

REGULATION DER ZELLYKLUS-ABHÄNGIGEN TRANSKRIPTION DURCH E2F UND STREßSIGNALWEGE

vorgelegte Dissertation

von

Frank Jeblonski, Berlin

Fachbereich für Chemie und Biochemie
Freie Universität Berlin
zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

Berlin, den 09.10.2005

Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin
Robert-Rössle-Str. 10
13092 Berlin

Die vorliegende Dissertation wurde in der Zeit von August 1998 bis Dezember 2002 in der Arbeitsgruppe von Dr. rer. nat. Dr. rer. nat. habil. Martin Lipp, Abteilung Tumor- und Immunogenetik des Max-Delbrück-Centrums in Berlin-Buch angefertigt.

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation am Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin (MDC) in Berlin-Buch in der Arbeitsgruppe Dr. Martin Lipp selbstständig durchgeführt habe und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Frank Jeblonski

Berlin, im Oktober 2004

Tag der Disputation: 09.05.2006

1. Gutachter: Prof. Dr. U. Heinemann

2. Gutachter: Dr. rer. nat. Dr. rer. nat. habil. M. Lipp

ABSTRACT

E2F activity controls the expression of a variety of genes that encode proteins essential for DNA replication and cell cycle progression. The E2F family consists of seven members containing several highly conserved domains including the “marked box”.

In order to identify interaction partners for E2F that bind to the marked box, a yeast two-hybrid screen was carried out by using a peptide of the transcription factor E2F3 comprising the marked box as bait. This experiment identified one of the regulatory subunit of the DNA-PK, called Ku70 as a binding partner. Binding of the Ku subunit to E2F proteins has been confirmed and E2F1 and E2F3 tested to be direct targets of the Ku70/80 heterodimer.

DNA-PK, which is involved in the repair of DNA double strand breaks as well as the recombination of immunoglobulin genes has recently been shown to be involved within the cell cycle control. We tested the regulatory function of E2F1 in relation to the DNA-Pk by γ -ray induced double strand breaks on running cell cycle. The potential functional mechanism of that protein complex have to be determined.

The results indicate a significant reduction of E2F transactivation potential on transient cotransfection of Ku70 and Ku80. The modulation of E2F activity by DNA-PK demonstrates a key element in blocking the G1/S phase transition in the cell cycle after DNA damage, thereby allowing DNA repair before replication.

INHALTSVERZEICHNIS

1.	Einleitung.....	1
1.1	Die Regulation des Zellzyklus	1
1.2	Die E2F-Familie	3
1.3	Regulation der transkriptionellen Aktivität von E2F	5
1.4	Die Marked Box von E2F.....	11
1.5	Die DNA-PK.....	12
1.6	DNA-Schädigung und -Reparatur	15
1.7	Aufgabenstellung.....	18
2.	Material.....	19
2.1	Bakterien.....	19
2.2	Expressions- und Klonierungsvektoren.....	19
2.3	Zelllinien.....	20
2.4	Enzyme.....	20
2.5	Antikörper und Konjugate	20
2.6	Chemikalien, Geräte und andere Materialien.....	21
3.	Methoden	25
3.1	Bakterienkultivierung	25
3.1.1	Herstellung chemokompetenter Zellen	25
3.1.2	Vermehrung in Flüssigkulturen	25
3.1.3	Glyzerinkulturen	26
3.1.4	Anzucht auf Agarplatten.....	26
3.2	Generierung, Modifikation, Aufreinigung und Analyse von DNA	26
3.2.1	Generierung von DNA.....	26
4.5.8.1	Generierung von DNA-Fragmenten mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (PCR).....	26
3.2.1.1	Ligation von DNA-Fragmenten in Vektoren	27
3.2.1.2	Chemische Transformation des Ligationsansatzes (Hitzeschock-Methode).....	27
3.2.2	Modifikation von DNA-Fragmenten und Plasmiden.....	28
3.2.2.1	Verdau von DNA durch Restriktionsendonukleasen.....	28
3.2.2.2	5'-Dephosphorylierung von Vektoren durch alkal. Phosphatase	28
3.2.2.3	Herstellung von glatten Enden an DNA-Fragmenten durch das Klenow- Fragment der DNA-Polymerase.....	28

