

1. Einleitung

1.1 Die Regulation des Zellzyklus

Bevor die Zellen in einem Organismus ausdifferenzieren oder sterben, durchlaufen sie sowohl in der Entwicklungsphase als auch später im ausgereiften Organismus zahlreiche mitotische Teilungen. Die hierfür notwendige Regulation des Zellzyklus besteht aus einem fein abgestimmten Netzwerk von vielen, verschiedenen Teilsystemen (Kohn 1999). Überdies muss eine Zelle auch in der Lage sein, auf schädigende, äußere Einflüsse während eines Zellzyklus angemessen reagieren zu können. Hierzu dienen sogenannte Kontroll- und Übergangspunkte, an denen im Fall einer Schädigung der DNA der Zellzyklus gestoppt werden kann. Diese Kontrollpunkte erlauben einen Übergang in die nächste Phase erst nach vollständigem Abschluss der vorausgegangenen Phase.

Der Zellzyklus besteht aus einer sehr kurzen Zellteilungsphase, der Mitose-Phase (M-Phase), sowie einer langen Interphase (Abb. 1). Diese ist in drei Abschnitte unterteilt: S-Phase (DNA-Synthese-Phase), G_1 -Phase (gap, engl.: Lücke; zwischen M- und S-Phase) und G_2 -Phase (zwischen S- und M-Phase). Entscheidende Kontrollpunkte sind:

- Der Übergangspunkt nach dem Eintritt ruhender Zellen (G_0 -Phase) in die G_1 -Phase;
- der G_1 /S-Phasen-Übergang wie auch in dem G_2 /M-Phasen-Übergang (Agami and Bernards 2000);
- Der Prophasen-Kontrollpunkt: nach Abschluss der S-Phase sowie eventueller Reparatur vor dem Eintritt in die Mitose;
- Der Anaphasen-Kontrollpunkt: kontrolliert nach korrekter Spindelformation die Chromosomensegregation sowie die Beendigung der Mitose durch die Zytokinese.

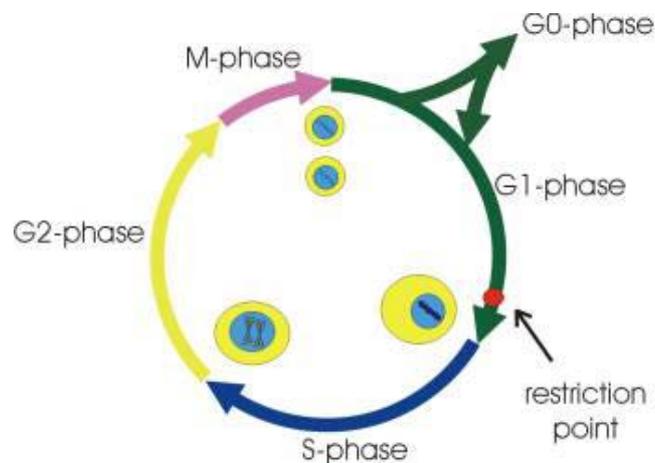


Abb. 1: Schematische Darstellung des Zellzyklus mit den einzelnen Zellzyklusphasen.

Ungefähr 1200 Gene werden während des Zellzyklus-Eintritts exprimiert. Entscheidend für die Phasenübergänge sind spezifische Gene, deren transiente Expression durch die nachfolgend genannten Zellzyklus-Hauptregulatoren gesteuert wird:

- CDK:** cyclin-dependent kinases
- Cyclins:** CDK Aktivatoren
- CDKI:** CDK Inhibitoren

Der Zellzyklus-Apparat kann durch die Induktion von DNA-Schäden gestört werden. Erleidet die Zelle durch Stress, mutagene Substanzen oder durch die Bestrahlung durch Gammastrahlen irreparable Schäden an der DNA, so besitzt die Zelle als letzte Möglichkeit, den programmierten Zelltod (engl.: *programmed cell death*) einzuleiten. Hierdurch wird verhindert, dass DNA-Schäden an nachfolgende Zellgenerationen weitergegeben werden. Die Proteine p53 sowie E2F1 (s. Kap. 1.2) sind hierfür von entscheidender Bedeutung.

Um Fragestellungen in bezug auf den Zellzyklus zu untersuchen, ist es notwendig, die unterschiedlichen Zellpopulationen auf eine einzige Zellzyklusphase zu synchronisieren. Hierfür sind verschiedene Reagenzien geeignet, die in der nachfolgenden Tabelle aufgeführt sind:

Zellzyklusphasen-Arrest	Reagenz	Zelluläre Targets/Mechanismus
G0 bis G1	Cyclosporin A	Calcineurin-Inhibitor
G ₁	Wortmannin	PI-3 Kinase, indirekt auch p70 ^{S6K}
Späte G ₁	L-Mimosin	EIF-5A
G ₁ /S und G ₂ /M	PDMP	Glucosylceramid Synthase Inhibitor
S	Methotrexat	Dihydrofolat Reduktase
G ₁ und G ₂	Staurosporin	Ser/Thr Kinase Inhibitor
G ₂ /M	Etoposid (VP-16)	Topoisomerase II Inhibitor
G ₁ /S, M	ALLN	Cyclin Degradation
M	Colchicin	Mikrotubulin Depolymerisation

Tabelle 1: Phasenarrest bei verschiedenen Reagenzien

1.2 Die E2F-Familie

Die erste bekannte Zellzyklusregulation von E2F ist die Komplexbildung durch das Retinoblastom-Protein (pRB), wodurch eine weitere Transkription E2F-abhängiger Gene nach der frühen S-Phase blockiert wird. Die Regulation der Bindung - und folglich der transkriptionellen Aktivität von E2F - erfolgt ausschließlich über die Phosphorylierung von E2F und pRB (Innocente et al. 1999) (Abb. 4).

