., and Bartek, J. (2005). Inhibition of Human Chk1 Causes Increased Initiation

of DNA Replication, Phosphorylation of ATR Targets, and DNA Breakage. *Mol.Cell.Biol.* **25**, 3553-3562.

Takai, H., Tominaga, K., Motoyama, N., Minamishima, Y.A., Nagahama, H., Tsukiyama, T., Ikeda, K., Nakayama, K., and Nakanishi, M. (2000). Aberrant cell cycle checkpoint function and early embryonic death in Chk1(-/-) mice. *Genes & Development* **14**, 1439-1447.

Terzic, J., Grivennikov, S., Karin, E., and Karin, M. (2010). Inflammation and Colon Cancer. *Gastroenterology* **138**, 2101-2114.

Thannickal, V.J., and Fanburg, B.L. (2000). Reactive oxygen species in cell signaling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **279**, L1005.

Turgeon, N., Blais, M., Gagné, J.-M., Tardif, V., Boudreau, F., Perreault, N., and Asselin, C. (2013). HDAC1 and HDAC2 restrain the intestinal inflammatory response by regulating intestinal epithelial cell differentiation. *Plos One* **8**, e73785.

Ullman, T.A., and Itzkowitz, S.H. (2011). Intestinal inflammation and cancer. *Gastroenterology* **140**, 1807-1816.

Vigneron, A., Cherier, J., Barre, B., Gamelin, E., and Coqueret, O. (2006). The Cell Cycle Inhibitor p21waf1 Binds to the myc and cdc25A Promoters upon DNA Damage and Induces Transcriptional Repression. *J.Biol.Chem.* **281**, 34742-34750.

Walker, M., Black, E.J., Oehler, V., Gillespie, D.A., and Scott, M.T. (2009). Chk1 C-terminal regulatory phosphorylation mediates checkpoint activation by de-repression of Chk1 catalytic activity. *Oncogene* **28**, 2314-2323.

Walworth, N., Davey, S., and Beach, D. (1993). Fission yeast chk1 protein kinase links the rad checkpoint pathway to cdc2. *Nature* **363**, 368-371.

Wang, G.G., Allis, C.D., and Chi, P. (2007a). Chromatin remodeling and cancer, Part I: Covalent histone modifications. *Trends in Molecular Medicine* **13**, 363-372.

Wang, G.G., Allis, C.D., and Chi, P. (2007b). Chromatin remodeling and cancer, Part II: ATP-dependent chromatin remodeling. *Trends in Molecular Medicine* **13**, 373-380.

Wang, J.N., Han, X.Z., Feng, X.J., Wang, Z.H., and Zhang, Y.W. (2012). Coupling Cellular Localization and Function of Checkpoint Kinase 1 (Chk1) in Checkpoints and Cell Viability. *J.Biol.Chem.* **287**, 25501-25509.

Wang, P., Zou, F., Zhang, X., Li, H., Dulak, A., Tomko, R.J., Lazo, J.S., Wang, Z., Zhang, L., and Yu, J. (2009a). microRNA-21 Negatively Regulates Cdc25A and Cell Cycle Progression in Colon Cancer Cells. *Cancer Res* **69**, 8157-8165.

Wang, Y., Zhang, W., Jin, Y., Johansen, J., and Johansen, K.M. (2001). The JIL-1 Tandem Kinase Mediates Histone H3 Phosphorylation and Is Required for Maintenance of Chromatin Structure in *Drosophila*. *Cell* **105**, 433-443.

Wang, Z., Wang, M., Kar, S., and Carr, B.I. (2009b). Involvement of ATM-mediated Chk1/2 and JNK kinase signaling activation in HKH40A-induced cell growth inhibition. *Journal of cellular physiology* **221**, 213-220.

Weinberg, R.A. (2013). *The Biology of Cancer*.

Wisdom, R., Johnson, R.S., and Moore, C. (1999). c-Jun regulates cell cycle progression and apoptosis by distinct mechanisms. *The EMBO Journal* **18**, 188-197.

Xu, N., Lao, Y., Zhang, Y., and Gillespie, D.A. (2012). Akt: A Double-Edged Sword in Cell Proliferation and Genome Stability. *Journal of Oncology* **2012**, 15.

- Zachos, G.**, Black, E.J., Walker, M., Scott, M.T., Vagnarelli, P., Earnshaw, W.C., and Gillespie, David A F (2007). Chk1 is required for spindle checkpoint function. *Developmental cell* *12*, 247-260.
- Zhang, Y.**, and Hunter, T. (2014). Roles of Chk1 in cell biology and cancer therapy. *International journal of cancer. Journal international du cancer* *134*, 1013-1023.
- Zhang, Y.W.**, Otterness, D.M., Chiang, G.G., Xie, W.L., Liu, Y.C., Mercurio, F., and Abraham, R.T. (2005). Genotoxic stress targets human Chk1 for degradation by the ubiquitin-proteasome pathway. *Molecular Cell* *19*, 607-618.
- Zhao, H.**, Watkins, J.L., and Piwnica-Worms, H. (2002). Disruption of the checkpoint kinase 1/cell division cycle 25A pathway abrogates ionizing radiation-induced S and G(2) checkpoints. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *99*, 14795-14800.
- Zhou, Y.**, Wang, Q., Evers, B.M., and Chung, D.H. (2005). Signal Transduction Pathways Involved in Oxidative Stress-Induced Intestinal Epithelial Cell Apoptosis. *Pediatr Res* *58*, 1192-1197.
- Zhu, H.**, and Li, Y.R. (2012). Oxidative stress and redox signaling mechanisms of inflammatory bowel disease: updated experimental and clinical evidence. *Experimental biology and medicine (Maywood, N.J.)* *237*, 474-480.
- Zhu, S.**, Si, M.-L., Wu, H., and Mo, Y.-Y. (2007). MicroRNA-21 targets the tumor suppressor gene tropomyosin 1 (TPM1). *The Journal of biological chemistry* *282*, 14328-14336.
- Zoratto, F.**, Rossi, L., Verrico, M., Papa, A., Basso, E., Zullo, A., Tomao, L., Romiti, A., Lo Russo, G., and Tomao, S. (2014). Focus on genetic and epigenetic events of colorectal cancer pathogenesis: implications for molecular diagnosis. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* *35*, 6195-6206.

