

5. Diskussion

5.1 Historie

Die transkriptionelle Regulation einer eukaryotischen Zelle unterliegt einer Vielzahl von verschiedenen Faktoren. So gibt die Art und der Zeitpunkt von äußeren Einflüssen auf die Zelle vor, welche Proteine zu welchem Zeitpunkt im Zellzyklus funktionell aktiv oder inaktiv sind und auch, ob diese herauf- bzw. herunterreguliert werden sollen. Aus dem diffizilen Muster von Wechselwirkungen zwischen verschiedenen Proteinen und deren Reihenfolge ergibt sich eine weitere Regulationsstufe.

Zu den stark regulierten Proteinen gehören u.a. die Mitglieder der E2F-Proteinfamilie. Bis zum heutigen Tage sind sieben E2F-Mitglieder bekannt (Leone et al. 2000). E2F verbindet den Zellzyklus-Fortschritt mit der koordinierten Regulation von Genen, die sowohl notwendig sind für die DNA-Synthese wie auch für das Überleben der Zelle. Zahlreiche DNA-Replikationsgene werden in der späten G1 und der frühen S-Phase induziert, einschließlich derer, die für einige E2F-abhängige Gene kodieren (Cho et al. 2001). Die Expression von Genen, die für den Wiedereintritt in den Zellzyklus erforderlich sind, wird hierdurch ermöglicht.

Die Subklasse der E2F-Familie aus E2F1, E2F2 und E2F3a ermöglicht den Übergang von der G1- zur S-Phase durch die Induktion E2F-abhängiger Gene. Hierfür dissoziiert pRB aufgrund von Phosphorylierungen durch Cyclin-abhängige Kinasen von dem E2F-Protein ab.

E2F1 kann jedoch auch über Phosphorylierungen durch andere Proteinklassen reguliert werden. So erfolgt nach einer Akkumulation von E2F1 die Phosphorylierung durch die PIKL-Proteine wie ATM oder die Kinase ATR. Es konnte hierzu gezeigt werden, dass die erhöhte Proteinkonzentration von E2F1 aus einer Inhibition der Degradation von E2F1 folgt, analog zu der Regulation der p53-Proteinkonzentration über MDM2 (Blattner et al. 1999), (Huang et al. 1997). Letzteres konnte am Beispiel von Hamster-Zellen gezeigt werden, wonach der Reparatur-Mechanismus infolge von UV-Bestrahlung nicht p53-abhängig ist (Germanier et al. 2000).

Bei einer Schädigung der DNA – in Form von Einzel- oder Doppelstrangbrüchen – muss die Reparatur vor dem G₁/S-Phasenübergang erfolgen. Andernfalls übertragen sich die Schädigungen der DNA auf die nach der Zellteilung neu entstehenden Zellen oder die Zellen gehen als Folge der starken DNA-Schädigung in die Apoptose. DNA-Mikroarrayanalysen haben gezeigt, dass mindestens zwölf Gene für die DNA-Reparatur notwendig sind (Ren et al. 2002).

Besondere Bedeutung kommt auch dem dualen Charakter von E2F1 zu. So zeigt sich bei Thymozyten sehr deutlich eine Verbindung von Apoptose – hervorgerufen durch DNA-Schädigung – zur Proliferation, die durch E2F1 initiiert wird (Lin et al. 2001).

E2F1 besitzt eine große Bedeutung für die Untersuchung von Tumorzellen. Nach der Behandlung von Tumorzellen mit einer Vielzahl verschiedener mutagener Substanzen zeigte sich, dass das E2F1-Protein stabilisiert wird und die Proteinkonzentration ansteigt (Meng et al. 1999), (Huang et al. 1997). Eine Hochregulierung der Konzentration von E2F1 folgt aus der Verlängerung der Protein-Halbwertszeit, das als Folge zu einer höheren Zellzyklusrate pro Zeiteinheit führt. Bei unbestrahlten Zellen nimmt die E2F1-Proteinkonzentration mit einer Halbwertszeit von 100 – 120 Minuten ab. Der Verlust von allen drei E2F-Mitgliedern (E2F1, - 2 und -3) – durch Gen-Knock-out oder Gen-Deletion – führt zu einem schweren Defekt der Expression von E2F-abhängigen Genen und verhindert bei Maus-Fibroblasten den Eintritt in die S-Phase und als Folge das Fortschreiten des Zellzyklus bis zur Mitose und der Proliferation.

Bisher waren die E2F-Proteine in ihrer Funktion – unter Ausnahme von durch pRB komplexiertem E2F – lediglich als die Transkription aktivierenden Proteine bekannt. Doch gerade in jüngster Zeit zeigten Untersuchungen, dass unter dem Einfluss von verschiedenen Stressfaktoren E2F durchaus auch in der Lage ist, die Transkription aktiv zu reprimieren (Ren et al. 2002). Ren et al. beschrieb bereits 2002 E2F1 als einen potentiellen Phosphorylierungskandidat der DNA-PK. Der eindeutige Beweis einer Interaktion blieb bisher jedoch aus. Ein Reparatursmechanismus der DNA durch die DNA-PK über eine Komplexierung und Phosphorylierung von E2F1 war daher weiterhin offen.

Mit der vorliegenden Arbeit wurden zuvor erzielte Ergebnisse (von G. Kaba) über die Interaktion von E2F1 und Ku70 einerseits bestätigt, aber entscheidend präzisiert und erweitert. Es konnte eindeutig gezeigt werden, dass ausschließlich die konservierte Region Marked Box von E2F für die Bindung an Ku70 verantwortlich ist. Bindungsstudien zeigten darüber hinaus den hochaffinen Charakter dieser Protein-Protein-Wechselwirkung auf. Vermutlich verhindert dies eine Auflösung des Komplexes durch weitere Bindungspartner, wie pRB.

In Zellzyklus-Experimenten konnte dem Ku70-Ku80-E2F1-Komplex auch eine physiologische Bindung zugeordnet werden. Die transkriptionelle, repressive Wirkung des Protein-Komplexes führt nach der Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen zu einem Zellzyklus-Block in der frühen S-Phase. Die Ergebnisse weisen so auf einen weiteren, bisher unbekanntem Regulationsmechanismus der E2F1-abhängigen Transkription in der Gegenwart von DNA-Doppelstrangbrüchen hin. Die Komplexierung des transkriptionell aktiven E2F1 durch Ku und die sich anschließende Phosphorylierung der Marked Box von E2F1 durch die katalytische Untereinheit der DNA-PK, DNA-PK_{cs}, nach Gamma-Bestrahlung verhindern zudem eine mögliche Induktion von Apoptose durch E2F1. Es ermöglicht der Zelle die Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen, bevor sie in ihrem Zellzyklusstadium voranschreitet.

Frühere Untersuchungen haben gezeigt, dass die Koexpression von E2F1 mit DP1 eine bis zu 3,5-fach höhere Induktion der S-Phase bewirkt (DeGregori et al. 1997). Aufgrund der stärkeren Induktion wurden die Zellzyklus-Untersuchungen – und in entsprechender Weise so auch die Bindungsstudien sowie die Phosphorylierungs-Experimente – mit dem Familienmitglied E2F1 durchgeführt.