Die Proteinfamilie des Transkriptionsfaktors E2F (E2F: E2-Promotor Binding Factor) wurde als erster Interaktionspartner für das Retinoblastomprotein (RB), einem Tumorsuppressor-Protein, das den häufigsten inhibitorischen Komplex bildet (Chellappan et al., 1991), identifiziert. Erstmals beschrieben wurde die heterogene Proteinfamilie als eine nukleäre Aktivität, die an invertierte Erkennungssequenzen innerhalb des E2A-Promoters bindet (Kovesdi et al. 1986), wobei die Abkürzung E2F der Bezeichnung E2-Faktor entstammt, da das Protein zuerst als Regulationsfaktor der frühen E2-Gene von Adenoviren entdeckt wurde.

Der Transkriptionsfaktor E2F1 spielt eine bedeutende Rolle bei der Kontrolle des Zellzyklus-Fortschritts und reguliert die Expression von Genen, die für den G₁/S-Phasen-Übergang notwendig sind (Dyson 1998, Muller and Helin 2000). Dies stellt den Übergang von der G1-Phase zur S-Phase im Zellzyklus dar. Auf die nachfolgende Phase, G2, hat E2F1 nur geringen, auf die M-Phase keinen Einfluss. Die hochaffine Bindung an DNA sowie eine entsprechend hohe transkriptionelle Aktivität von E2F erfordert die Heterodimerisierung mit einem weiteren Protein, dem DP-Protein (DP, engl.: DNA-binding Protein), mit einem der drei DP-Protein-Mitglieder: DP-1, DP-2, DP-3 (Ormondroyd et al. 1995, Dyson 1998). Die E2F-Familie besteht aus sieben Mitgliedern und kann in drei Subgruppen unterteilt werden (Abb. 2):

Subgruppe A): E2F1, E2F2, E2F3a, -b	⇒ Zellzyklus- und Zellwachstum-Regulation
Subgruppe B): E2F4, E2F5	⇒ Entwicklung, Differenzierung
Subgruppe C): E2F6	⇒ Repression der E2F-abhängigen Transkription

Abb. 2: E2F-Subgruppen und deren Funktions-Bereiche

Die E2F-Familie ist auch bei der Regulation von Genen beteiligt, die am Chromatin-Aufbau, der Chromosomen-Aggregation sowie an dem mitotischen Spindel-Übergangspunkt (Ren et al. 2002) involviert sind und somit auch über dem Zellzyklus hinaus eine große Bedeutung haben. Nachfolgend sind die funktionalen Domänen dargestellt sowie die verschiedenen E2F-Mitglieder benannt (Abb. 3):

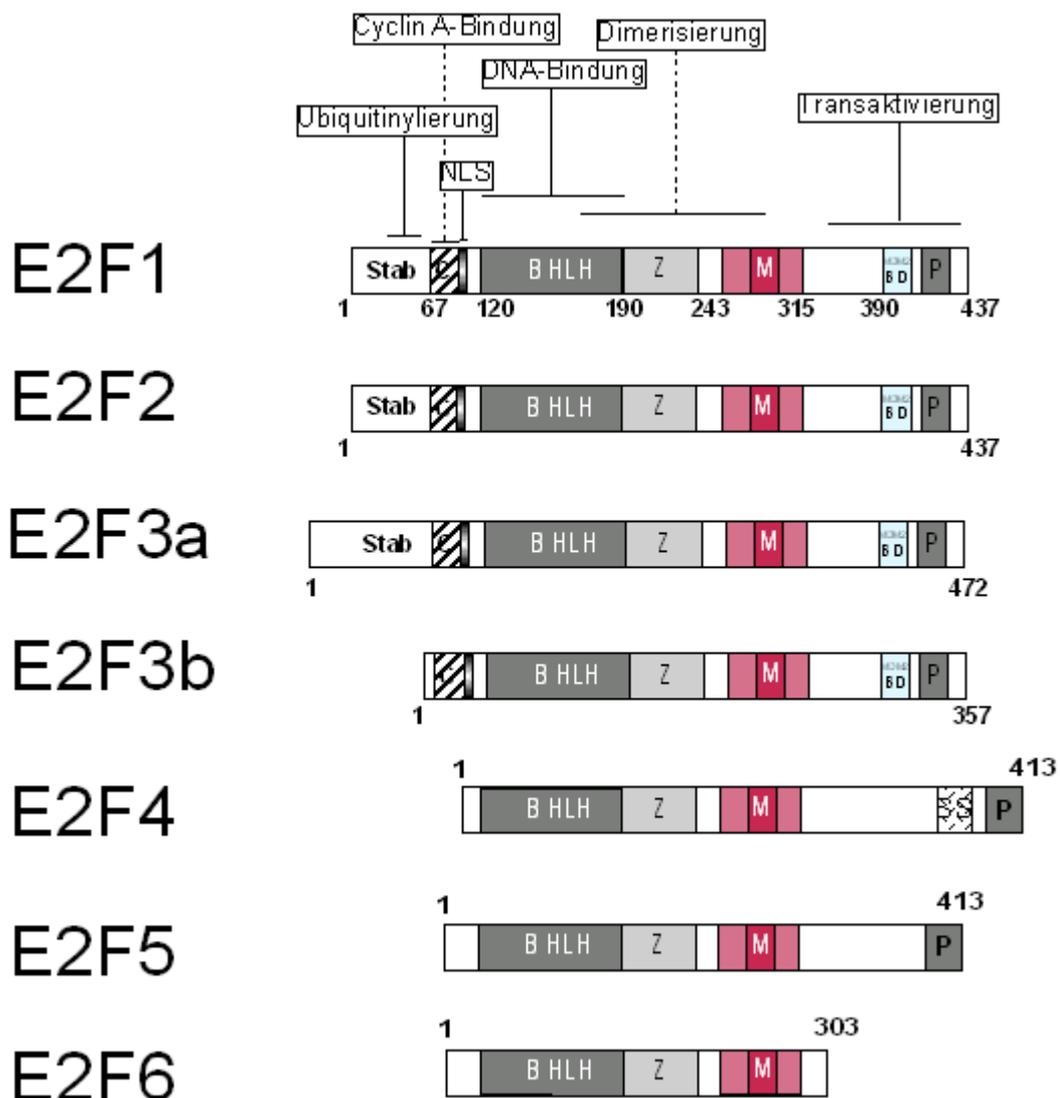


Abb. 3: Mitglieder der E2F-Proteinfamilie.