8 ANHANG

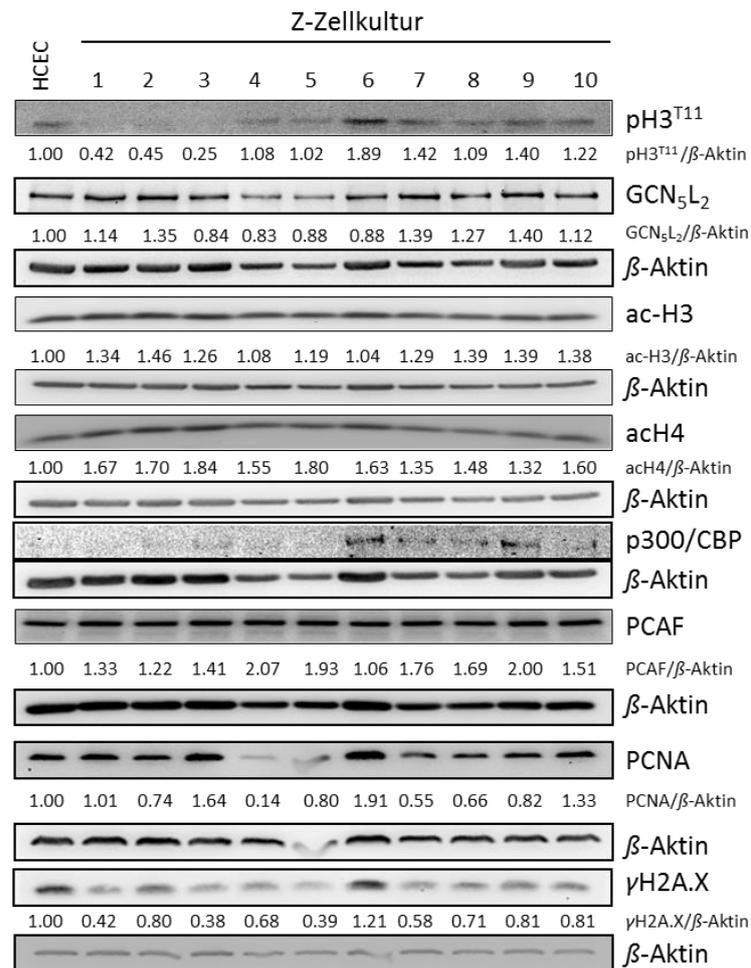


Abb. A 1: Proteinexpression in den Z-Zellkulturen Z1-Z10. Western Blot-Analysen ohne H₂O₂-Behandlung der Z-Zellkulturen im Vergleich zu unbehandelten HCEC. Proteinlevel relevanter Proteine im Vergleich zum *housekeeping*-Gen β-Aktin, Xfache. (z. T. Pöhlmann unpublished data)

8.1 Datentabellen/Messwerte

8.1.1 Originaldaten der Western Blot-Analysen

Nachfolgend sind die Messdaten der Western Blot-Analysen aufgelistet. Ermittelt durch Chemilumineszenz-Technik. Korrigiert durch den Wert des *house keepers* β-Aktin. Das Xfache des Proteinlevels im Vergleich zur Kontrolle (Kontrolldefinition siehe Abb.). Mittelwerte (Mittel) ± Standardabweichung (SD). Signifikanzwert p.

Tab. 11-A2: zu Abb. 9. 200 μ M H₂O₂ vs. Kontrolle in HCEC.

Protein/ Versuch	Chk1			pChk1 ^{S317}			pChk1 ^{S345}		
	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
1	0,75	0,38	0,21	2,30	1,82	2,42	2,22	1,81	2,09
2	0,61	0,32	0,27	2,09	2,00	1,99	2,70	2,74	1,87
3	0,46	0,39	0,43	1,82	2,00	2,15	1,30	1,69	1,19
4	0,55	0,40	0,51	1,18	-	-	1,24	-	-
5	0,48	0,21	0,43	2,52	-	-	-	-	-
Mittel	0,52	0,34	0,39	1,98	1,94	2,19	1,86	2,09	1,72
\pm SD	0,14	0,08	0,09	0,37	0,25	0,18	0,62	0,47	0,38
p	0,008	0,008	<0,001	0,008	<0,001	<0,001	0,029	0,031	0,057

Tab. 12-A3: zu Abb. 10. Chk1-siRNA-Behandlung und 200 μ M H₂O₂ vs. siRNA-Kontrolle und 200 μ M H₂O₂ in HCEC.

Protein/ Versuch 24 h	Chk1	pChk1 ^{S317}	JNK p54	JNK p46	pJnk p54	pJnk p46	c-Jun	pc-Jun ^{S63}	p21 ^{WAF1}	γ H2A.X	H2A.X
1	0,46	0,75	1,16	0,91	3,34	2,45	1,32	1,55	1,59	3,78	1,24
2	0,50	0,74	1,20	1,00	1,67	1,97	1,26	1,36	1,45	2,67	1,11
3	0,54	0,80	1,26	0,93		1,46	1,20	1,17	1,38	1,81	1,33
Mittel	0,50	0,76	1,21	0,95	2,50	1,96	1,26	1,36	1,47	2,75	1,23
\pm SD	0,03	0,03	0,04	0,04	0,83	0,41	0,05	0,16	0,09	0,81	0,09
p	<0,001	<0,001	0,002	0,131	0,094	0,029	<0,001	0,031	<0,001	0,037	0,023
Protein/ Versuch 48 h	Chk1	pChk1 ^{S317}	JNK p54	JNK p46	pJnk p54	pJnk p46	c-Jun	pc-Jun ^{S63}	p21 ^{WAF1}	γ H2A.X	H2A.X
1	0,46	0,75	0,99	0,96	1,91	1,92	1,31	1,43	0,92	1,79	1,08
2	0,77	0,96	1,00	1,25	1,11	1,26	1,15	1,22	1,24	1,31	1,25
3	0,32	0,85	1,68	1,30	0,75	1,04		1,66	1,43	1,73	1,44
4			0,88	1,40	1,72	1,65	0,96	1,39	0,77	1,02	1,53
Mittel	0,51	0,85	1,14	1,23	1,37	1,47	1,14	1,43	1,09	1,46	1,32
\pm SD	0,19	0,11	0,32	0,16	0,47	0,34	0,14	0,16	0,26	0,31	0,18
p	0,008	0,053	0,343	0,343	0,241	0,029	0,130	0,029	0,561	0,011	0,029
Protein/ Versuch 72 h	Chk1	pChk1 ^{S317}	JNK p54	JNK p46	pJnk p54	pJnk p46	c-Jun	pc-Jun ^{S63}	p21 ^{WAF1}	γ H2A.X	H2A.X
1	0,68	0,61	0,87	0,97	1,78	1,87	1,18	1,18	1,05	1,32	1,10
2	0,38	0,65	0,79	0,88	0,77	1,79	0,75	0,82	0,42	0,42	0,90
3			1,42				0,74	1,09	0,72	0,75	1,37
Mittel	0,53	0,63	1,03	0,93	1,27	1,83	0,89	1,03	0,73	0,83	1,12
\pm SD	0,15	0,02	0,04	0,05	0,50	0,04	0,21	0,15	0,26	0,37	0,19
p	0,023	<0,001	0,813	0,124	0,518	<0,001	0,505	0,803	0,214	0,550	0,427

Tab. 13-A4: zu Abb. 11. Chk1-siRNA-Behandlung ohne 200 μ M H₂O₂ vs. siRNA-Kontrolle ohne 200 μ M H₂O₂ in HCEC.

Protein/ Versuch 24 h	Chk1	pChk1 ^{S317}	JNK p54	JNK p46	pJnk p54	pJnk p46	c-Jun	pc-Jun ^{S63}	p21 ^{WAF1}	γ H2A.X	H2A.X
1	0,38	0,47	0,92	0,86		0,96	0,98	0,72	1,01	0,94	0,79
2	0,68	1,08	1,2	1,5	1,11	1,24	0,94	1,56	1,35	1,98	1,01
3	0,36	0,76	0,9	0,76	0,83	0,95	0,98	0,86	0,83		1,38
Mittel	0,47	0,77	1,01	1,04	0,97	1,05	0,97	1,05	1,06	1,46	1,06
\pm SD	0,15	0,25	0,14	0,33	0,14	0,13	0,02	0,37	0,22	0,52	0,24
p	0,007	0,262	0,948	0,871	0,792	0,627	0,067	0,866	0,699	0,321	0,745

Tab. 14-A5: zu Abb. 13. SP600125 und 200 μ M H₂O₂ vs. DMSO-Kontrolle und 200 μ M H₂O₂ in HCEC.

