

6. Zusammenfassung

E2F1, -2 und -3 sind als Subklasse in der E2F-Familie als transkriptionelle Aktivatoren von zentraler Bedeutung für den G₁/S-Phasenübergang. E2F1 und E2F3a sind überdies an der Regulation von DNA-Schädigungen und an der DNA-Reparatur-Mechanismen beteiligt. Die Proteine sind – unter dem Einfluss von verschiedenen Stressfaktoren, wie z.B. γ -Strahlen – durchaus auch in der Lage, die Transkription aktiv zu reprimieren. Die Reparatur dabei entstehender DNA-Doppelstrangbrüchen erfolgt durch die DNA-PK.

Für die Regulation der Transkription durch E2F ist die Anwesenheit einer konservierten Protein-Domäne, der Marked Box, notwendig. Mit Hilfe von Yeast-Two-Hybrid-Experimenten konnte gezeigt werden, dass diese Domäne innerhalb des Proteins eine neue Protein-Protein-Bindungsstelle darstellt, an die regulatorische Untereinheit der DNA-PK, das Ku70-Protein, binden kann.

Im Rahmen dieser Dissertation sollte charakterisiert werden, wie die transkriptionelle Aktivität von E2F1 durch die Bindung an den DNA-PK-Proteinkomplex im Zellzyklus beeinflusst wird. Dabei stand eine möglichst genaue Identifizierung der Bindungsregion von Ku70 an E2F1 im Vordergrund. Zu diesem Zweck wurden Präzipitationsuntersuchungen durchgeführt. Hierfür wurden E2F1-GST-Fusionsproteine mit unterschiedlich in der Marked Box deletierten Regionen für den Bindungspartner Ku70 verwendet. Die Region der Interaktion wurde *in vitro* mittels einer Biacore-Analyse bestätigt. Es konnte gezeigt werden, dass die konservierte Region *Marked Box* von E2F1 allein für die Bindung an Ku70 verantwortlich ist. Bindungsstudien zeigten zudem einen hochaffinen Charakter – mit einer Bindungskonstanten von $K_A = 3,29 \cdot 10^8$ M und von einer Dissoziationskonstanten von $K_D = 32,6$ nM – dieses Protein-Komplexes auf.

In einem weiteren Versuchsansatz wurde die Interaktion *in vivo* in Zellzyklus-Untersuchungen unter dem Einfluss von γ -Strahlen analysiert.

Die transkriptionelle repressive Wirkung des Ku70-Ku80-E2F1-Komplexes führte dort nach der Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen zu einem Zellzyklus-Block in der frühen S-Phase. In Zellzyklus-Experimenten konnte diesem Protein-Komplex somit

auch eine physiologische Bindung zugeordnet werden, indem der Zelle die Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen ermöglicht wird, bevor sie in die nächste Zellzyklusphase eintritt. Hierbei bindet Ku E2F1 und die katalytische Untereinheit DNA-PK_{cs} phosphoryliert E2F1.

Zusammenfassend stellen die Ergebnisse einen weiteren Beitrag zur Aufklärung der zellulären Funktion von E2F1 und dem Ku70/80-Dimer dar und zeigen eine Korrelationen zwischen der Repression von E2F-abhängigen Promotoren und der Gegenwart von aktivierten Ku70/80-DNA-PK-Komplexen nach DNA-Schädigung auf.