Dargestellt sind alle bisher bekannten E2F-Proteine mit ihren Bindungsdomänen. Die Klassifizierung von E2F3a und -b resultiert aus der erst nach E2F4 und E2F5 erfolgten, späteren Identifizierung eines verkürzten E2F3-Proteins.

1.3 Regulation der transkriptionellen Aktivität von E2F

In einer normal-proliferierenden Zelle nimmt das E2F-Protein eine zentrale Rolle bei der Regulation der Genaktivität im Verlauf des Zellzyklus ein. Aufgrund dieser wichtigen Funktion während des Zellzyklus steht das E2F-Protein selbst unter genauer Kontrolle. Hierzu wechselwirkt das E2F-Protein mit mehreren Proteinen. Bei

dem bekanntesten dieser Proteine, das p105^{RB} oder auch RB-Protein, wird zur Zeit davon ausgegangen, dass die wichtigste Funktion des RB-Proteins die Blockierung der transkriptionellen Aktivität von E2F ist. pRB ist ein Mitglied der Pocketprotein-Familie. Die Bezeichnung „Pocket“ folgt aus der Bindung von RB an die Pocketprotein-Domäne von E2F. Hierdurch wird nach dem Übergang von der G₁- zur S-Phase die transkriptionelle Aktivität von E2F bis zum Ende des Zellzyklus blockiert. pRB kontrolliert die Transkription von E2F durch die Rekrutierung der Histon-Deacetylase (HDAC) zu besonderen, E2F-abhängigen Genen. Aus der Anzahl der Pocketproteine folgen auch unterschiedliche Regulationsmechanismen (Li et al. 1993, Zamanian and La Thangue 1993, Zhu et al. 1993). Mit der Bindung an E2F können die Pocket-Proteine somit als Repressoren, ohne diese, als Aktivatoren agieren. Zur Veranschaulichung dient die nachfolgende Abbildung (Abb. 4):

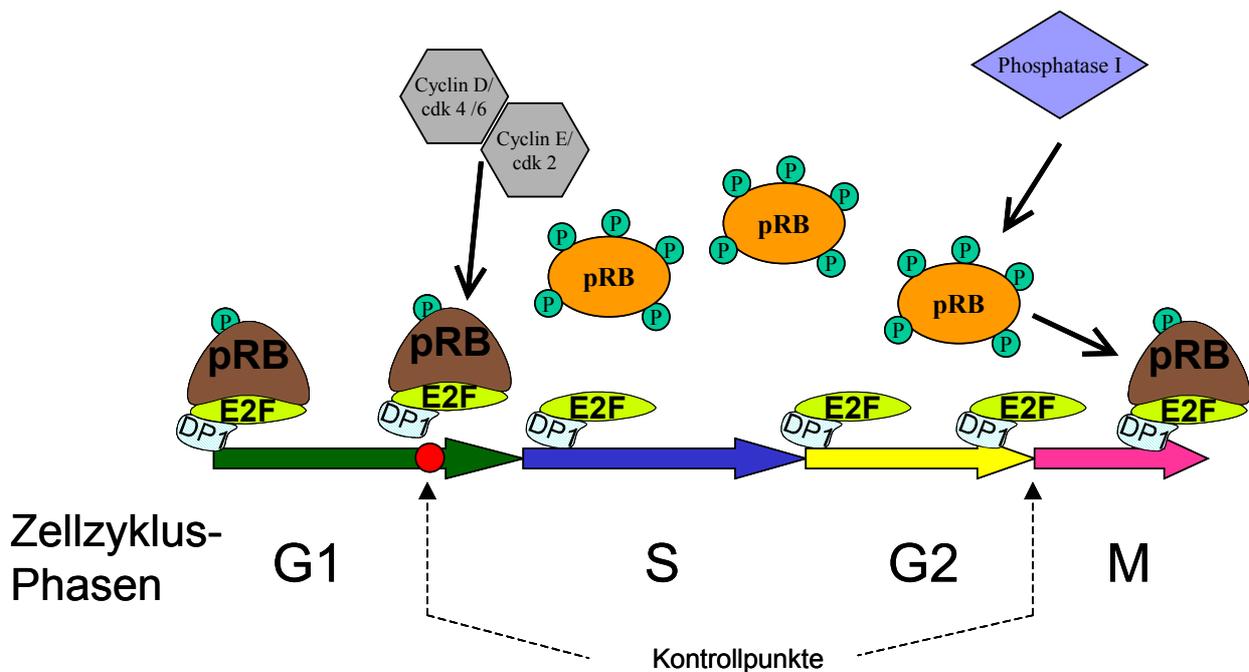


Abb. 4: Regulation der pRb-Aktivität durch Phosphorylierung innerhalb des Zellzyklus

Während der G₀-Phase des Zellzyklus ist das RB-Protein nicht oder nur gering phosphoryliert. In diesem aktiven Zustand liegt es im Komplex mit E2F vor und blockiert so als transkriptioneller Repressor die Expression von E2F-abhängigen Zellzyklus-Genen. Treten die Zellen – z.B. durch Serumstimulierung – in den Zellzyklus ein, wird das RB-Protein gegen Ende der G₁-Phase durch Hyperphosphorylierung (zehn oder mehr Phosphatgruppen) inaktiviert: die Bindung

an E2F wird gelöst, so dass E2F nun die Transkription von Genen mit E2F-Bindestellen induzieren kann.