Protein	Chk1	pChk1 ^{S317}	pChk1 ^{S345}
Versuch			
1	1,07	1,44	1,29
2	1,19	1,51	1,30
3	0,78	1,42	-
4	-	1,07	1,33
Mittel	0,99	1,34	1,31
\pm SD	0,03	0,04	0,06
p	0,629	0,029	<0,050

Tab. 15-A6: zu Abb. 15. Z-Zellkulturen vs. HCEC.

Protein	Chk1	pChk1 ^{S317}	pChk1 ^{S345}
Z-Zellkultur			
1	0,42	2,11	0,71
2	0,53	2,79	0,99
3	0,81	1,41	0,71
4	0,16	2,08	0,90
5	0,41	2,16	1,29
6	0,71	2,24	1,10
7	0,38	1,79	1,46
8	0,26	1,09	1,78
9	0,86	1,66	1,94
10	0,70	2,01	1,46

Tab. 16-A7: zu Abb. 17. Chk1-siRNA-Behandlung vs. siRNA-Kontrolle in Z-Zellkulturen.

Protein/ Versuch Z3	Chk1	pChk1 ^{S317}	JNK p54	JNK p46	pJnk p54	pJnk p46	c-Jun	pc-Jun ^{S63}	p21 ^{WAF1}	γH2A.X	H2A.X
1	0,74	1,19	1,04	1,07	1,26	1,25	0,93		0,68	1,19	
2	0,50	0,92	1,01	1,09	-	-	0,94	0,51	0,71	0,90	1,01
3	0,56	-	1,10	1,14	1,11	1,13	1,35		1,24	1,22	1,17
Mittel	0,60	1,06	1,05	1,10	1,19	1,19	1,07	0,51	0,88	1,10	1,09
± SD	0,10	0,13	0,04	0,03	0,08	0,06	0,20	0,00	0,26	0,15	0,08
p	0,005	0,623	0,132	0,009	0,045	0,024	0,624		0,535	0,368	0,228
Protein/ Versuch Z5	Chk1	pChk1 ^{S317}	JNK p54	JNK p46	pJnk p54	pJnk p46	c-Jun	pc-Jun ^{S63}	p21 ^{WAF1}	γH2A.X	H2A.X
1	0,48	0,84	0,56	0,60	1,89	2,19	0,76	1,11	0,54	0,46	-
2	-	0,90	0,83	0,98	1,63	1,75	1,31	0,58	1,26	1,29	1,10
3	0,67	0,55	0,93	0,98	-	1,23	1,06	0,92	0,73	1,14	0,97
Mittel	0,58	0,76	0,77	0,85	1,76	1,72	1,04	0,87	0,85	0,96	1,03
± SD	0,10	0,15	0,16	0,18	0,13	0,39	0,22	0,22	0,31	0,36	0,06
p	0,009	0,094	0,110	0,311	0,004	0,060	0,799	0,449	0,507	0,893	0,522
Protein/ Versuch Z10	Chk1	pChk1 ^{S317}	JNK p54	JNK p46	pJnk p54	pJnk p46	c-Jun	pc-Jun ^{S63}	p21 ^{WAF1}	γH2A.X	H2A.X
1	0,26	0,44	0,82	0,89	2,24	1,05	1,03	0,85	0,98	1,18	1,08
2	0,38	0,80	0,79	0,61	-	-	-	0,74	0,89	0,68	0,86
3	0,82	0,58	0,64	0,71	1,60	2,26	-	0,80	0,53	1,64	0,82
4	0,68	1,09	1,22	1,22	1,54	1,38	1,13	1,14	1,15	-	1,11
Mittel	0,53	0,73	0,87	0,86	1,79	1,56	1,08	0,88	0,89	1,16	0,97
± SD	0,22	0,24	0,22	0,23	0,31	0,51	0,05	0,15	0,23	0,39	0,13
p	0,012	0,103	0,343	0,329	0,008	0,121	0,059	0,343	0,343	0,629	0,677

Tab. 17-A8: zu Abb. 18. 200 μ M H₂O₂ vs. Kontrolle in Z10.

Protein/ Versuch 24 h	Chk1	pChk1 ^{S317}	JNK p54	JNK p46	pJnk p54	pJnk p46	c-Jun	pc-Jun ^{S63}	p21 ^{WAF1}	γ H2A.X	H2A.X
1	1,35	0,80	0,83	0,98	0,84	1,03	1,40	3,22	1,06	2,69	1,28
2	0,52	-	0,96	0,92	0,81	-	0,82	3,59		1,96	-
3	0,77	0,86	0,84	0,82	1,18	0,91	0,98	2,74	0,82		1,21
Mittel	0,88	0,83	0,88	0,91	0,94	0,97	1,07	3,19	0,94	2,32	1,25
\pm SD	0,35	0,03	0,06	0,06	0,17	0,06	0,24	0,35	0,12	0,37	0,04
p	0,651	0,005	0,042	0,116	0,658	0,550	0,720	<0,001	0,550	0,017	0,003
Protein/ Versuch 48 h	Chk1	pChk1 ^{S317}	JNK p54	JNK p46	pJnk p54	pJnk p46	c-Jun	pc-Jun ^{S63}	p21 ^{WAF1}	γ H2A.X	H2A.X
1	1,01	0,75	0,90	0,96	1,13	1,29	1,40	4,54	1,06	2,77	1,10
2	0,91	1,67	1,23	1,26	1,29	2,08	1,16	4,15		2,17	1,21
3	0,85	0,98	0,86	0,53	1,50	1,39	1,03	1,96	1,16		0,89
Mittel	0,92	1,13	0,99	0,91	1,30	1,59	1,20	3,55	1,11	2,47	1,07
\pm SD	0,07	0,39	0,17	0,30	0,15	0,35	0,15	0,20	0,05	0,30	0,13
p	0,176	0,655	0,979	0,714	0,046	0,077	0,144	0,034	0,060	0,007	0,512
Protein/ Versuch 72 h	Chk1	pChk1 ^{S317}	JNK p54	JNK p46	pJnk p54	pJnk p46	c-Jun	pc-Jun ^{S63}	p21 ^{WAF1}	γ H2A.X	H2A.X
1	1,11	0,62	0,90	0,98			1,22		0,65	2,20	0,76
2	0,70	1,01	0,88	0,95			0,92			2,53	0,89
3	1,04	1,10	1,19	1,28	1,25	1,22	1,26	3,66	1,17		
Mittel	0,95	0,91	0,99	1,07	1,25	1,22	1,13	3,66	0,91	1,76	1,45
\pm SD	0,18	0,21	0,14	0,15	0,00	0,00	0,15	0,00	0,26	0,17	0,07
p	0,713	0,574	0,925	0,543			0,282		0,674	0,002	0,036

Tab. 18-A9: zu Abb. 19. Chk1-siRNA-Behandlung mit 200 μ M H₂O₂ vs. siRNA-Kontrolle mit 200 μ M H₂O₂ in HCEC.