5.2 Die Marked Box von E2F1 ermöglicht die Bindung von Ku70 und Ku80

Erstes Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Bindungsregion sowie die Bindungsstärke von E2F und Ku70 genauer zu bestimmen. Hierzu wurden E2F1-Mutanten generiert, in denen unterschiedlich große Regionen der Marked Box deletiert bzw. substituiert waren (Abb. 8 und 9). Zu Beginn dieser Arbeit wurde vermutet, dass die Interaktion über die Bindungsregion der Pocketproteine stabilisiert wird. Dies wurde durch eine zusätzliche E2F-Mutante mit einer dieser Region betreffenden Deletion berücksichtigt.

Der erste Hinweis auf eine mögliche Interaktion zwischen der DNA-PK und E2F könnte aus Überlegungen von Ruscetti et al. (1998) abgeleitet werden, der speziell auf den Reparatur-Mechanismus der DNA-PK von DNA-Brüchen einging. Nach diesem Modell bindet die DNA-PK an DNA-Bruchstellen und phosphoryliert in Koinkidenz DNA-gebundene Proteine.

Initiale Hinweise ergaben sich aber auch schon aus den Arbeiten von Anderson et al. (1993). Dort konnte bereits gezeigt werden, dass die zellulären Targets der DNA-PK nach der Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen nukleäre, DNA-bindende, regulatorische Transkriptionsfaktoren wie Jun oder Fos sind. Zudem wurde vermutet, dass die DNA-PK generell eine Funktion in der Koordination von nukleären Prozessen besitzt und als ein Modulator oder Regulator der Checkpoints nach der Induktion von DNA-Schäden aktiv wird.

Ein erster Ansatz war daher die Untersuchung der Auswirkung der Ku70-E2F1-Interaktion auf die transkriptionelle Regulation des H2A.1-Gens durch einen Shift-Assay (Daten nicht gezeigt). Hierzu wurden Kotransfektions-Experimente mit H2A.1-spezifischen Luciferasekonstrukten und Expressionsplasmiden für E2F1, DP-1 und Ku70 und Ku80 in HeLa Zellen durchgeführt. Ähnlich der Methode einer Koimmunopräzipitation gibt es bei dieser Methode eine Vielzahl von variablen Komponenten. Die zu Beginn nachgewiesene Interaktion konnte durch einen Shift-Assay leider nicht bestätigt werden. So konnte zwar die Reduktion einer relevanten Bande nachgewiesen werden, die die Anwesenheit von aktivem E2F zeigt, weitere Ergebnisse mit Ku70 führten jedoch nicht zu auswertbaren Ergebnissen. Aufgrund

der Vielzahl von zur Verfügung stehenden, genaueren Untersuchungsmethoden wurde dieser Ansatz nicht weiter verfolgt.

Im Rahmen von *in vitro*-Untersuchungen wurde die Bindung von Ku70 an E2F1 nun anhand von GST-Präzipitationsuntersuchungen sowie SPR-Messungen (an einem Biocore-Gerät) genauer definiert.

Die GST-Präzipitationsuntersuchungen – die Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen durch Bindung an Glutathion-Sepharose mit anschließendem Nachweis eines Interaktionspartners – zeigten eine deutliche Bindung von E2F1,wt-GST an Ku70 wie auch an Ku80. Bei den E2F1-Deletionsmutanten E2F1- Δ 270-350 und E2F1- Δ 277-312 konnten keine Bindung festgestellt werden, weder zu Ku70 noch zu Ku80. Die E2F1-Deletionsmutante E2F1- Δ 277-302 zeigte hingegen eine schwache Bande. Aus den Ergebnissen konnte somit eine Eingrenzung einer engen Bindungsregion auf zehn Aminosäuren erreicht werden. Die anfängliche Annahme, dass die Pocket-Proteindomäne einen stabilisierenden Einfluss auf die Bindung zu Ku hat, konnte durch die E2F1-Deletionsmutante E2F1- Δ 270-350, Δ 413-437 nicht bestätigt werden. Abschließend ist festzustellen, dass die Untereinheit Ku70 aufgrund ihrer Tertiärstruktur die regulatorische, DNA-bindende Untereinheit darstellt, während Ku80 die regulatorische, Protein-bindende Untereinheit darstellt. So kann über Ku80 als sogenannter Protein-Linker die katalytische Untereinheit DNA-PK_{cs} binden und die Phosphorylierung von E2F durchführen (Modell Abb. 33). Als weitere *in vitro*-Methode diente die Untersuchung des Protein-Komplexes in Koimmuno-Präzipitationsexperimenten (Abschnitt 5.4). Die Koimmunopräzipitationsexperimente ließen jedoch – auch nach zahlreicher Variation der Pufferkonditionen - keine konkreten Aussagen über eine mögliche Bindung zwischen Ku und E2F der Bindung zu.

Um eine Vergleichsmöglichkeit zu den Affinitäten von anderen Protein-Protein-Wechselwirkungen aufzeigen zu können, wurden die Protein-Protein-Wechselwirkungen mit einem Biocore 2000-Gerät näher untersucht. Die wichtigste Voraussetzung für eine Messung mit diesem System ist eine große Reinheit des Proteins, das in Lösung über den am Chip gebundenen Interaktionspartner (hier Ku70) fließt. Vermutlich durch eine ungünstige tertiäre Struktur führte die Aufreinigung von E2F1-Deletions- und Substitutionsmutanten als GST-Fusionsproteine zu keinem befriedigenden Ergebnis. Im Rahmen von

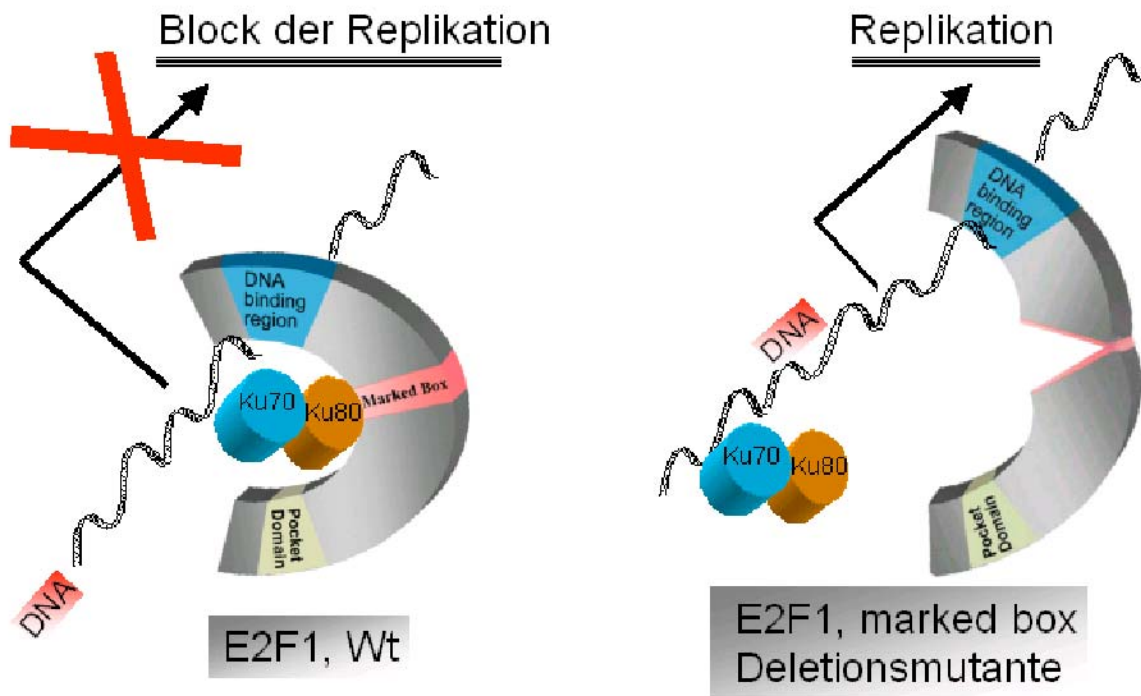
Subklonierungen und der anschließenden Generierung als His-Fusionsproteine konnte dieses Problem beseitigt werden.