3.2.2.4	Herstellung von glatten Enden an DNA-Fragmenten mit der T4-DNA- Polymerase.....	29
3.2.2.5	Phosphorylierung von 5'-Hydroxylgruppen an DNA-Fragmenten...	29
3.2.3	Aufreinigung von DNA.....	29
3.2.3.1	Plasmidisolierung über Jetstar-Säulen.....	29
3.2.3.2	Schnellaufschluss (Mini-Präparation) für die Plasmidisolierung	30
3.2.3.3	Gelelution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	31
3.2.3.4	Phenolextraktion von Proteinen	31
3.2.3.5	Ethanol-Präzipitation von DNA und RNA	31
3.2.4	Analyse von DNA	32
3.2.4.1	DNA-Auftrennung über Agarosegele	32
3.2.4.2	Sequenzierung von Plasmid-DNA.....	32
3.2.4.3	DNA-Sequenzierung mit dem LICOR-System	33
3.3	Proteine	34
3.3.1	Induktion von GST- und His-Fusionsproteinen	34
3.3.2	Aufreinigung von His-Fusionsproteinen	34
3.3.3	Aufreinigung von GST- Fusionsproteinen.....	35
3.3.4	Aufreinigung von Ku70-Gst durch Immunoaffinitätschromatographie	36
3.3.4.1	Präparation der CNBr-Sepharose	36
3.3.4.2	Beladung der α -Ku70-CNBr-Sepharose	36
3.3.5	Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen in SDS-Polyacrylamidgelen nach Laemmli	37
3.3.6	Färben von Proteingelen.....	38
3.3.6.1	Coomassie-Färbung.....	38
3.3.6.2	Silberfärbung	38
3.3.7	Transfer und Nachweis von Protein auf Nylon-Membran (Western-Blot)	39
3.3.7.1	Transfer	39
3.3.7.2	Immundetektion von Proteinen.....	39
3.3.7.3	NBT/bCIP-Nachweis.....	40
3.3.8	GST-Pulldown-Assay	40
3.3.9	In vitro-Translation.....	41
3.3.10	Kinase-Assay	41
3.3.11	Quantifizierung von gelöstem Protein	42

3.3.11.1	Proteinbestimmung nach Bradford	42
3.3.11.2	Proteinbestimmung mit dem BIORAD-Assay-Kit	42
3.3.11.3	Proteinbestimmung durch photometrischen Vergleich.....	43
3.3.12	BIAcore-Analysen.....	43
3.3.12.1	Immobilisierung des Liganden.....	44
3.3.12.2	Analyse	44
3.3.12.3	Auswertung:.....	45
3.4	Zellkultur	46
3.4.1	Lagerung von Stammkulturen	46
3.4.1.1	Stammkulturhaltung.....	46
3.4.1.2	Reaktivierung eingefrorener Zellen:	46
3.4.1.3	Kultivierung von eukaryotischen Zellen.....	47
3.4.2	Herstellung von Kernextrakten.....	48
3.4.3	Transfektionsmethoden für eukaryotische Zellen	48
3.4.3.1	Transfektion durch Liposomen	48
3.4.3.2	Transfektion durch Elektroporation	49
3.4.4	Durchflußzytometrie	50
3.5	Zellzyklus-Experimente	50
3.5.1	Transfektion, Blockierung und Aliquotnahme in den Zellzyklus	50
3.5.2	Aufarbeitung der Eukaryotenzellen.....	51
3.5.2.1	Luciferase-Assay	51
3.5.2.2	Immunfluoreszenz-/DNA-Doppelfärbung	51
3.5.3	Analyse der Zellzyklus-Experimente.....	52
4.	Ergebnisse	53
4.1	in vitro Nachweis der Interaktion von Ku70 mit E2F1	53
4.1.1	Isolierung rekombinanter Fusionsproteine.....	53
4.1.1.1	E2F1-Fusionsproteine	55
4.1.1.2	Ku70-GST-Fusionsprotein.....	57
4.1.2	GST-Präzipitations-Experiment (GST-Pull-Down).....	58
4.2	E2F6 reprimiert die E2F1-abhängige Transkription	61
4.3	Protein-Protein-Wechselwirkungs-Analysen	64
4.3.1	Immobilisierung von Ku70-GST	66
4.3.2	Bindungs-Kinetiken der verschiedenen E2F1-Deletionsmutanten	67
4.4	Phosphorylierung von E2F1 durch die DNA-PK	71

4.5	Zellzyklus-Experimente	74
4.5.1	Überprüfung der Promoter-Aktivierung	75
4.5.2	Synchronisation der Zellpopulationen	77
4.5.3	Bestimmung der optimalen Bestrahlungsmenge	79
4.5.4	Transfektionen für den Zellzyklus	80
4.5.5	Kontrolle der Koexpression des MHC-Moleküls auf eine E2F-unabhängige Ku70-Expression	81
4.5.6	Zellzyklus-Verhalten bei unbestrahlten Zellen	83
4.5.8.2	CHO-K1-Zellen	86
4.5.7	Zellzyklus-Verhalten nach γ -Bestrahlung	89
4.5.8.3	Bestrahlte CHO-K1-Zellen	90
4.5.8	Luciferase-Ergebnisse der Zellzyklus-Experimente bei CHO-K1-Zellen	
	93	
4.5.8.1	Ohne γ -Bestrahlung	93
4.5.8.2	CHOK / mit γ -Bestrahlung	95
5.	Diskussion	97
5.1	Historie	97
5.2	Die Marked Box von E2F1 ermöglicht die Bindung von Ku70 und Ku80 .	100
5.3	E2F1 ist ein Substrat der DNA-PK	107
5.4	Der repressive Komplex führt zu einem Zellzyklus-Block in der späten G1-Phase	109
5.5	Ausblick	117
6.	Zusammenfassung	118
7.	Anhang	120
7.1	Abkürzungsverzeichnis	120
8.	Literatur	122
9.	Summary	131
10.	Danksagungen	132
11.	Abbildungsverzeichnis	133