Das Modell der Zellzyklus-abhängigen Aktivierung und Inaktivierung von E2F durch Phosphorylierung teilt sich demnach in fünf wichtige Abschnitte:

- Späte G₁-Phase: E2F1 wird an AS 332 und 337 durch Cyclin A/cdk2 phosphoryliert ⇒ Es erfolgt die Auflösung des repressiven Komplexes E2F-Rb-Komplexes
- Komplexbildung von E2F1 und DP1 und Aktivierung der E2F-abhängigen Promoterstellen
- Mittlere bis späte S-Phase: DP1 wird phosphoryliert durch Cyclin A/cdk2 ⇒ Auflösung des Heterodimers von E2F1/DP1 und Verlust der DNA-Bindung
- Rb wird durch die Phosphatase I dephosphoryliert
- G₂/M-Phase: E2F1 wird bei AS 375 phosphoryliert ⇒ ermöglicht eine hochaffine Bindung zu Rb

Die Regulation der transkriptionellen Aktivität von E2F erstreckt sich jedoch - schon allein aufgrund der hohen Anzahl von Mitgliedern der Proteinfamilie und der Diversität in den Sequenz-Homologien einzelner Domänen - weit über die Regulation durch die Pocketprotein-Familie p107, p130 und pRB hinaus.

E2F1, -2 und -3 binden an pRB mit hoher Affinität, während E2F4 und E2F5 - je nach Zellzyklus-Phase - überwiegend mit p107 und p130 interagieren (Moberg et al. 1996, Ikeda et al. 1996, Cress et al. 1993). E2F1, -2 und -3 bilden eine Subklasse in der E2F-Familie, die als transkriptionelle Aktivatoren sehr wichtig sind für den Übergang von der G₁- zur S-Phase. Dies korreliert entsprechend mit deren Expressions-Profil im Zellzyklus (Lees et al. 1993, Leone et al. 1998). Ergebnisse aus verschiedenen, experimentellen Systemen zeigten, dass das Expressionsmaximum von E2F1 auf den G₁/S-Zellzyklusphasen-Übergangspunkt begrenzt ist (Frolov et al. 2001). E2F1-3a sind nukleäre Proteine, E2F4 und E2F5 hingegen sind überwiegend im Zytoplasma lokalisiert. E2F4 und E2F5 interagieren zudem direkt mit Cyclin A und Cyclin E über eine N-terminale Region (Krek et al. 1994, Xu et al. 1994) und verfügen über ein gleichbleibendes Expressionsprofil während des gesamten Zellzyklus.

E2F6 - auch als EMA (engl.: E2F-binding site modulating activity; E2F-Bindungsstelle verändernde Aktivität) bezeichnet - ist das jüngste Mitglied dieser Protein-Familie (Morkel et al. 1997). Im Unterschied zu den bisher genannten Transkriptionsfaktoren besitzt E2F6 keine Transaktivierungs-Domäne und somit keine transkriptionsaktivierende Wirkung. E2F6 wirkt ausschließlich als Repressor der E2F-abhängigen Transkription. Der Mechanismus der Repression ist bisher noch unbekannt.

Es wird vermutet, dass die E2F-Mitglieder den Zellzyklus grundsätzlich über zwei Mechanismen steuern:

- Die direkte Aktivierung der Zellzyklus-abhängigen Genexpression, z.B. von CDC2, E2F1;
- Die direkte Aktivierung einer positiven Rückkopplung durch eine transiente Erhöhung der Proteinkonzentration von p21^{Cip1} (Wunderlich and Berberich 2002).

Bis zum heutigen Zeitpunkt sind sechs unterschiedliche Mechanismen bekannt, die die transkriptionelle Aktivität von E2F während des Zellzyklus kontrollieren können (Muller and Helin 2000):

- 1) Regulation der E2F-Synthese
- 2) Degradation durch den Ubiquitin-Regulationsmechanismus
- 3) Phosphorylierung von DP1 durch den Protein-Komplex Cyclin A/cdk2 und
- 4) dem daraus folgenden Verlust der DNA-Bindung
- 5) Repression durch Bindung eines Pocket-Proteins
- 6) Unterschiedliche subzelluläre Lokalisation und (vermutlich) Azetylierung der E2F-Proteine

Generell wird davon ausgegangen, dass die unterschiedlichen Mechanismen nicht unabhängig voneinander agieren (Blattner et al. 1999), (DeSalle and Pagano 2001).

Neue Studien zeigen, dass es viele Regulationsmechanismen von E2F1 durch Tumorsuppressor-Proteine - wie z.B. p53, p73 oder pRB - („downstream target“) gibt (Fan and Bertino 1997).

Eine Überexpression von E2F1 bewirkt einen Übergang ruhender Zellen aus der G₀-Phase in die G₁-Phase und weiter in die S-Phase (Asano et al. 1996). Zahlreiche

Gene, die für einen Eintritt in die S-Phase sowie für die DNA-Replikation notwendig sind, können durch eine Überexpression von E2F1 transkriptionell aktiviert werden (Kalma et al. 2001) oder auch zu einer Induktion der Apoptose führen. Bei allen anderen E2F-Mitgliedern wurde diese Eigenschaft bisher nicht beobachtet. Eine zeitlich sowie Phasen-bezogene, unangemessene Expression von E2F1 wie auch eine Induktion der E2F1-Aktivität während der S-Phase führt zum Zellzyklusarrest und anschließend zur Apoptose. Diese Eigenschaft von E2F1 wird auch als „dualer Effekt“ von E2F1 bezeichnet (Blattner et al. 1999), da E2F1 sowohl die Zellzyklus-Regulation fördern wie auch stoppen kann. Es ist bekannt, dass alle E2F-Familienmitglieder einen Zellzyklus-Fortschritt forcieren (mit Ausnahme von E2F6 als Repressor), wobei nur E2F1 sowohl die Apoptose als auch die Proliferation regulieren kann (Field et al. 1996). Gerade in den letzten Jahren wurden zahlreiche Resultate veröffentlicht, die die essentielle Bedeutung von E2F für den Zellzyklus-Fortschritt, der Zellproliferation sowie der Zellentwicklung belegen (Nevins 2001).