Die verschiedenen Deletions- und Substitutionsmutanten zeigen erhebliche Unterschiede in ihrem Bindungsverhalten zu Ku70. Die Positiv-Kontrolle Ku80 zeigt erwartungsgemäß ein außerordentlich starkes Bindungsverhalten ($K_A = 9,01 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}$, $K_D = 1,12 \text{ nM}$), da für die regulative Funktion von Ku70 und Ku80 eine starke Affinität zwischen beiden Proteinen notwendig ist. Die Stärke befindet sich im oberen Bereich der Bindung von monoklonalen Antikörper zu ihren Antigenen ($K_D = 500 - 0,5 \text{ nM}$). Die Bindungsaffinität des Wildtyps von E2F1 zu Ku70 ist etwas schwächer. Jedoch ist die Bindungsaffinität von E2F1-wt-His zu Ku70-Gst mit 30 nM weiterhin sehr hoch. Mit einer Affinitäts-, bzw. einer Dissoziationskonstanten von $K_A = 3,29 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}$ und $K_D = 3,26 \text{ nM}$ wird hiermit eindeutig eine spezifische Protein-Protein-Wechselwirkung von E2F1 zu Ku70 nachgewiesen. Dies besitzt jedoch noch keine eindeutige Aussagekraft im Bezug auf die Spezifität der Bindung, wenngleich letztere bei der Höhe der Gleichgewichtskonstanten als wahrscheinlich angenommen werden kann. Im Vergleich zu den in Abbildung 19 angeführten Bindungsaffinitäten übersteigt die Bindungsstärke in der E2F1-Ku70-Bindung die einer durchschnittlichen Rezeptor-Ligand-Wechselwirkung. Die Stärke dieser Wechselwirkung ist von großer Wichtigkeit, da eine Verdrängung von Ku70 aus der Bindung mit E2F1 durch Rb verhindert werden muss. Andernfalls würde eine Phosphorylierung seitens der DNA-PK_{cs} nicht mehr möglich sein und die E2F-abhängige Induktion der S-Phase würde nicht mehr unter der Kontrolle der DNA-PK stehen. Dies ist jedoch die Voraussetzung für eine zeitlich koordinierte Reparatur der DNA-Doppelstrangbrüche, mit dessen erfolgreichen Abschluss erst wieder die E2F-abhängige Induktion der S-Phase erfolgen sollte. Für eine Reversibilität der Bindung wäre es sinnvoll, wenn mit dem Anstieg erfolgreich reparierter DNA-Bruchstellen die Affinität zwischen E2F und Ku70 sinken und die Phosphorylierung von der katalytischen Untereinheit der DNA-PK (DNA-PK_{cs}) letztendlich aufgehoben werden würde. Bisher wurde dies jedoch experimentell nicht bestätigt.

Die Deletion der vollständigen Marked Box bei der Deletionsmutante E2F1- Δ 277-350, bei der zu der stark konservierten Region der Marked Box auch C-terminal flankierende Bereiche deletiert wurden, zeigte einen totalen Verlust der Bindung an

Ku70. Dies erbringt den Beweis, dass die C-terminal angrenzenden Bereiche einen stabilisierenden Charakter auf die Protein-Protein-Wechselwirkung besitzen. Die Bindungsstärke war mit $K_A = 7,2 \cdot 10^6$ M und $K_D = 1,4$ μ M nur noch geringfügig höher als die Negativ-Kontrolle ($K_A = 1,1 \cdot 10^5$ M; $K_D = 21,7$ μ M). Deutlich wurde der Unterschied im Bindungsverhalten zum E2F-Wildtyp jedoch auch schon bei den E2F1-Substitutionsmutanten „GB“ und „ML“. Wenngleich der relative Unterschied zum Wildtyp nur um Faktor drei geringer ist, ist die absolute Abnahme der Bindungsaffinität deutlich. Ursachen liegen sicher auch in der Deletion einer dort ursprünglich vorhandenen Phosphorylierungsstelle sowie der durch eine eventuell stark veränderte Tertiärstruktur indirekte negative Effekt auf die Bindungsaffinität. Die Deletionsmutante E2F1,1-242 zeigte – vergleichbar mit der Negativ-Kontrolle – keine Bindungsaffinität zu Ku70. Der N-terminale Bereich hat somit keinen positiven Einfluss auf die Protein-Wechselwirkung zu Ku70.

Ein besonders interessantes Ergebnis der Biacore-Analysen ist die geringe Affinität von Ku70 zur Deletionsmutante E2F1- Δ 277-302 (33 μ M). Das Ergebnis dieser Deletionsmutante verweist auf die geringe Relevanz im Bezug auf die Anwesenheit der Phosphorylierungsstelle Ser 303 für das Bindungsverhalten zu Ku70. Der hier noch vorhandene Teil der Marked Box ermöglicht eine nur noch äußerst schwache Bindung zu Ku70. Dem Bereich AS 303 bis AS 350 kommt demnach nur noch marginale Bedeutung im Hinblick auf die Interaktion zu. Im Kontext zum Wildtyp-Protein besitzt diese Region somit nur einen stabilisierenden Charakter. Durch diese in vitro-Untersuchungen konnte eindeutig der Beweis erbracht werden, dass die Marked Box von E2F1 notwendig ist für die Bindung an Ku70, wobei sich der – für die Bindung – relevante Bereich auf die AS 277-302 eingrenzen lässt. Ein Modell für die Interaktion zeigt die nachfolgende Abbildung (Abb. 31):



Abbi 31: Modell für die Interaktion von Ku70 und Ku80 mit der Marked Box von E2F1.

Durch die Bindung von Ku70/80 an die Marked Box von E2F1 kommt es zu einem Block der E2F1-abhängigen Transkription. Durch das Fehlen der konservierten Region Marked Box ist eine Bindung – und demzufolge ein Block der Replikation – nicht mehr möglich. Die Transkription wird nicht unterbrochen und E2F1 kann den Übergang von der G₁- zur S-Phase induzieren.