Protein/ Versuch	Chk1	pChk1 ^{S317}	JNK p54	JNK p46	pJnk p54	pJnk p46	c-Jun	pc-Jun ^{S63}	p21 ^{WAF1}	γ H2A.X	H2A.X
1	0,58	1,17	0,74	-	1,10	1,14	1,19	1,17	1,15	2,36	1,14
2	0,60	0,49	0,90	0,91	0,95	1,21	1,36	1,03	-	2,36	0,79
3	0,44	0,86	1,18	0,99	0,87	1,48	1,36	1,00	1,46	-	1,06
Mittel	0,54	0,84	0,94	0,95	0,97	1,28	1,30	1,07	1,31	2,36	1,00
\pm SD	0,06	0,24	0,15	0,03	0,08	0,13	0,07	0,06	0,13	0,00	0,13
p	<0,001	0,461	0,665	0,192	0,713	0,056	0,006	0,272	0,078	<0,001	0,976

Tab. 19-A10: zu Abb. 22. Fraktionierung. HCEC mit 200 μM H_2O_2 , Z10-Zellen und Z10-Zellen mit 200 μM H_2O_2 .

Chk1	HCEC + H_2O_2				Z10-Zellen				Z10-Zellen + H_2O_2			
	GZL	Chromatin	löslich nukleär	Zytosol	GZL	Chromatin	löslich nukleär	Zytosol	GZL	Chromatin	löslich nukleär	Zytosol
	0,40		0,93	1,06								
	0,64		1,05	1,19								
	0,61		0,93	1,07								0,72
	0,46	0,63	0,97	1,13			0,70	1,56			0,70	0,88
	0,55	0,80	0,78	0,91	0,70	1,34	0,60	0,93	0,84	2,42	0,82	0,43
	0,48	0,65	1,07	0,95	0,52	1,46	1,15	1,39	0,62	2,30	0,78	1,35
Mittel	0,52	0,69	0,95	1,05	0,61	1,40	0,82	1,29	0,73	2,36	0,77	0,85
\pm SD	0,08	0,08	0,09	0,10	0,09	0,06	0,24	0,27	0,11	0,06	0,05	0,33
p	0,001	0,005	0,394	0,394	0,049	0,022	0,339	0,194	0,134	0,002	0,003	0,451

Tab. 20-A11: zu Abb. 23. Fraktionierung. HCEC mit 200 μM H_2O_2 , Z10-Zellen und Z10-Zellen mit 200 μM H_2O_2 .

pChk 1 ^{S317}	HCEC + H_2O_2				Z10-Zellen				Z10-Zellen + H_2O_2				
	Versuch	GZL	Chromatin	löslich nukleär	Zytosol	GZL	Chromatin	löslich nukleär	Zytosol	GZL	Chromatin	löslich nukleär	Zytosol
1				1,11	0,89								
2	2,09		1,33	1,43	1,01					3,01	0,88		
3	1,82	1,62	2,12	0,95	1,48					1,77	2,00		
4	1,46	1,73	1,09	0,97	1,61	1,41	1,04	1,49	1,34	1,30	1,10	2,15	
5	2,41	1,72	1,58	1,66	2,96	2,76	1,78	1,56	1,22	1,45	1,75	3,16	
Mittel	1,95	1,69	1,53	1,22	1,59	2,09	1,41	1,53	1,28	1,88	1,43	2,66	
\pm SD	0,13	0,05	0,38	0,28	0,30	0,68	0,37	0,04	0,06	0,67	0,46	0,50	
p	0,003	0,001	0,053	0,145	0,151	0,249	0,383	0,004	0,043	0,029	0,153	0,082	

Tab. 21-A12: zu Abb. 24/25. Fraktionierung. HCEC mit 200 μM H_2O_2 , Z10-Zellen und Z10-Zellen mit 200 μM H_2O_2 .

pH3 ^{T11}	Chromatin		
	HCEC + H ₂ O ₂	Z10-Zellen	Z10-Zellen + H ₂ O ₂
Versuch			
1	1,31	2,12	1,53
2	1,13		
3	1,18	1,22	1,59
4	1,28	1,57	1,89
Mittel	1,23	1,64	1,67
± SD	0,07	0,37	0,16
p	0,029	0,072	0,004

GCN ₅	Chromatin		
	HCEC + H ₂ O ₂	Z10-Zellen	Z10-Zellen + H ₂ O ₂
Versuch			
1	1,71	10,07	9,87
2	2,11	4,40	13,70
Mittel	1,91	7,24	11,79
± SD	0,20	2,84	1,91
p	0,045	0,159	0,030

Tab. 22-A13: zu Abb. 26. Fraktionierung. HCEC mit 200 μM H_2O_2 , Z10-Zellen und Z10-Zellen mit 200 μM H_2O_2 .

Histonmodifikationen	Versuch	Chromatin								
		HCEC + H ₂ O ₂			Z10-Zellen			Z10-Zellen + H ₂ O ₂		
		acH3 ^{K9}	acH3	acH4	acH3 ^{K9}	ac H3	acH4	acH3 ^{K9}	ac H3	acH4
1	1,36	1,57	1,15	1,77	1,62		2,86	2,40		
2	1,14	0,93	1,34	1,14	1,64	1,23	1,33	1,72	2,19	
3	0,95	2,17	1,11	2,97	2,54		4,69	2,03		
Mittel	1,15	1,56	1,20	1,96	1,93	1,23	2,96	2,05	2,19	
± SD	0,17	0,51	0,10	0,76	0,43	0,00	1,37	0,28	0,00	
p	0,274	0,195	0,048	0,148	0,037		0,114	0,006		

Tab. 23-A14: zu Abb. 27. Fraktionierung. HCEC mit 200 μM H_2O_2 , Z10-Zellen und Z10-Zellen mit 200 μM H_2O_2 .

HATs	Chromatin								
	HCEC + H ₂ O ₂			Z10-Zellen			Z10-Zellen + H ₂ O ₂		
Versuch	PCAF	p300/ CBP	PCNA	PCAF	p300/ CBP	PCNA	PCAF	p300/ CBP	PCNA
1				4,02			7,90		
2	1,69		1,08	3,77	6,12	0,98	2,74	10,49	1,41
3	2,09	1,08	1,03	2,62	8,26	1,08	2,04	14,16	1,13
Mittel	1,89		1,05	3,47	7,19	1,03	4,23	12,33	1,27
± SD	0,20		0,02	0,61	1,07	0,05	2,61	1,84	0,14
p	0,047		0,159	0,021	0,029	0,609	0,269	0,025	0,194

Tab. 24-A15: zu Abb. 28. Fraktionierung nach Chk1-siRNA-Behandlung. HCEC mit 200 μ M H₂O₂, Z10-Zellen und Z10-Zellen mit 200 μ M H₂O₂.