Die Tatsache, dass E2F1 sowohl den Zellzyklus-Fortschritt wie auch die Apoptose reguliert, lässt vermuten, dass Tumorzellen die Balance zwischen diesen beiden Eigenschaften bewahren müssen. Tumorzellen manipulieren demnach die Eigenschaft von E2F1 *in vivo* in Richtung der Proliferation. Die apoptotische Wirkung von E2F1 kann als Schutzsignal gegenüber abnormalen Proliferationssignalen gesehen werden (Weinberg 1996) und lässt E2F1 sowohl als Tumorsuppressor wie auch als Onkogen erscheinen. Die E2F1-Aktivität kann die repressive Wirkung von RB auch überdecken und einen p53-abhängigen (Wu and Levine 1994) oder p53-unabhängigen Mechanismus induzieren (Phillips et al. 1997). Es wurde bisher vermutet, dass die E2F-Proteine als ein spezifisches Signal für die Initiierung eines apoptotischen Mechanismus fungieren, der normalerweise blockiert wird zugunsten der Proliferation (DeGregori et al. 1997). Hierbei kann E2F1 an die DNA binden und die apoptotische Funktion von p53 über die E2F1-Cyclin A-Bindungsregion fördern (Hsieh et al. 2002).

Darüber hinaus sind E2F1 und E2F3a involviert an der Regulation von DNA-Schädigungen sowie bei DNA-Reparatur-Mechanismen (Polager et al. 2002). E2F1 wird als Reaktion auf DNA-Schädigungen in analoger Weise zu p53 hochreguliert, wobei die Kinetiken und Mechanismen abhängig sind von der Art der DNA-Schädigung. Doppelstrangbrüche sowie Zyklobutan-Pyrimidin-Dimere (engl.:

cyclobutane pyrimidine dimers, CPDs), hervorgerufen durch γ - bzw. UV-Bestrahlung, führen auch zu einer Erhöhung der DNA-Bindungseigenschaften von E2F1, parallel zu der Erhöhung der Proteinkonzentration (Blattner et al. 1999, O'Connor et al. 1999, Hofferer et al. 1999). Neuere Untersuchungen zeigen, dass die Proteine ATM (Ataxia-Telangiectasia mutiertes Protein (engl.: ataxia-telangiectasia mutated) und die ATM-verwandte Kinase (engl.: ATM-related kinase) ATR den N-terminalen Terminus von E2F1 - nicht jedoch bei E2F2 und E2F3 - phosphorylieren und dadurch auf die Regulation der E2F1-Aktivität nach einer DNA-Schädigung Einfluss haben (Lin et al. 2001).

Ein weiteres der seltenen Beispiele für die Interaktion eines Transkriptionsfaktors mit einem Reparaturprotein ist TFIIH, ein aus neun Untereinheiten bestehender Proteinkomplex mit zahlreichen, verschiedenen Funktionen. TFIIH ist unter anderem an der Reparatur von DNA-Schäden beteiligt. Zudem ist bekannt, dass es mit E2F1 interagiert und dessen Transaktivierungs-Domäne phosphoryliert (Vandel and Kouzarides 1999).

Die nachfolgende Abbildung (Abb. 5) zeigt die Regulation der Transkription von E2F1 – im Komplex mit pRb – über die Phosphorylierung von pRb durch Cyclin/CDK-Komplexe am G₁/S-Phasenübergang.

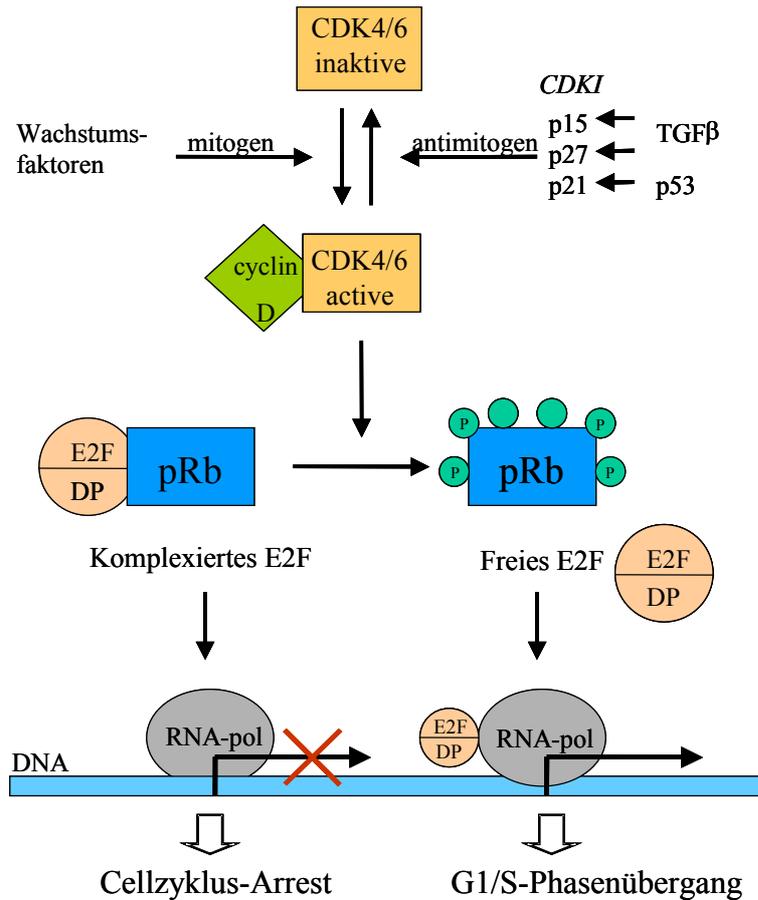


Abb. 5: pRb-EF2-Funktion: Übergangspunkt-Kontrolle.

Durch mitogene Wachstumsfaktoren wird der inaktive Komplex CDK 4/6 in einen aktiven Komplex mit Cyclin D überführt.