Im Vergleich der Assoziations- und der Dissoziationskonstanten (siehe Tabelle 2) zeigt sich generell eine große Übereinstimmung in der Höhe zwischen der Komplexbildung und der Auflösung. Ein sehr deutlicher Unterschied ist bei dem Wildtyp von E2F1 zu erkennen. Der Unterschied zwischen den beiden Gleichgewichtskonstanten lässt einen funktionellen Hintergrund vermuten. So wurde

in Vorversuchen – in Folge einer transienten Transfektion – bereits eine Reversibilität des E2F1-Ku70/80-Komplexes aufgezeigt. Durch diese in vitro-Untersuchungen konnte somit eindeutig der Beweis erbracht werden, dass die Marked Box von E2F1 notwendig ist für die Bindung zu Ku70.

Die Abbildung (Abb. 32) gibt eine Übersicht über verschiedene Protein-Wechselwirkungen wieder, die Bereiche der jeweiligen Interaktionen sind grau unterlegt.

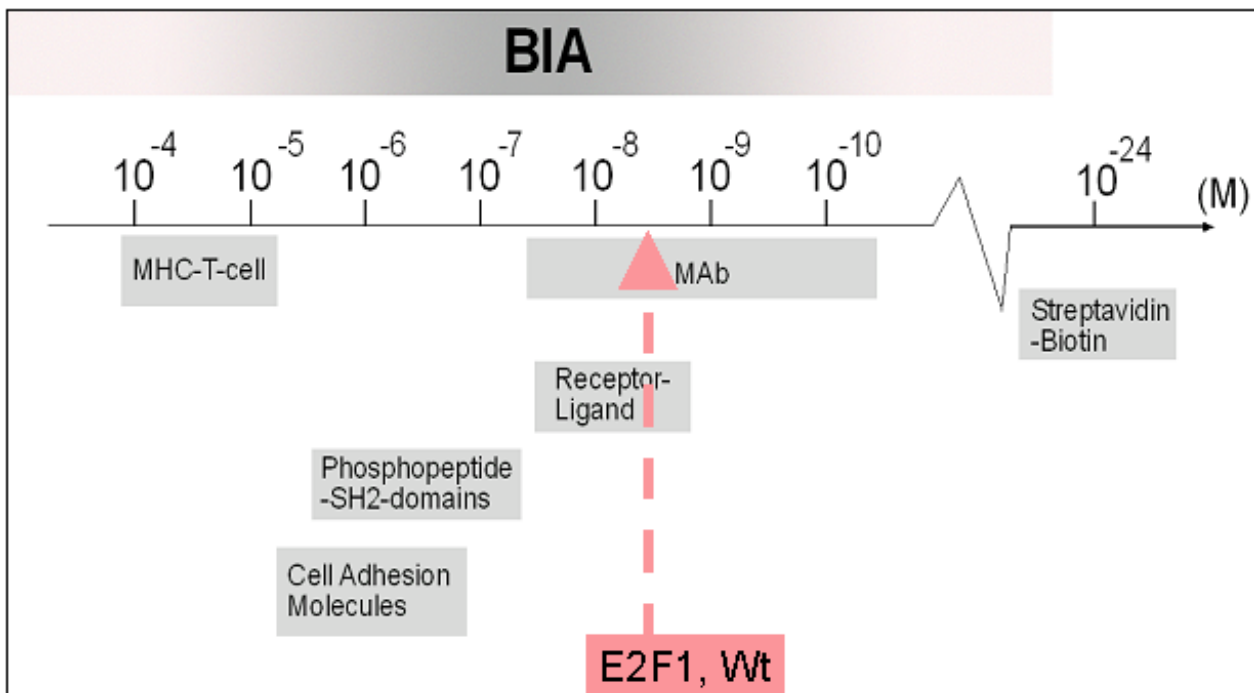


Abb. 32: Übersichtsdiagramm für verschiedene Protein-Wechselwirkungen im Vergleich zu der im Biacore-System nachweisbaren Bindungsstärke (rot markiert).

Der noch schnellere und stärkere Bindungsabbau – im Vergleich zum Aufbau des Proteinkomplexes – weist auf einen, zur Assoziation unterschiedlichen Mechanismus hin. Während die Entstehung des Komplexes von der DNA-PK wahrscheinlich durch Phosphorylierung aktiv gesteuert wird, ist bei Komplexauflösung eine eher passive Bedeutung der DNA-PK zu vermuten. Dies kann aus dem Unterschied der Assoziation zur Dissoziation gefolgert werden. Aus dem oben angeführten Modell folgt auch, dass die von der DNA-PK initiierte Phosphorylierung – und die sich im physiologischen System daraus ergebende –

Inaktivierung des Proteins E2F eine Dephosphorylierung durch ein weiteres Protein folgen muss.

Die Bedeutung der DNA-PK bei Stresssituationen in der Zelle ist bekannt (Reparatur, Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren) (Giffin et al. 1996; Lees-Miller 1996). Die Relevanz im Hinblick auf die Transkription ist jedoch noch nicht völlig aufgeklärt. Diese Situation konnte in diesem *in vitro*-System jedoch im Ansatz simuliert werden. So besteht die regulatorische Untereinheit der DNA-PK aus einem Heterodimer, Ku70 und Ku80. Getestet werden konnte jedoch nur die Bindung eines immobilisierten Proteins – hier Ku70 – zum Interaktionspartner E2F. Dieser Ansatz unterscheidet sich recht deutlich von der physiologischen Situation. Eine eventuell synergistische oder abschwächende Wirkung durch die zusätzliche Bindung von Ku80 kann hierbei nicht mit einbezogen werden und somit nicht ausgeschlossen werden. Des weiteren kann in diesem Meßsystem eine Stresssituation – wie zum Beispiel die Einwirkung von γ -Strahlen – nicht nachgestellt werden. Mit weiteren *in vivo*-Systemen ist somit zu prüfen, in wie weit die hier erzielten Ergebnisse Kongruenz zu biologischen Systemen in einer Zelle zeigen.

5.3 E2F1 ist ein Substrat der DNA-PK

Die Ergebnisse aus den Phosphorylierungs-Experimenten bestätigen sehr deutlich die Resultate der GST-Präzipitationsexperimente.

Der Wildtyp von E2F1 wird deutlich von der DNA-PK phosphoryliert. Die Höhe der Phosphorylierung ist auch ein Indiz dafür, dass die Phosphorylierung von E2F1 durch die DNA-PK sehr spezifisch ist. Ist die Region zwischen den Aminosäurenresten 303-312 deletiert, so besteht für die Untereinheiten der DNA-PK, Ku70 und Ku80, keine Möglichkeit mehr, an E2F1 zu binden. Als Folge daraus ergibt sich das Ausbleiben der Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors und entsprechend mit diesem auch das Ausbleiben der anschließenden Repression der E2F-abhängigen Transkription (Zellzyklusexperimente). Dies zeigt sich zum einen in der Deletionsmutante E2F1- Δ 277-302, Δ 413-437, in der keine Phosphorylierung des Proteins durch die DNA-PK zu erkennen ist. Bei der Deletionsmutante E2F1- Δ 277-312 ist ebenso ein nur geringer Anstieg der Phosphorylierung im Vergleich zur Kontrolle (lediglich das GST-Protein) zu beobachten, wenngleich die Phosphorylierung deutlich höher ist als die bei einer Deletion im Bereich von AS 277-302, eventuell durch eine stärkere mögliche Faltung des Proteins sein. Obwohl die Substitutionsmutante E2F1-GB nach den Ergebnissen aus den Biacore-Messungen eine wenn auch schwächere Bindung an Ku70 aufweist, wird sie durch die DNA-PK nicht phosphoryliert.