Chk1	Chromatin			löslich nukleär			Zytosol		
ohne siRNA Versuch	HCEC + H ₂ O ₂	Z10-Zellen	Z10-Zellen + H ₂ O ₂	HCEC + H ₂ O ₂	Z10-Zellen	Z10-Zellen + H ₂ O ₂	HCEC + H ₂ O ₂	Z10-Zellen	Z10-Zellen + H ₂ O ₂
1				0,97	0,70		0,78	1,56	
2	0,80	1,34		1,32	0,60		1,01	0,93	
3	0,65	1,46	1,96	0,78	1,15	0,99	0,91	1,39	1,27
Mittel	0,73	1,40	1,96	1,02	0,82	0,99	0,90	1,29	1,27
\pm SD	0,07	0,06		0,27	0,05		0,09	0,27	
vs. K; p	0,067	0,022		0,890	0,339		0,208	0,194	
Chk1	Chromatin			löslich nukleär			Zytosol		
siRNA-Kontrolle Versuch	HCEC + H ₂ O ₂	Z10-Zellen	Z10-Zellen + H ₂ O ₂	HCEC + H ₂ O ₂	Z10-Zellen	Z10-Zellen + H ₂ O ₂	HCEC + H ₂ O ₂	Z10-Zellen	Z10-Zellen + H ₂ O ₂
1		0,69			1,04			1,64	
2		1,97		0,95	0,61		0,63	1,02	
3	0,65	1,08		1,11	0,84		0,76	1,99	
4	0,77	1,62	2,19	0,81	1,07	1,13	0,91	1,19	1,23
Mittel	0,71	1,34	2,19	0,96	0,89	1,13	0,77	1,45	1,23
\pm SD	0,06	0,35		0,12	0,23		0,11	0,29	
vs. H ₂ O ₂ ; p	0,145	0,859		0,730	0,715		0,272	0,604	
Chk1	Chromatin			löslich nukleär			Zytosol		
Chk1-siRNA Versuch	HCEC + H ₂ O ₂	Z10-Zellen	Z10-Zellen + H ₂ O ₂	HCEC + H ₂ O ₂	Z10-Zellen	Z10-Zellen + H ₂ O ₂	HCEC + H ₂ O ₂	Z10-Zellen	Z10-Zellen + H ₂ O ₂
1		0,39			0,57		0,58	1,01	
2		0,27		0,58	0,21		0,34	0,35	
3	0,44	0,88		0,46	0,32		0,43	0,68	
4	0,79	0,41	1,16	0,61	0,43	0,29	0,70	0,44	0,33
Mittel	0,62	0,49	1,16	0,54	0,39	0,29	0,50	0,62	0,33
\pm SD	0,18	0,17		0,09	0,16		0,14	0,20	
vs. siRNA-Kontrolle + H ₂ O ₂ ; p	0,659	0,035		0,014	0,008		0,080	0,019	

Tab. 25-A16: zu Abb. 29. Fraktionierung nach Chk1-siRNA-Behandlung. HCEC mit 200 μ M H₂O₂, Z10-Zellen und Z10-Zellen mit 200 μ M H₂O₂.

pChk1 ^{S317}	Chromatin			löslich nukleär			Zytosol		
ohne siRNA Versuch	HCEC + H ₂ O ₂	Z10-Zellen	Z10-Zellen + H ₂ O ₂	HCEC + H ₂ O ₂	Z10-Zellen	Z10-Zellen + H ₂ O ₂	HCEC + H ₂ O ₂	Z10-Zellen	Z10-Zellen + H ₂ O ₂
1							0,95		
2		1,41	2,73	1,98	1,04	0,90	0,97	1,49	2,25
3	1,62	2,76	3,32	1,29	1,78	1,34	1,08	1,56	2,86
Mittel	1,62	2,09	3,03	1,64	1,41	1,12	1,00	1,53	2,56
± SD		0,68	0,16	0,35	0,37	0,22	0,06	0,04	0,30
vs. K; p		0,058	<0,001	0,040	0,145	0,423	1,0	<0,001	0,001
pChk1 ^{S317}	Chromatin			löslich nukleär			Zytosol		
siRNA-Kontrolle Versuch	HCEC + H ₂ O ₂	Z10-Zellen	Z10-Zellen + H ₂ O ₂	HCEC + H ₂ O ₂	Z10-Zellen	Z10-Zellen + H ₂ O ₂	HCEC + H ₂ O ₂	Z10-Zellen	Z10-Zellen + H ₂ O ₂
1		1,67		1,50	1,42		1,16	1,65	
2		2,59		1,25	1,25	1,21	1,32	1,61	2,65
3	1,64	1,44	2,91		0,56	1,21	1,59		2,36
Mittel	1,64	1,90	2,91	1,38	1,08	1,21	1,36	1,63	2,50
± SD		0,50		0,13	0,37	0,00	0,18	0,02	0,15
vs. H ₂ O ₂ ; p		0,802		0,552	0,501	0,722	0,054	0,121	0,891
pChk1 ^{S317}	Chromatin			löslich nukleär			Zytosol		
Chk1-siRNA Versuch	HCEC + H ₂ O ₂	Z10-Zellen	Z10-Zellen + H ₂ O ₂	HCEC + H ₂ O ₂	Z10-Zellen	Z10-Zellen + H ₂ O ₂	HCEC + H ₂ O ₂	Z10-Zellen	Z10-Zellen + H ₂ O ₂
1					1,34				
2		2,40			1,06				
3		2,28		1,36	1,78	1,05	1,19	1,33	3,31
4	1,74	1,80	3,03	1,32	0,72	1,57	1,59	1,38	2,52
Mittel	1,74	2,16	3,03	1,34	1,22	1,31	1,39	1,35	2,92
± SD		0,26		0,02	0,39	0,26	0,19	0,02	0,40
vs. siRNA-Kontrolle + H ₂ O ₂ ; p		0,548		0,808	0,685	0,738	0,889	0,013	0,433

Tab. 26-A17: zu Abb. 30. Fraktionierung nach Chk1-siRNA-Behandlung. HCEC mit 200 μM H_2O_2 , Z10-Zellen und Z10-Zellen mit 200 μM H_2O_2 .

pH3^{T11}	HCEC + H_2O_2			Z10-Zellen			Z10-Zellen + H_2O_2		
Chromatin Versuch	ohne siRNA	siRNA-Kontrolle	Chk1-siRNA	ohne siRNA	siRNA-Kontrolle	Chk1-siRNA	ohne siRNA	siRNA-Kontrolle	Chk1-siRNA
1	1,13	0,76	0,87						
2		1,27	1,32		1,04	1,83	2,66		
3	1,23	0,48	0,76	2,12	2,25	1,42	3,16		
4	1,18	1,25	1,20	1,22	1,58	1,79	2,44	2,15	3,07
5	0,88	0,96	1,08	1,57	1,01	1,24	1,20	2,02	1,80
Mittel	1,11	0,94	1,05	1,64	1,47	1,57	2,10	2,09	2,44
\pm SD	0,13	0,30	0,21	0,37	0,50	0,25	0,62	0,07	0,63
p	0,343	0,409	0,592	0,072	0,688	0,768	0,029	0,678	0,639

Tab. 27-A18: zu Abb. 31. Fraktionierung nach Chk1-siRNA-Behandlung. HCEC mit 200 μM H_2O_2 , Z10-Zellen und Z10-Zellen mit 200 μM H_2O_2 .