Dieser wirkt auf den transkriptionell repressiven Komplex durch Hyperphosphorylierung von pRb ein. Der nun freie E2F/DP-Komplex initiiert mit der RNA-Polymerase die Aktivierung der E2F-abhängigen Gene und als Folge den Übergang von der G1- zur S-Phase.

1.4 Die Marked Box von E2F

Alle E2F-Proteine zeigen einige hochkonservierte Domänen mit definierten Funktionen. Alle E2F-Mitglieder besitzen einen Leucin-Zipper, der eine Dimerisierungsdomäne, eine DNA-Bindungsdomäne (Helin 1998) sowie - mit Ausnahme von E2F6 (Morkel et al. 1997) – sowie auch eine Pocket-Protein-Bindungsdomäne besitzt, die sich innerhalb der Transaktivierungsdomäne befindet. Überdies weisen alle E2F-Mitglieder eine hochkonservierte Region zwischen dem Leucin-Zipper und der Transaktivierungsdomäne auf, die nach ihrer erstmaligen Entdeckung die Bezeichnung Marked Box trägt (Lees et al. 1993).

Die hochkonservierte Region von E2F, die Marked Box, zeigt hohe Homologien bei den einzelnen E2F-Mitgliedern. Eine Inhibierung der transkriptionellen Aktivität von E2F durch die Bindung von Prohibitin - einem potentiellen Tumorsuppressor-Protein - an die Marked Box wird durch eine kooperative Bindung von pRb unterstützt (Wang et al. 1999), (Wang et al. 1999). Helin and Harlow 1994 demonstrierten die Notwendigkeit einer präsenten Marked Box bei der Regulation der transkriptionellen Aktivität. So führt eine Deletion oder Substitution von fünf Aminosäuren innerhalb der Marked Box zu einer deutlichen Reduktion der transkriptionellen Aktivität des E2F1/DP1-Heterodimers (O'Connor and Hearing 1994, Shin et al. 1996), wobei die Heterodimerisierung selbst hierbei nicht behindert wird. Die Marked Box besitzt eine essentielle Bedeutung bei der Interaktion mit dem Adenovirus E4-Protein. E2F stabilisiert hierbei die Bindung des E4-Proteins auf dem E2-Promoter und verstärkt somit direkt die Expression von E2-Genen (Jost et al. 1996). Es gibt mindestens zwei Phosphorylierungsstellen im Bereich der Marked Box von E2F1, die mögliche Ziele von Kinasen sein könnten:

- 1) AS 271 (innerhalb der Marked Box);
- 2) AS 313 (C-terminal gelegen nahe der Marked Box).

Die physiologische Funktion der Marked Box wird noch diskutiert, es wird jedoch davon ausgegangen, dass diese Domäne eine Protein-Protein-Bindungsstelle darstellt (Slansky and Farnham 1996, Jost et al. 1996) und eine entscheidende Bedeutung in der Regulation der transkriptionellen Aktivität besitzt.

Erste Ergebnisse zur Identifizierung möglicher Bindungspartner an die Marked Box von E2F3 identifizierten u.a. Ku70, gleiche Resultate zeigten sich auch bei E2F1. Die daraus zu folgernden Vermutungen weisen deutlich auf ein neuen Mechanismus zur Modifizierung von E2F1 hin und somit E2F1 als Schlüssel-Regulator für den Zellzyklus aus.

1.5 Die DNA-PK

Um die genomische Integrität für die nachfolgende Replikation zu bewahren, ist es wichtig, dass Zellen innerhalb des Zellzyklus, in denen die DNA geschädigt wurde, zu arretieren (Harrington et al. 1998).

Die DNA-PK (DNA-abhängige Proteinkinase) gehört - wie auch das zuvor schon erwähnte Protein ATM - zu der Proteinfamilie der Phosphatidylinositol-3 Kinase-verwandten Proteine (phosphatidylinositol-3 kinase like proteins, PIKL) (Zakian 1995, Jackson 1996). Die DNA-PK ist ein heterotrimerer Protein-Komplex, der sich aus einer katalytischen (DNA-PK_{CS}, 350 kD) und zwei regulatorischen Untereinheiten, Ku70 (69 kD) und Ku80 (89 kD), zusammensetzt. Die Proteine der regulatorischen Untereinheiten sind, verglichen mit einer Vielzahl anderer, nukleärer Proteine, evolutionär sehr „junge“ Proteine. Erstmals treten diese bei *Saccharomyces cerevisiae*, als evolutionär niedrigste Spezies, in Erscheinung. Als bisher identifizierte Funktion dienen diese Proteine zur Bindung an DNA und DNA-assoziierten Proteinen (Anderson and Lees-Miller 1992, Reeves 1992).

p53 zeigt konträre Funktionen bei der Regulation der DNA-PK, da bei DNA-Schädigungen zwei verschiedene Mechanismen für die DNA-PK existieren können: ein p53-abhängiger und ein p53-unabhängiger Weg (Woo et al. 1998, Jhappan et al. 2000).

Bisher bekannte Funktionen der DNA-PK sind die Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen (DSB), die inhibierende Phosphorylierung von DNA-gebundenen, transkriptionell aktiven Proteinen sowie die nicht-homologe Endenverknüpfung (engl.: **non-homologous end-joining**, NHEJ). Die DNA-PK ist eine Serin-Threonin-Kinase, die für den katalytischen Prozess der Phosphorylierung die Anwesenheit der DNA benötigt (DNA-abhängige Protein-Kinase) (Carter et al. 1990, Lees-Miller et al. 1990). Eine Phosphorylierung der Cyclin-abhängigen Kinase CDC2 durch die DNA-PK führt zu einem G₂-Arrest (Volkmer et al. 1999).