Aus den Ergebnissen der Biacore-Analysen und der Kinase-Assays ist somit zu folgern, dass Mutationen der Aminosäuren im Bereich von AS 285-288 zwar eine Phosphorylierung durch die DNA-PK verhindern, eine Interaktion zwischen E2F1 und Ku70 jedoch weiterhin möglich ist. Eine Regulation von E2F1 durch die DNA-PK scheint dann aber nicht mehr möglich.

Ein bisher favorisierter Regulations-Mechanismus der transkriptionellen Aktivität von E2F1 folgt aus dem pRb-Regulationsweg, wo nach dem Eintritt in die S-Phase die E2F1-Bindungsaktivität durch den Komplex Cyclin A/CDK4 herunter reguliert wird (Marti et al. 1999). Die zusätzliche Phosphorylierung des an E2F1 gebundenen DP1-Proteins blockiert zudem dessen Bindung an den Promoter (Harper and Elledge

1999) und verändert E2F1 in einen Repressor. Die Rekrutierung von E2F in einen RB-abhängigen Apoptose-Pathway wurde erstmalig von Ziebold et al. (2001) gezeigt. Somit ist es möglich, dass RB in der S-Phase infolge von DNA-Schädigung durch eine Phosphatase aktiviert wird (Knudsen et al. 2000).

Die Eigenschaft von E2F1, die S-Phase einzuleiten, steht in Verbindung mit der p53-abhängigen Induktion von Apoptose (Qin et al. 1994; Wu and Levine 1994; Shan et al. 1996). Einer der wichtigsten Punkte der p53-abhängigen Apoptose durch die E2F1-Induktion ist die Regulation der E2F1-Expression über MDM2. Dieser Regulationsweg hat große Bedeutung bei DNA-Schäden, da MDM2 auch die Aktivität von p53 reguliert.

Ein weiterer Mechanismus für die Regulation der transkriptionellen Aktivität von E2F1 ist seine Phosphorylierung durch ATM und ATR (Rogoff et al. 2002). Dies inhibiert die Degradation durch Proteasome über die Bindung von SCF_{skp2} (SKP-CDC53 (cullin)-F-box Komplex) (Lin et al. 2001; Marti et al. 1999). SKP ist ein Zellzyklus-reguliertes Protein mit einem Aktivitäts-Maximum in der S-Phase. Es wird hier vermutet, dass E2F1 seine eigene Degradation über die Ubiquitinylierung durch SKP2 (Harper and Elledge 1999; Hateboer et al. 1996) steuert. Dadurch kann die Aktivität gleich über zwei Wege reguliert werden: durch Phosphorylierung und durch Ubiquitinylierung. Dieses Modell ist nicht vergleichbar mit den hier dargestellten Ergebnissen und lässt vermuten, dass E2F1 nicht auf gleiche Weise von der DNA-PK reguliert wird wie durch ATM. ATM gehört – wie die DNA-PK – zur PI3K-Familie.

5.4 Der repressive Komplex führt zu einem Zellzyklus-Block in der späten G1-Phase

Die transkriptionelle Aktivität der E2F-Mitglieder wird teilweise reguliert durch spezifische Protein-Protein-Interaktionen, die in einer Zellzyklus-abhängigen Weise reguliert werden. Die Überschneidung der Regulationswege von induzierten DNA-Doppelstrangbrüchen und den in der S-Phase induzierten Transkripten zeigt, dass es gemeinsame Klassen von Genen gibt (Cho et al. 2001).

Vorversuche konnten die Vermutung bestätigen, dass E2F1 – kotransfiziert mit Ku70 und Ku80 – die Reporter-Aktivität des E2F-abhängigen Promoters reprimiert. So hatten initiale Ergebnisse in CHO-K₁-Zellen gezeigt, dass die transkriptionelle Aktivität von E2F1 bei transienter Transfektion mit steigenden Mengen von Ku70 und Ku80 stetig sinkt. Parallel hierzu konnte die transkriptionell repressive Wirkung des Komplexes durch steigende Mengen von transfiziertem E2F1 wieder aufgehoben werden.

Um die physiologische Relevanz des E2F1-Ku70/80-Komplexes innerhalb des Zellzyklusses zu untersuchen wurden Experimente durchgeführt, bei denen DNA-Doppelstrangbrüche durch γ -Strahlen induziert wurden. Um eine klare und vor allem detaillierte Aussage über die Funktion des Proteinkomplexes E2F1-Ku70/Ku80 *in vivo* zu erhalten, wurden Zellzyklus-Experimente durchgeführt, die die Dauer und den Zeitpunkt der Repression bestimmen sollten. Hierbei wurden jeweils zwei gleiche Transfektionsansätze angefertigt. Einer dieser Ansätze wurde mit γ -Strahlen bestrahlt, ein weiterer Ansatz wurde in unbestrahltem Zustand belassen. Anschließend wurde die physiologische Funktion des Protein-Komplexes nach einer DNA-Schädigung untersucht. Wird – entsprechend dem aufgestellten Modell (Abb. 33) – E2F1 durch Bindung von Ku70/80 inaktiviert, so führt dies zu einem Block an dem Übergang von der G₁- zur S-Phase. Dies kann sowohl über die Verteilung der Zellpopulation der einzelnen Zellzyklusphasen (Nachweis durch FACS-Messungen) wie auch durch die Aktivität eines E2F-abhängigen Promoters (Luciferase-Messungen) festgestellt werden.

Eines der wichtigsten Resultate dieser Arbeit ist, dass der E2F1-Ku70/Ku80-Komplex und seine repressive Wirkung auf die Transkription in Zellzyklusexperimente bestätigt werden konnte.

Die Kotransfektion von E2F1 und Ku70 und Ku80 führte nach γ -Bestrahlung zur Bildung eines transkriptionell inhibitorischen E2F1-Ku70/Ku80-Proteinkomplexes und als Folge daraus durch eine drastische Reduktion der Promoter-Aktivität zu einem Verbleib der Zellen an dem G₁/S-Phasenübergang. Es konnte so bestätigt werden, dass durch die Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen über γ -Strahlen ein repressiver Komplex gebildet wird. Der Komplex bindet an E2F-Bindungsstellen eines Promoters und verhindert die E2F-abhängige Induktion nach dem Übergangspunkt zwischen G₁- und S-Phase. Der inhibitorische Komplex löst sich erst nach weit mehr als 20 Stunden auf. Dies ist eine Bestätigung für die Bedeutung der Marked Box, die eine Bindung von Ku70 und Ku80 an E2F1 ermöglicht.