GCN_5	HCEC + H_2O_2			Z10-Zellen			Z10-Zellen + H_2O_2		
Chromatin Versuch	ohne siRNA	siRNA-Kontrolle	Chk1-siRNA	ohne siRNA	siRNA-Kontrolle	Chk1-siRNA	ohne siRNA	siRNA-Kontrolle	Chk1-siRNA
1	3,16		5,29						
2	2,47		5,12						
3	3,05	2,45	1,03		9,98	6,29	17,63	12,89	22,00
4	1,54	4,22	1,08	10,07	7,81	9,18	15,26	18,81	47,08
5	1,16	0,96	1,51	4,40	8,10	4,63	19,99	24,49	60,33
Mittel	2,28	2,96	2,81	7,24	8,63	6,70	17,63	18,73	43,14
\pm SD	0,80	1,33	1,97	2,84	0,96	1,88	1,93	4,73	15,89
p	0,013	0,769	0,786	0,159	0,585	0,266	0,002	0,776	0,106

Tab. 28-A19: zu Abb. 32. Fraktionierung nach Chk1-siRNA-Behandlung. HCEC mit 200 μ M H₂O₂, Z10-Zellen und Z10-Zellen mit 200 μ M H₂O₂.

ach3 ^{K9}	ohne siRNA			siRNA-Kontrolle			Chk1-siRNA		
Chromatin Versuch	HCEC + H ₂ O ₂	Z10-Zellen	Z10-Zellen + H ₂ O ₂	HCEC + H ₂ O ₂	Z10-Zellen	Z10-Zellen + H ₂ O ₂	HCEC + H ₂ O ₂	Z10-Zellen	Z10-Zellen + H ₂ O ₂
1	0,61			0,89	1,51		1,33	1,22	
2	1,29	1,77	2,93	1,54	1,92	2,63	1,78	2,14	2,13
3	1,88	1,14	4,41	1,07	2,80	3,73	1,00	3,21	2,72
4	1,25	2,97	1,92	0,86	1,41	3,17	1,08	1,43	2,43
Mittel	1,26	1,96	3,09	1,09	1,91	3,18	1,30	2,00	2,43
\pm SD	0,47	0,76	1,02	0,27	0,55	0,45	0,30	0,78	0,24
p	0,343	0,148	0,051	0,605	0,935	0,917	0,413	0,876	0,106

Tab. 29-A20: zu Abb. 33. Fraktionierung nach Chk1-siRNA-Behandlung. HCEC mit 200 μ M H₂O₂, Z10-Zellen und Z10-Zellen mit 200 μ M H₂O₂.

ach3	ohne siRNA			siRNA-Kontrolle			Chk1-siRNA		
Chromatin Versuch	HCEC + H ₂ O ₂	Z10-Zellen	Z10-Zellen + H ₂ O ₂	HCEC + H ₂ O ₂	Z10-Zellen	Z10-Zellen + H ₂ O ₂	HCEC + H ₂ O ₂	Z10-Zellen	Z10-Zellen + H ₂ O ₂
1	1,90								
2	2,54								
3	1,09	1,62		1,20	0,83		1,58	0,89	
4	1,65	1,64		1,53	1,64		1,16	1,54	
5	0,92	2,54	2,05	0,90	1,16	2,67	1,06		3,05
Mittel	1,62	1,93	2,05	1,21	1,21	2,67	1,27	1,22	3,05
\pm SD	0,31	0,43		0,26	0,33		0,23	0,33	
p	0,066	0,037		0,356	0,133		0,826	0,991	

Tab. 30-A21: zu Abb. 34. Fraktionierung nach Chk1-siRNA-Behandlung. HCEC mit 200 μM H_2O_2 , Z10-Zellen und Z10-Zellen mit 200 μM H_2O_2 .

acH4	ohne siRNA			siRNA-Kontrolle			Chk1-siRNA		
Chromatin Versuch	HCEC + H_2O_2	Z10-Zellen	Z10-Zellen + H_2O_2	HCEC + H_2O_2	Z10-Zellen	Z10-Zellen + H_2O_2	HCEC + H_2O_2	Z10-Zellen	Z10-Zellen + H_2O_2
1	1,14			1,16	1,23		2,13		
2	1,17		2,87	1,01	1,48	2,21	1,11	1,69	1,42
3	1,06		3,46	1,18	2,07	2,32	1,18	2,47	1,53
4	1,36	1,23	1,55		1,37	2,50	1,03	1,24	2,12
Mittel	1,18	1,23	2,63	1,12	1,53	2,34	1,36	1,80	1,69
\pm SD	0,11		0,80	0,08	0,32	0,12	0,45	0,51	0,31
p	0,029		0,045	0,486		0,646	0,461	0,512	0,049

Tab. 31-A22: zu Abb. 35. Fraktionierung nach Chk1-siRNA-Behandlung. HCEC mit 200 μM H_2O_2 , Z10-Zellen und Z10-Zellen mit 200 μM H_2O_2 .

PCAF	ohne siRNA			siRNA-Kontrolle			Chk1-siRNA		
Chromatin Versuch	HCEC + H_2O_2	Z10-Zellen	Z10-Zellen + H_2O_2	HCEC + H_2O_2	Z10-Zellen	Z10-Zellen + H_2O_2	HCEC + H_2O_2	Z10-Zellen	Z10-Zellen + H_2O_2
1	2,23						1,63		
2	2,21	4,02		2,87			2,87		
3	2,53	3,77		1,02	2,78		2,29	5,27	
4	0,98	2,62	4,86	1,87	3,37	4,08	2,19	2,67	2,12
Mittel	1,99	3,47	4,86	1,92	3,07	4,08	2,24	3,97	2,12
\pm SD	0,59	0,61		0,76	0,29		0,44	1,30	
p	0,343	0,050		0,921	0,556		0,573	0,571	

8.1.2 Originaldaten der Zellzyklusanalysen.

Nachfolgend sind die Messdaten der Zellzyklusanalysen aufgelistet. Ermittelt durch FACS. Zählungen von je 20.000 Zellen. Zellzahl absolut und % der Gesamtzellzahl. Veränderung der Zellzahl (Xfache) im Vergleich zur Kontrolle (Kontrolldefinition siehe Abb.). Mittelwerte (Mittel) \pm Standardabweichung (SD). Signifikanzwert p.

Tab. 32-A23: zu Abb. 12. Chk1-siRNA- mit 200 μM H_2O_2 vs. siRNA-Kontrolle und 200 μM H_2O_2 . Zellzahl absolut bzw. % der Gesamtzellzahl.