Nach dem initialen Auftreten von DSB bindet die regulatorische Untereinheit Ku an die Enden der DNA-Bruchstücke. Das DNA-bindende Heterodimer bindet an DSB unabhängig von der jeweiligen DNA-Sequenz. Anschließend bindet dann die DNA-PK_{CS} an die geschädigte DNA und katalysiert die Phosphorylierung von DNA-gebundenen Proteinen. Bei der gebundenen DNA kann es sich um DNA-Einzelstrangbrüche, Nicks, DNA-Lücken oder Haarnadelschleifen handeln (de Vries et al. 1989). Die katalytischen Untereinheiten besitzen eine hohe proteolytische Instabilität, sofern eine der Untereinheiten nicht exprimiert wird (Swatch et al. 1995). Als Modell kann hier vermutet werden, dass Ku70 und Ku80 als sogenannte „Fänger-Proteine“ zur Rekrutierung der katalytischen Untereinheit dienen. Die Existenz einer

Interaktion zwischen E2F1 und Ku70/Ku80 wird gestützt durch eine Reihe früherer Studien, die eine enge Beziehung zwischen der E2F-Regulation und der - durch ionisierende Strahlung verursachten - DNA-Schädigung gezeigt haben (Hayes et al. 1998).

Das Heterodimer Ku70/Ku80 ist wichtig für die DNA- und Protein-Bindung und ist während des gesamten Zellzyklus als Heterodimer existent. In der Interphase ist der Proteinkomplex wie auch die DNA-PK_{CS} im Kern lokalisiert, in der Mitose befindet sich Ku jedoch im Zytoplasma (Korke et al. 1999). Die Lokalisierung von Ku an der Oberfläche von Metaphasen-Chromosomen ist vermutlich für eine Regulation am G₂/M-Phasenübergang unbedingt erforderlich. Hierdurch haben diese Proteine die Möglichkeit, eine DNA-Schädigung - die während einer Mitose erfolgt - zu erkennen und zu beheben. Die katalytische Untereinheit ist dafür nicht erforderlich.

Das Heterodimer Ku70/80 ist involviert in der transkriptionellen Kontrolle bei einer Vielzahl von regulatorischen Mechanismen (Jein and Weaver 1997). So kann Ku z. B. an die Enden von DNA-Doppelsträngen binden und diese vor einem exonukleolytischen Verdau schützen (Blier et al. 1993, Falzon et al. 1993). Dies zeigte sich bereits bei Ku80-defizienten Hefezellen, die verkürzte Teleomeraseenden aufweisen.

Das Heterodimer ist zudem an dem DNA-Replikationskomplex (Cao et al. 1994) sowie dem VDJ-Rearrangements beteiligt und besitzt eine ATP-abhängige Helikaseaktivität (Humane Helikase II) und eine DNA-abhängige ATPase Aktivität (Tuteja et al. 1994).

Die katalytische Untereinheit DNA-PK_{CS} bindet nur schwach und vorübergehend an DNA-Enden in der Abwesenheit von Ku, in Anwesenheit von Ku erhöht sich ihre DNA-Bindungsaffinität sowie die Dauer jedoch markant (Lieber et al. 1997, Yaneva et al. 1997, West et al. 1998). Das Holoenzym DNA-PK - im Besonderen die Untereinheit Ku80 - ist notwendig für die Reparatur von DSB (durch Bestrahlung mit γ -Strahlen (Smith and Jackson 1999)) sowie für die Reparatur der DNA nach der VDJ-Rekombination. Doppelstrangbrüche führten zur Identifikation von vier γ -Strahlen-Reparaturkreuzkomplementierenden Genen (engl.: X-ray-repair-cross-complementing genes), die für die Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen notwendig sind. Die drei Untereinheiten der DNA-PK gehören zur dieser Genklasse (Jeggo 1997).

Ku oder Ku-assoziierte Proteine besitzen zudem auch eine Funktion als Transkriptionsfaktor (Messier et al. 1993). So ist Ku in einer Vielzahl von Mechanismen bei der Kontrolle der Transkription involviert (Jin et al. 1997). Des Weiteren wurde bei Ku auch eine Schutzfunktion festgestellt, die eine Rolle in der Antwort auf physikalischen Stress durch γ -Bestrahlung oder Chemotherapeutika spielt (Arrington et al. 2000). Ku70^{-/-}-Zellen, die kein Ku70-Protein produzieren, exprimieren zudem nur geringe Mengen an Ku80. Die offensichtlich direkte Verknüpfung in den Expressionsstärken von Ku70 und Ku80 ist noch ungeklärt. Generell zeigen diese Zellen eine stark erhöhte Empfindlichkeit gegenüber γ -Bestrahlung (Gu et al. 1997) und eine Defizienz in der DNA-Reparatur. Dies ist bei einigen Zelllinien, sogenannte XRS1-6-Zellen (engl.: **x-ray sensitive**), gut zu erkennen. Sie sind gegenüber γ -Bestrahlungen sehr empfindlich und zeigen eine reduzierte Reparaturfähigkeit. XRS1 und XRS5-Zellen sind Ku80-defizient und DSB-Reparatur-defiziente Abkömmlinge der CHO-K₁-Zelllinie. Ku70 zeigt bei diesen Zellen einen Defekt bei der DNA-Bindung, eine DNA-PK-Aktivität ist nicht nachweisbar (Ouyang et al. 1997, Gu et al. 1997).

Bei DSB, die durch γ -Bestrahlung verursacht wurden, üben die regulatorischen Untereinheiten Ku70 und Ku80 zwei wichtige Funktionen aus:

- 1) Sie besetzen die Bruchstellen der DNA und schützen diese vor exonukleolytischem Abbau durch DNasen.
- 2) Die Helikase-Aktivität von Ku70 bereitet die Reparatur der DNA-Bruchstücke vor.

1.6 DNA-Schädigung und -Reparatur

Zur Erhaltung der Integrität des Genoms arretieren die Zellen bei DNA-Schädigungen in der G₁ - oder der G₂ -Phase, um die chromosomale DNA vor der Initiierung der DNA-Synthese bzw. dem Eintritt in die Mitose reparieren zu können (Elledge 1996). Ein gutes, physiologisches Beispiel für die Bedeutung der Kontrolle der DNA stellt der NHEJ-Mechanismus dar, der bei B-Zellen auftritt (Takata et al. 1998).