Die Ergebnisse aus den unbestrahlten Zellen zeigten bei den Zellzyklus-Experimenten nur geringe Auffälligkeiten in ihrem Zellzyklusprofil. So führten die Transfektionen von E2F1 und DP1 zu einer markanten, verlängerten G₂-Phase. Dies konnte bei bestrahlten Zellen nicht beobachtet werden. Die Transfektion von E2F1 und DP1 führte dort zu einer Verlängerung der S-Phase, als Folge einer stärkeren Induktion der S-Phase. Des Weiteren verlängert nach Bestrahlung vermutlich schon per se das in den CHO-K₁-Zellen vorhandene Ku70 sowie Ku80 die S-Phase, in dem es ein Teil des endogenen und transfizierten E2F1 komplexiert und überdies die Funktion als Reparaturprotein ausübt. Die γ -Bestrahlung von CHO-K₁-Zellen führte im Zellzyklusverlauf zu einer allgemeinen, zeitlichen Verzögerung von ungefähr fünf Stunden bis zum Ende der S-Phase. Der Eintritt in die G₂-Phase zeigte, dass sich die bestrahlten Zellen im Zellzyklusverlauf wieder in zeitlicher Korrelation zu den unbestrahlten Zellen befinden. Ergebnisse aus zum Ende dieser Arbeit noch begonnenen Experimenten mit XRS1-Zellen zeigten ähnliche Profile im Zellzyklusverlauf, wenngleich bei diesen Ku-defizienten Zellen – auch nach zahlreichen Zellzyklusexperimenten – leider keine einheitliche Aussage zur Zellzyklusregulation nach γ -Bestrahlung in Abwesenheit von Ku70 und Ku80 getroffen werden konnte. Somit steht eine Aussage über ein entsprechendes Zellzyklusprofil nach γ -Bestrahlung von Zellen ohne die mögliche Bildung eines inhibitorischen E2F1-Ku-Komplexes weiterhin aus.

Neben anderen Funktionen von Ku gibt es auch Hinweise, dass Ku indirekt eine Funktion in der Regulation der Transkription ausübt. Erstmals wurde dies festgestellt bei der Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren wie c-Jun oder c-Fos durch die DNA-PK_{CS} (Anderson 1993). Es konnte festgestellt werden (Gu et al. 1997), dass bei MEF-Zellen aus Ku70^{-/-} Mäusen, die über Serumentzug synchronisiert werden, nach Freisetzung aus dem Zellzyklusblock ungefähr 50% der untersuchten Zellen auch nach 48 h nicht wieder in den Zellzyklus-Rhythmus mit anschließender Zellteilung eintreten können. Demgegenüber haben über 84% der wt-Kontrollen in dem gleichen Zeitintervall mindestens einen vollständigen Zyklus durchlaufen. Es wird daher an dieser Stelle vermutet, dass zu der aktiven Repression der Transkription durch den E2F1-Ku70/80-Komplex bei XRS1-Zellen auch das Fehlen der indirekten transkriptionellen Wirkung von Ku70 dazu führt, weder in die G₂-Phase noch in den nächsten Zellzyklus einzutreten.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde festgestellt, dass es bei Abwesenheit der Marked Box nach Bestrahlung zu keinem funktionellen E2F1-Ku70/80-Komplex kommt. Wie aus früheren Untersuchungen (Helin and Harlow 1994; Shin et al. 1996) bekannt war, wird die transkriptionelle Aktivität von E2F1 durch die Marked Box-Region verstärkt. Dies konnte auch schon in früheren Arbeiten gezeigt werden, in denen eine Verminderung der E2F-Aktivität bei verschiedenen Marked-Box Mutanten auf bis zu 30% der ursprünglichen transkriptionellen Aktivität von E2F1,wt beobachtet wurde (O'Connor and Hearing 1994). Die vorliegenden Resultate der E2F1-Deletionsmutante E2F1-Δ277-350 bestätigen dies deutlich.

Es kommt nach Kotransfektion von E2F1-Δ270-350, DP1, Ku70 und Ku80 – d.h. bei Abwesenheit der E2F1-Marked Box – nicht zu einer Bildung des inhibitorischen Protein-Komplexes. Ein Zellzyklus-Block bleibt daher aus und die Zellen können ohne deutliche Verzögerung in die G₂-Phase sowie nach 18 h in den nächsten Zellzyklus eintreten. Die Deletionsmutante besitzt weiterhin eine aktive Aktivierungsdomäne, wodurch die Zellen durch das Ausbleiben der E2F1-Ku70/80-Komplexbildung ohne Unterbrechung im Zellzyklus voranschreiten. Die relativ kurze S-Phase nach der γ-Bestrahlung deutet auf eine Kompetition mit den aktiven, endogenen E2F1-Faktoren hin. Die transkriptionell höhere Aktivität der endogenen

E2F1-Faktoren wird möglicherweise durch eine transkriptionell geringere Aktivität der transfizierten Deletionsmutante gemindert.

Die Ergebnisse in dieser Arbeit zeigen, dass auch die Transfektion von Ku70 und Ku80 allein zu einer Komplexierung von endogenem E2F1 nach γ -Bestrahlung führt. Die Proteine Ku70 und Ku80 – ohne zusätzliche Transfektion von E2F1 – sind ausreichend für einen Arrest in der frühen S-Phase. Durch die Komplexierung von endogenem E2F1 durch das transfizierte Ku70 und Ku80 kommt es auch hier nach Bestrahlung zu einem sehr deutlichen Zellzyklus-Block in der frühen S-Phase. Die Proteine Ku70 und Ku80 stellen gut 1% der gesamten nukleären Proteine. Es ist möglich, dass sowohl Ku70 wie auch Ku80 eine posttranslationelle Modifikation nach DNA-Schädigung durch γ -Bestrahlung erfährt, wodurch eine längere Bindung an E2F1 überhaupt erst funktionell möglich wird. In Korrelation zu der schon zuvor erwähnten Phosphorylierung von E2F1 durch ATM ist jedoch die Phosphorylierung von E2F1 durch die DNA-PK_{CS} wahrscheinlich der steuernde Prozess für die Bildung des inhibitorischen Komplexes.

Es bestehen gute Übereinstimmungen zwischen den Ergebnissen aus den Zellzyklus-Experimenten und den Resultaten der Luciferase-Messungen. Die Luciferase-Werte aller Transfektionsansätze waren grundsätzlich jedoch sehr niedrig. Eine mögliche Erklärung könnte hier sein, dass der Synthese-Apparat von Proteinen durch die Synchronisierung der Zellen durch die vorangegangene Inkubation mit Mimosin unterbrochen wird. Dies könnte als Folge eine Repression der Translation bewirkt haben wovon auch die Luciferaseexpression betroffen wäre. Der Transfektionsansatz mit dem LucR,Mut-Promoter zeigt erwartungsgemäß bei An- wie auch in Abwesenheit von E2F keine Aktivierung. Die hohen Aktivierungswerte des E2F-abhängigen LucR-Promoters ohne die zusätzliche Transfektion von E2F1/DP1 ist durch die Anwesenheit von aktiven endogenem E2F1 zu erklären. Dies wird durch die sehr niedrigen Werte des Promoters mit mutierter E2F-Bindungsstelle bestätigt.