Zellzyklusphase	Sub-G1	G0/G1	S	G2/M
Versuch 1				
K	622	12247	2195	4807
H_2O_2	801	5006	4021	10048
Chk1-siRNA	1233	5198	4544	8906
siRNA-Kontrolle	1356	4252	4905	9362
% Gesamtzellzahl:				
K	3,13	61,63	11,05	24,19
H_2O_2	4,03	25,19	20,23	50,55
Chk1- siRNA	6,20	26,15	22,86	44,80
siRNA-Kontrolle	6,82	21,39	24,68	47,10
Xfache:				
H_2O_2 vs. K	1,29	0,41	1,83	2,09
Chk1-siRNA vs. siRNA-Kontrolle	0,91	1,22	0,93	0,95
Zellzyklusphase	Sub-G1	G0/G1	S	G2/M
Versuch 2				
K	1193	11753	2548	6065
H_2O_2	1800	9012	5242	8753
Chk1-siRNA	3647	6847	4391	8674
siRNA-Kontrolle	3871	5608	4548	9357
% Gesamtzellzahl:				
K	5,53	54,52	11,82	28,13
H_2O_2	7,26	36,33	21,13	35,28
Chk1- siRNA	15,48	29,06	18,64	36,82
siRNA-Kontrolle	16,55	23,98	19,45	40,01
Xfache:				
H_2O_2 vs. K	1,31	0,67	1,79	1,25
Chk1-siRNA vs. siRNA-Kontrolle	0,94	1,21	0,96	0,92
Zellzyklusphase	Sub-G1	G0/G1	S	G2/M
Versuch 3				
K	4441	10889	1775	2874
H_2O_2	5295	6417	3832	4209
Chk1-siRNA	5980	6698	3520	3173
siRNA-Kontrolle	6588	5944	3622	3152
% Gesamtzellzahl:				
K	22,23	54,50	8,88	14,39
H_2O_2	26,81	32,49	19,40	21,31
Chk1- siRNA	30,87	34,58	18,17	16,38
siRNA-Kontrolle	34,12	30,79	18,76	16,33
Xfache:				
H_2O_2 vs. K	1,21	0,60	2,18	1,48
Chk1-siRNA vs. siRNA-Kontrolle	0,90	1,12	0,97	1,00

Fortsetzung Tab. 32-A23. Statistik.

Zellzyklusphase	Sub-G1	G0/G1	S	G2/M
K vs. H₂O₂				
Mittel Versuch 1, 2 und 3	1,27	0,56	1,93	1,61
± SD	0,05	0,11	0,18	0,35
p	0,700	0,003	<0,001	0,224
siRNA-Kontr. vs. Chk1-siRNA				
Mittel Versuch 1, 2 und 3	0,92	1,19	0,95	0,96
± SD	0,01	0,04	0,02	0,03
p	0,886	0,291	0,400	0,892

Tab. 33-A24: zu Abb. 14. Zellzyklusverteilung unbehandelter Z-Zellkulturen im Vgl. zu HCEC. Zellzahl absolut bzw. % der Gesamtzellzahl.

	Zellzyklusphase	Sub-G1	G0/G1	S	G2/M
HCEC	Versuch 1	452,00	8730,00	3014,00	6423,00
	%	2,43	46,89	16,19	34,50
	Versuch 2	699,00	9777,00	3021,00	5753,00
	%	3,63	50,79	15,69	29,89
	Mittel 1 und 2	3,04	48,87	15,94	32,15
	± SD	0,65	2,76	0,02	1,77
Z3	Versuch 1	460,00	10116,00	2912,00	5130,00
	%	2,47	54,33	15,64	27,55
	Versuch 2	889,00	9089,00	3044,00	5284,00
	%	4,86	49,65	16,63	28,86
	Mittel 1 und 2	3,65	52,01	16,13	28,20
	± SD	1,16	2,78	0,36	0,42
	Z3 vs. HCEC; p	0,667	0,667	1,00	0,333
Z5	Versuch 1	459,00	10410,00	2659,00	5140,00
	%	2,46	55,76	14,24	27,53
	Versuch 2	791,00	10078,00	2621,00	4948,00
	%	4,29	54,66	14,22	26,84
	Mittel 1 und 2	3,37	55,21	14,23	27,19
	± SD	0,89	0,88	0,10	0,51
	Z5 vs. HCEC; p	0,667	0,333	0,333	0,333
Z10	Versuch 1	1007,00	9403,00	2347,00	5403,00
	%	5,55	51,78	12,92	29,75
	Versuch 2	1074,00	8360,00	2303,00	6299,00
	%	5,95	46,35	12,77	34,92
	Mittel 1 und 2	4,03	51,57	12,73	31,67
	± SD	2,49	3,63	0,32	2,79
	Z10 vs. HCEC; p	0,333	1,00	0,333	1,00

Tab. 34-A25: zu Abb. 20. Zellzyklusverteilung Z10 nach Chk1-siRNA- mit 200 μ M H_2O_2 vs. siRNA-Kontrolle und 200 μ M H_2O_2 . Zellzahl absolut, % der Gesamtzellzahl.

Zellzyklusphase			Sub-G1	G0/G1	S	G2/M	Sub-G1	G0/G1	S	G2/M
Zeitwert / Behandlung			Zellzahl absolut				% der Gesamtzellzahl			
24 h	1	K	1800	12374	2525	3301	3,69	70,43	11,68	14,19
	2		877	12507	2432	3977	4,42	62,23	13,78	19,57
	1	siRNA-Kontrolle	1618	13929	2091	2362	8,09	69,65	10,46	11,81
	2		901	11790	2546	4452	4,58	59,88	12,93	22,61
	1	H_2O_2	727	8099	3416	7129	3,75	41,81	17,63	36,80
	2		614	6165	3123	9327	3,19	32,06	16,24	48,50
	1	siRNA-Kontrolle + H_2O_2	844	7672	3056	7203	4,50	40,86	16,28	38,36
	2		766	5432	3886	9547	3,90	27,67	19,80	48,63
	1	Chk1-siRNA + H_2O_2	985	9297	3058	6074	5,07	47,89	15,75	31,29
	2		812	6826	3691	8340	4,13	34,70	18,77	42,40
48 h	1	H_2O_2	1155	12727	1803	3265	6,09	67,16	9,51	17,23
	2		1059	9937	2362	5477	5,62	52,76	12,54	29,08
	1	siRNA-Kontrolle + H_2O_2	1098	9844	2427	5177	5,92	53,08	13,09	27,91
	2		1401	10973	2732	3617	7,48	58,61	14,59	19,32
	1	Chk1-siRNA + H_2O_2	1495	11154	2888	3482	7,86	58,65	15,18	18,31
	2		1187	9852	2828	5022	6,28	52,16	14,97	26,59
72 h	1	H_2O_2	1473	12912	2692	3199	7,26	63,68	13,28	15,78
	2		1695	12087	2846	2850	8,70	62,05	14,61	14,63
	1	siRNA-Kontrolle + H_2O_2	2280	10837	3558	3747	11,16	53,07	17,42	18,35
	2		1787	11756	3052	2815	9,21	60,57	15,72	14,50
	1	Chk1-siRNA + H_2O_2	2145	12225	3049	2823	10,60	60,39	15,06	13,95
	2		1809	11542	3081	2886	9,36	59,75	15,95	14,94

Fortsetzung Tab. 34-A25. Statistik.