Defekte in der Reparatur von DNA-Schäden können zu verschiedenen Störungen im Ablauf eines Zellzyklus führen und erhöhen die Häufigkeit der Tumorbildung.

Über 40 % aller Tumore zeigen einen Defekt im p53-Gen, welches sehr große Exons besitzt. Krebszellen ist es häufig unmöglich, als Reaktion auf DNA-schädigende Reagenzien (z.B. alkylierenden Substanzen) in der G₁-Phase zu arretieren. Fan and Bertino (1997) vermuteten in diesem Zusammenhang, dass eine Blockierung der Bindung von E2F1 an seine DNA-Erkennungssequenzen zumindest ausreichend ist um einen negativen Effekt auf den Zellzyklus und die Zellzyklus-abhängige Genexpression auszuüben.

Besonders interessant ist zudem die Entdeckung, dass nach der Induktion von DNA-Schäden die Reparatur des transkribierten DNA-Stranges mit den aktiven Genen bevorzugt wird und wesentlich schneller verläuft im Vergleich zum restlichen Genom. Dieser Effekt wird als transkriptions-gekoppelte Reparatur (engl.: *transcribed-coupled repair*, TCR) bezeichnet.

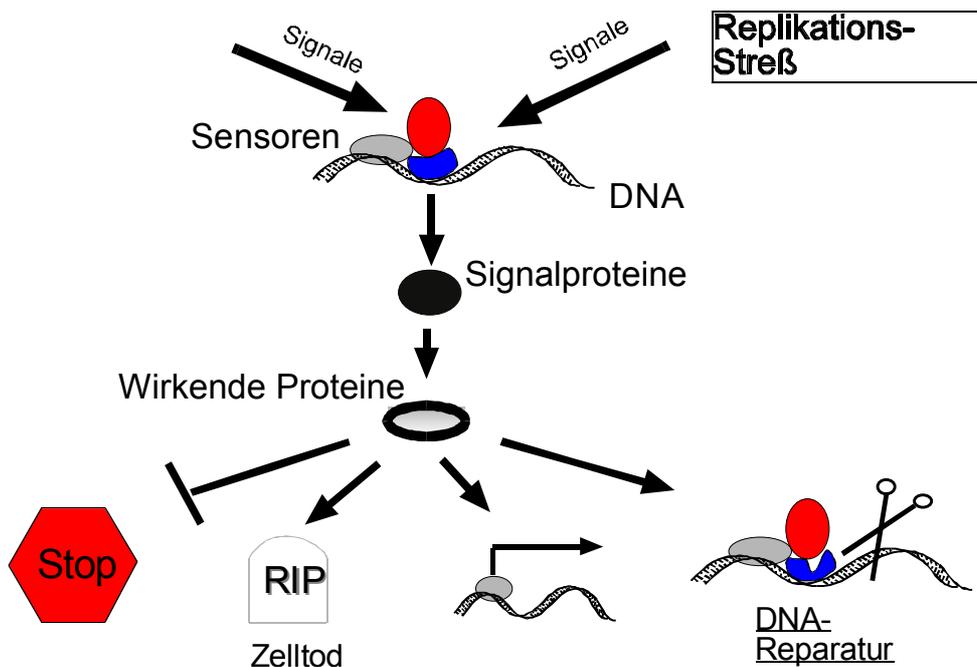


Abb. 6: DNA-Schädigung und die möglichen Folgen für eine eukaryotische Zelle

Besonders im Bezug auf E2F1 sind bei DNA-Schädigungen in den letzten Jahren wichtige Erkenntnisse erzielt worden. So wurde festgestellt, dass die Einwirkung von γ - oder UV-Strahlen zu einer Erhöhung der Bindung von E2F1 an die DNA führt (Höfferer et al. 1999). Neuere Untersuchungen zeigten, dass es hierbei zu einer Phosphorylierung von E2F1 am N-terminalen Ende kommt, wodurch dessen proteolytische Spaltung verhindert wird (Lin et al. 2001). Die Stabilisierung des E2F1-Proteins führt zu einer Konzentrationserhöhung des Proteins und letztendlich zur Induktion von Apoptose.

1.7 Aufgabenstellung

Es wurde vermutet, dass die vor Beginn dieser Arbeit gefundene Interaktion zwischen den regulatorischen Untereinheiten der DNA-PK, Ku70 und Ku80, und E2F1 eine physiologische Bedeutung hat. Das Ziel dieser Arbeit war es somit, die Interaktion von E2F mit der DNA-PK biochemisch und funktionell genauer zu charakterisieren.

Für die Identifizierung der genauen Bindungsregion von E2F1 durch Ku70/80 wurden zuerst verschiedene E2F1-Deletionsmutanten generiert. Die Stärke der Interaktion der verschiedenen E2F1-Deletionsmutanten mit Ku70 sollte durch Oberflächen Plasmon Resonanz Analysen (BIAcore) genau bestimmt werden.

Um neben der Interaktion auch eine funktionelle Relevanz der E2F-DNA-PK-Interaktion nachweisen zu können, sollten die verschiedenen E2F1-Deletionsmutanten daraufhin untersucht werden, ob sie durch die DNA-PK phosphoryliert werden können. Wenn E2F1 von der DNA-PK phosphoryliert wird, besteht die Möglichkeit, dass eine funktionelle Interaktion zwischen E2F und der DNA-PK die E2F-abhängige Transkription aufheben könnte.

Die physiologische Bedeutung der E2F-Ku70/80-Interaktion während des Zellzyklus sollte nach Transfektion von verschiedenen Deletionsmutanten mit Hilfe von Transkriptionsanalysen und Zellzyklusphasen-Bestimmungen untersucht werden.