So spiegelt sich hier sehr deutlich die zeitliche Verzögerung wieder, in der sich die Auswirkungen bei dem Zellzyklus-Fortschritt wie auch bei der transkriptionellen Aktivität der E2F-abhängigen Promotoren zeigen. Nach der Transfektion von E2F1 und DP1 sowie nach Kotransfektion der Deletionsmutante E2F1- Δ 277-350 mit DP1, Ku70 und Ku80 ist eine deutliche Erhöhung der transkriptionellen Aktivität der E2F-abhängigen Promotoren während des Überganges in die S-Phase zu erkennen. Die

dort auftretende, sehr markante S-Phase sinkt nach dem Maximum bei 7 h stetig ab und verbleibt nicht über einen längeren Zeitraum bei einem einheitlich hohen prozentualen S-Phasenanteil. Ein Grund hierfür könnte ein geringeres Aktivierungspotential der E2F1-Deletionsmutante sein. Nach Kotransfektion von E2F1,wt, DP1, Ku70 und Ku80, sowie nach Transfektion von Ku70 und Ku80 allein, bleibt eine Aktivierung der Promotoren aus und bestätigt somit auch auf molekularer Ebene die Anwesenheit des inhibitorischen Komplexes. Die transiente Unterbrechung des Zellzyklus ermöglicht der Zelle die Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen, bevor sich die Zelle teilt. Hierdurch wird verhindert, dass DNA-Mutationen oder Chromosomen-Aberrationen auf die nächste Generation übertragen wird.

Das transkriptionelle Aktivierungspotential von E2F-Proteinen ist Voraussetzung für die Expression verschiedener Gene, der DNA-Replikation und des Zellzyklusfortschrittes (Harbour and Dean 2000), (Muller and Helin 2000). E2F1, induziert durch DNA-Schädigungen, ist transkriptionell inaktiv. Daher kann E2F1 nicht als Onkogen wirken (O'Connor and Lu 2000). Andererseits weisen eukaryotische Zellen ohne intaktem E2F1-Gen ein intaktes Zellzyklus-Profil auf, wobei jedoch E2F1^{-/-}-Knockout-Zellen ein deutlich verändertes Zellzyklus-Profil aufweisen. Der Grund hierfür liegt in der Möglichkeit, dass sowohl E2F2 wie auch E2F3 die Funktionen von E2F1 zu einem großen Teil übernehmen können und so eine E2F1-Defizienz kompensieren können (Cloud et al. 2002).

Die hier dargestellten Ergebnisse bestätigen die Hypothese von Myung et al. (2001), dass Gene, die für eine Reparatur von DNA-Schäden notwendig sind, auch für die Erhaltung der genomischen Integrität von außerordentlicher Wichtigkeit sind. Die hier dargestellten Resultate lassen vermuten, dass die Expression dieser Gene durch einen gemeinsamen Faktor, E2F, in der Art des „dualen Modells“ mitreguliert wird.

In direktem Zusammenhang postulierte He et al. (2000) eine essentielle Rolle von E2F in der Blockierung des Zellzyklusses während der G1-Phase nach γ -Bestrahlung. Demnach scheinen bestrahlte Zellen von einer E2F-gesteuerten transkriptionellen Repression beeinflusst zu werden, die nicht allein auf einer einfachen Inaktivierung von E2F, der sogenannten „off-switch“-Funktion beruht. Ein entsprechender Regulationsmechanismus, der eine Schlussfolgerung aus den Ergebnissen wiedergibt, stellt sich wie folgt dar: Durch die Bestrahlung von Zellen mit γ -Strahlen

werden DNA-Doppelstrangbrüche induziert, die es Ku70 ermöglichen, an den Bruchstellen der DNA-Enden zu binden. Ku70 bindet als DNA-bindendes Protein E2F1, an dem dann distal Ku80 gebunden wird. Über Ku80 kann anschließend die katalytische Determinante der DNA-PK, die DNA-PK_{CS}, binden und das komplexierte E2F1,-2 oder -3 durch die räumliche Nähe der DNA-PK_{CS} phosphorylieren. Die Phosphorylierung von E2F1 führt zu einer Inaktivierung von E2F, die Bindung von Ku70 und Ku80 an E2F zu einem Block der Transkription der E2F-abhängigen Gene. In Korrelation zu den Ergebnissen von Ross et al. (2001), wo eine Inaktivierung von E2F1 auch nach Komplexbildung mit einem weiteren Protein erfolgen kann, ist momentan noch unklar, welche Bedeutung die Phosphorylierung von E2F1 im Hinblick auf die transkriptionell, repressive Wirkung des Proteinkomplexes besitzt.

Eine Beteiligung der PIKL-Proteinfamilie bei der Kontrolle des Zellzyklus-Fortschritts infolge einer DNA-Schädigung ist schon seit langem bekannt (Lavin and Shiloh 1997), wobei auch die DNA-PK bei der Reparatur von Doppelstrangbrüchen als ein wichtiges regulatorisches Protein erwähnt wird.

E2F1 besitzt für den Übergang von der G1 zur S-Phase eine Schlüsselfunktion wie die DNA-PK für die Reparatur von Doppelstrangbrüchen. So zeigen Ku70/80-/- Doppel-Knockout-Mäuse eine Verzögerung im Wachstum (Nussenzweig et al. 1996), auch die VDJ-Rekombination (Roth et al. 1995) kann durch das Fehlen von Ku nicht abgeschlossen werden. Darüber hinaus zeigten auch Untersuchungen von Mutationen in SCID-Mäusen und Hamster-Zellen eine hohe Anfälligkeit gegenüber ionisierender Strahlung, anderen schädigenden Reagenzien sowie - als Konsequenz von Mutationen - einen Defekt in der VDJ-Rekombination. Unter Bestrahlung mit γ -Strahlen konnte in neueren Untersuchungen ein erstes – durch γ -Strahlen induzierbares – Protein identifiziert werden, dass mit der DNA-PK interagiert, bezeichnet als Protein XLP8 oder auch Clusterin (Leskov et al. 2001). Dieses Protein initiiert über eine spezifische Interaktion mit Ku70 den programmierten Zelltod. Weiterhin konnte eine Interaktion der Transaktivierungs-Domäne von E2F-1 mit dem DNA-Reparatur-Protein DDB [UV-damaged DNA-binding Protein] identifiziert werden (Hayes et al. 1998).