% der Gesamtzellzahl		Sub-G1	G0/G1	S	G2/M	
Mittel 1 und 2	24 h	K 24 h	4,06	66,33	12,73	16,88
		siRNA-Kontrolle	6,33	64,76	11,69	17,21
		H ₂ O ₂	3,47	36,94	16,94	42,65
		siRNA-Kontrolle + H ₂ O ₂	4,20	34,27	18,04	43,50
		Chk1 siRNA + H ₂ O ₂	4,60	41,30	17,26	36,84
24 h H ₂ O ₂ vs. K 24 h; p		0,331	0,044	0,074	0,054	
24 h siRNA-Kontrolle + H ₂ O ₂ vs. H ₂ O ₂ 24 h; p		0,271	0,776	0,620	0,923	
24 h Chk1-siRNA+H ₂ O ₂ vs. siRNA-Kontrolle+H ₂ O ₂ 24 h; p		0,546	0,530	0,769	0,472	
Mittel 1 und 2	48 h	H ₂ O ₂	5,86	59,96	11,03	23,15
		siRNA-Kontrolle + H ₂ O ₂	6,70	55,84	13,84	23,62
		Chk1 siRNA + H ₂ O ₂	7,07	55,40	15,08	22,45
48 h H ₂ O ₂ vs. 24 h H ₂ O ₂ ; p		0,333	0,118	0,071	0,144	
48 h siRNA-Kontrolle + H ₂ O ₂ vs. 48 h H ₂ O ₂ ; p		0,410	0,647	0,238	0,955	
48 h Chk1-siRNA+H ₂ O ₂ vs. 48 h siRNA-Kontrolle+H ₂ O ₂ ; p		0,770	0,927	0,245	0,863	
Mittel 1 und 2	72 h	H ₂ O ₂	7,98	62,87	13,94	15,20
		siRNA-Kontrolle + H ₂ O ₂	10,19	56,82	16,57	16,43
		Chk1 siRNA + H ₂ O ₂	9,98	60,07	15,51	14,44
72 h H ₂ O ₂ vs. 24 h H ₂ O ₂ ; p		0,028	0,034	0,090	0,043	
72 h siRNA-Kontrolle + H ₂ O ₂ vs. 72 h H ₂ O ₂ ; p		0,211	0,256	0,135	0,605	
72 h Chk1-siRNA+H ₂ O ₂ vs. 72 h siRNA-Kontrolle+H ₂ O ₂ ; p		0,876	0,478	0,381	0,423	

DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich allen Personen danken, die mich in meiner Promotionszeit unterstützt haben. Dem Direktor des Institutes für Pathologie, Herrn Prof. Dr. A. Roessner, danke ich für die Möglichkeit diese Arbeit unter seiner Leitung anfertigen zu können. Frau Dr. A. Pöhlmann bin ich für die Überlassung des Promotionsthemas und die Möglichkeit mit dem zellulären *in vitro* Modell arbeiten zu können zu Dank verpflichtet.

Mein Dank gilt auch den Kooperationspartnern Prof. Dr. A. Silver, Prof. Dr. em. P. Schönfeld, Herrn Dr. R. Hartig und Frau Dr. A. Pelz für die Möglichkeit des wissenschaftlichen Austausches und ihren Rat.

Frau Dr. S. Franke danke ich herzlich für Ihre unermüdliche Hilfsbereitschaft in jedweder Hinsicht, ihren wissenschaftlichen Rat und die Möglichkeit der Kooperation.

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau Dr. D. Walluscheck. Ohne ihre Unterstützung wäre diese Arbeit vermutlich nicht zustande gekommen. Ich bin sehr dankbar für die vielen Stunden ehrlichen, wissenschaftlichen Austausches und deinen Rückhalt.

Frau K. Hermanns danke ich von ganzem Herzen für ihren wissenschaftlichen Rat, vor allem aber für ihre moralische Unterstützung, ein immer offenes Ohr, Zeit und Geduld. Danke, dass ich immer auf dich zählen konnte.

Frau H. Scharfenort, Frau D. Medau und Frau J. Zajons danke ich für ihre Hilfsbereitschaft, die fachliche Unterstützung und die entspannte Laboratmosphäre.

Zu guter Letzt möchte ich meiner Familie danken. Ihr wisst, dass dies ohne Eure Unterstützung nicht möglich gewesen wäre. Ich bin glücklich und dankbar, immer auf Euch zählen zu können. Gleichzeitig möchte ich mich, vor allem bei meinen Kindern, für die entbehrungsreiche Zeit entschuldigen.

PUBLIKATIONEN

- [1] Teller, Anne; Jechorek, Doerthe; Hartig, Roland; Adolf, Daniela; **Reißig, Kathrin**; Roessner, Albert; Franke, Sabine (2015): Dysregulation of apoptotic signaling pathways by interaction of RPLP0 and cathepsin X/Z in gastric cancer. In: *Pathology - Research and Practice* 211 (1), S. 62–70. DOI: 10.1016/j.prp.2014.09.005.
- [2] Walluscheck, Diana; Poehlmann, Angela; Hartig, Roland; Lendeckel, Uwe; Schönfeld, Peter; Hotz-Wagenblatt, Agnes; **Reißig, Kathrin** et al. (2013): ATF2 knockdown reinforces oxidative stress-induced apoptosis in TE7 cancer cells. In: *Journal of cellular and molecular medicine* 17 (8), S. 976–988. DOI: 10.1111/jcmm.12071.
- [3] Poehlmann, Angela; **Reißig, Kathrin**; Schönfeld, Peter; Walluscheck, Diana; Schinlauer, Antje; Hartig, Roland et al. (2013b): Repeated H₂O₂ exposure drives cell cycle progression in an in vitro model of ulcerative colitis. In: *Journal of cellular and molecular medicine* 17 (12), S. 1619–1631. DOI: 10.1111/jcmm.12150.
- [4] Poehlmann, Angela; **Reißig, Kathrin**; Just, Andrea; Walluscheck, Diana; Hartig, Roland; Schinlauer, Antje et al. (2013a): Non-apoptotic function of caspases in a cellular model of hydrogen peroxide-associated colitis. In: *Journal of cellular and molecular medicine* 17 (7), S. 901–913. DOI: 10.1111/jcmm.12079.
- [5] Poehlmann, Angela; Hbold, Caroline; Walluscheck, Diana; **Reißig, Kathrin**; Bajbouj, Khuloud; Ullrich, Oliver et al. (2010): Cutting edge: Chk1 directs senescence and mitotic catastrophe in recovery from G₂ checkpoint arrest. In: *Journal of cellular and molecular medicine* 15 (7), S. 1528–1541. DOI: 10.1111/j.1582-4934.2010.01143.x.
- [6] Bajbouj, Khuloud; Poehlmann, Angela; Kuester, Doerthe; Drewes, Thomas; **Haase, Kathrin**; Hartig, Roland et al. (2009): Identification of Phosphorylated p38 as a Novel DAPK-Interacting Partner during TNF α -Induced Apoptosis in Colorectal Tumor Cells. In: *The American Journal of Pathology* 175 (2), S. 557–570. DOI: 10.2353/ajpath.2009.080853.

ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich, dass ich die von mir eingereichte Dissertation zum Thema

„Untersuchung der Rolle von Chk1 in der entzündungsbasierten kolorektalen Karzinogenese anhand eines zellulären Colitis Modells“

selbständig verfasst und die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben habe. Die vorliegende Schrift wurde bisher noch nicht als Dissertation eingereicht.

Weiterhin erkläre ich, weder diese noch eine andere Arbeit zur Erlangung des akademischen Grades doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.) an anderen Einrichtungen eingereicht zu haben.



Brandenburg, 29. 09. 2015

Kathrin Reißig