Die eingangs formulierte These für den Regulaionsmechanismus bei der Inaktivierung von E2F1 zeigt die Abb. 33:

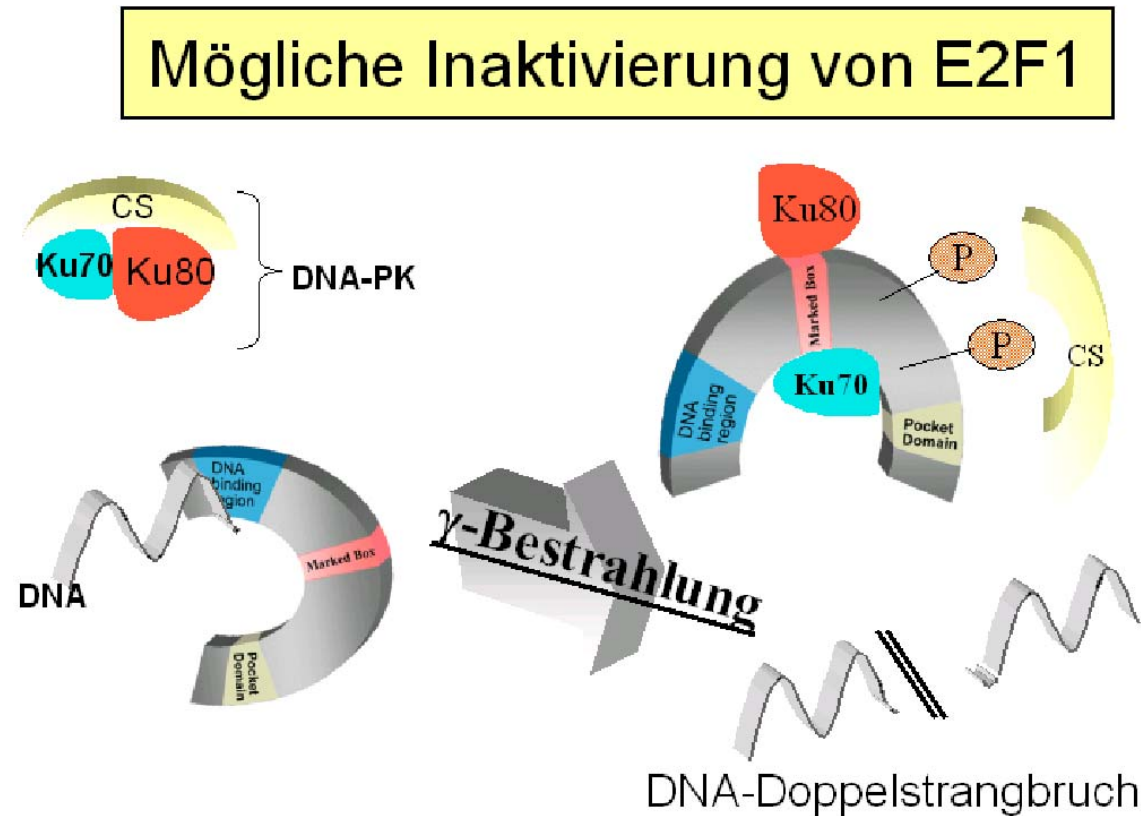


Abb. 33: Modell für die eine mögliche Inaktivierung von E2F1 durch die DNA-PK nach DNA-Schädigung.

E2F1 bindet über die DNA-bindende Domäne an die DNA, Es erfolgt die Transkription E2F1-abhängiger Gene in der späten G1-Phase. Durch γ -Bestrahlung kommt es jedoch zu DNA-Doppelstrangbrüchen. Aufgrund der Komplexierung von E2F1 durch die DNA-PK und anschließender Phosphorylierung wird bei der Anwesenheit von DNA-Doppelstrangbrüchen die transkriptionelle Aktivität von E2F1 blockiert

Durch die gezielte Deletion potentieller Phosphorylierungsstellen wäre eine genauere funktionelle Abgrenzung in dem Proteinkomplex nach dem Ursprung des repressiven Potentials denkbar.

Die hier dargestellten Ergebnisse vervollständigen auch die Resultate von O'Connor und Lu (2000), die darlegten, dass die bedeutende, transkriptionelle Rolle von E2F während der zellulären Antwort auf Stresssituationen unabhängig von p53 und pRB ist. Sie konnten eine aktive Repression von E2F1 in Übereinstimmung der Experimente von Ross et al. (2001) nachweisen. Diese konnten durch die Untersuchung der Induktion von E2F in Saos-2- Zellen und in MEF [murine embryonic fibroblasts] – erhalten aus RB-Knockout-Mäuse – gezeigt, dass die Stabilisierung von E2F1 in Anwesenheit von DNA-schädigenden Reagenzien über pRB gesteuert wird.

5.5 Ausblick

Die dargestellten Ergebnisse postulieren einen neuen Mechanismus der Zellzyklus-Regulation durch E2F1 in Folge von DNA-Schädigungen. Als eine sehr interessante Fragestellung für zukünftige Untersuchungen wäre die Identifizierung des/der letztgenannte(n) Protein(e), die/das zu einer Auflösung des Proteins führt/führen. Die Identifizierung von anderen Interaktionspartnern für E2F, die während der Dissoziation des Proteinkomplexes an E2F binden oder die Dissoziation des Proteinkomplexes fördern, sollte zur vollständigen Aufklärung der zellulären Funktion des Proteinkomplexes führen. Diesbezüglich interessant wäre auch eine genauere Untersuchung, welche Phosphatase E2F nach dessen Phosphorylierung durch die DNA-PK dephosphoryliert. Die Untersuchung von – für die Dephosphorylierung bei E2F1 gängigen – Phosphatasen sollte dabei in Vordergrund stehen. Experimentelle Ansätze hierzu finden sich in der Publikation von Arata et al. (2000), in der Untersuchung der biochemischen Kaskaden abwärts der Aktivierung von E2F1 über CDC2 sowie einem weiteren, noch unbekanntem Weg.

Weiterhin sollte die visuelle Darstellung der Interaktion *in vivo* ein Schwerpunkt zukünftiger Arbeiten sein. Mit einem neuen Visualisierungssystem (z.B. Bioporter®) erscheint diese Darstellung als möglich. Anhand dieser Methode könnte ein sehr effizienter Transfer von hochreinen Proteinen in eine eukaryotische Zelle erreicht werden. Durch den Einsatz Fluoreszenz-markierter Antikörper könnte dann an einem konfokalen Mikroskop die transiente Interaktion von E2F und Ku nach γ -Bestrahlung in einem Zellzyklusexperiment dargestellt werden. Die Dissoziation des E2F-Ku-Komplexes könnte auch durch eine visuelle Darstellung mit Hilfe der FRET-Technik erfolgen.

Eine besondere Bedeutung wird die molekulare Funktionsanalyse von Genen und Proteinen unter besonderer Berücksichtigung der Entwicklung und Anwendung neuer hochauflösender spektroskopischer und mikroskopischer Verfahren ("molekulares Imaging") bekommen. Mit dieser Methode kann so neben der Lage der aktiven Gene in der Erbsubstanz mit Hilfe von functional protein imaging auch dreidimensional, räumlich und zeitlich Interaktionen aufgelöst beobachtet werden, und so vielleicht Aufschluss auf weitere Regulationsmechanismen auf- und abwärts der Regulations-Kaskade geben.