

4. Ergebnisse

Die Ergebnisse gliedern sich inhaltlich in zwei größere Abschnitte. Zunächst wurde die Bindung von Ku70 und E2F1 sowie im weiteren die Lokalisierung der Bindungsregion anhand von Präzipitationsstudien untersucht. Anschließend wurde die Bindungsstärke von Ku70 zu verschiedenen E2F1-Deletionsmutanten in Bindungsstudien evaluiert.

Im zweiten Abschnitt dieser Arbeit wurden im Hinblick auf eine mögliche funktionelle Bedeutung dieser Protein-Protein-Wechselwirkung Zellzyklusexperimente durchgeführt.

4.1 in vitro Nachweis der Interaktion von Ku70 mit E2F1

4.1.1 Isolierung rekombinanter Fusionsproteine

Aus vorausgegangenen – mit Hilfe des Yeast-Two-Hybrid-System gewonnenen – Ergebnissen ergaben sich erste Hinweise auf eine Interaktion von einer Untereinheit der DNA-PK, Ku70, mit dem Transkriptionsfaktor E2F1 (Zitat Diss. G.Kaba).

Für die genauere Untersuchung der Interaktion sowie eine möglichst exakte Eingrenzung der Interaktionsstelle zwischen Ku70 und E2F1 wurden zunächst verschiedene Deletionsmutanten von E2F1 generiert und anschließend als His-Fusionsproteine in *E. coli* Bakterien (BL21, Codon Plus-RIL) überexprimiert. Ku70 wurde in diesen Bakterien als GST-Fusionsprotein überexprimiert. Die für die Aufreinigung notwendigen His- bzw. GST-Proteinanker befanden sich am C-terminalen Ende der Proteine. Ein Überblick über die verwendeten E2F1-Konstrukte ist in Abbildung 8 dargestellt. Da vermutet wurde, dass die Pocketprotein-Domäne von E2F die Komplexbildung zwischen beiden Proteinen stabilisiert, wurde die Domäne durch ein entsprechendes Konstrukt berücksichtigt.

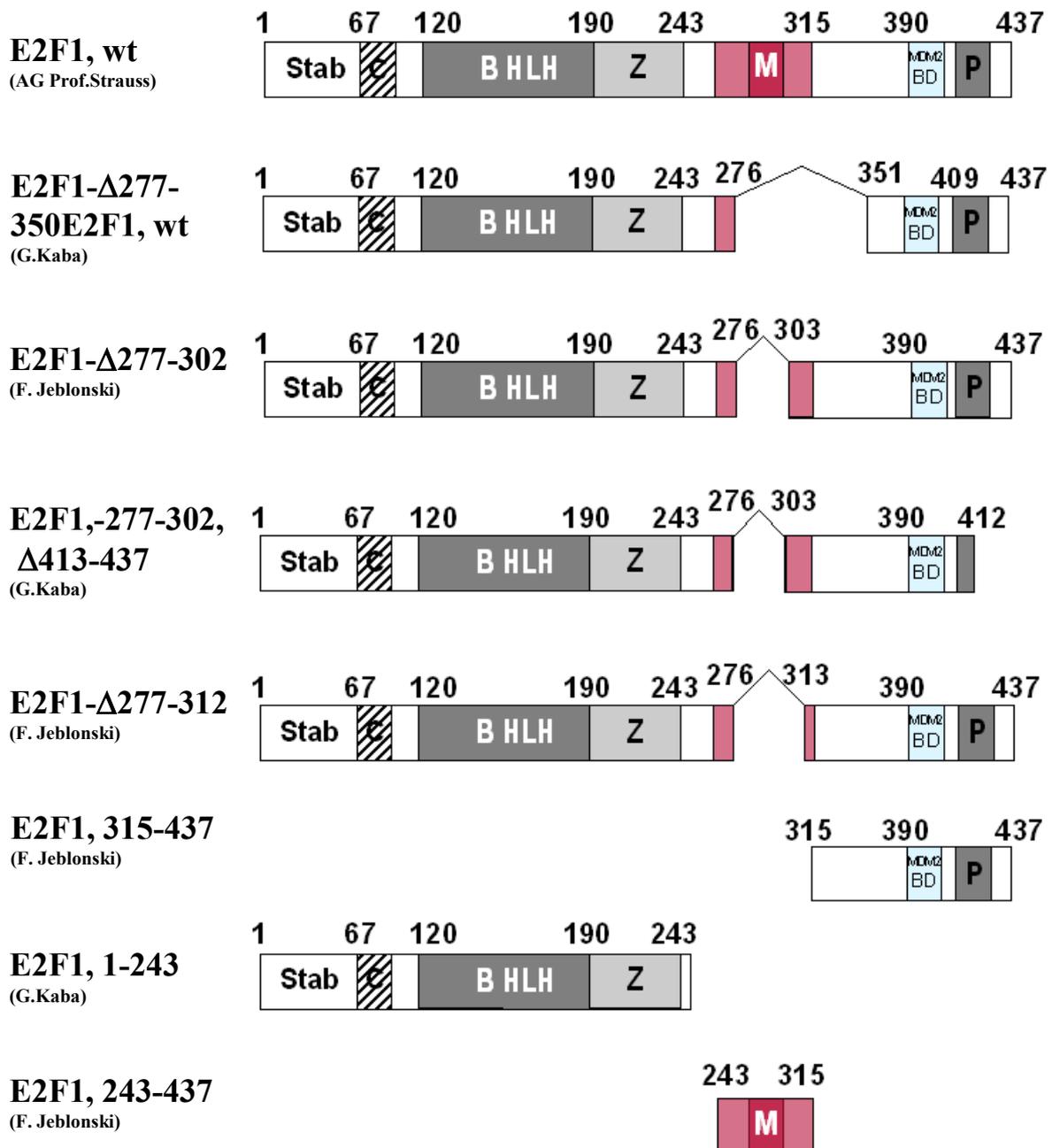
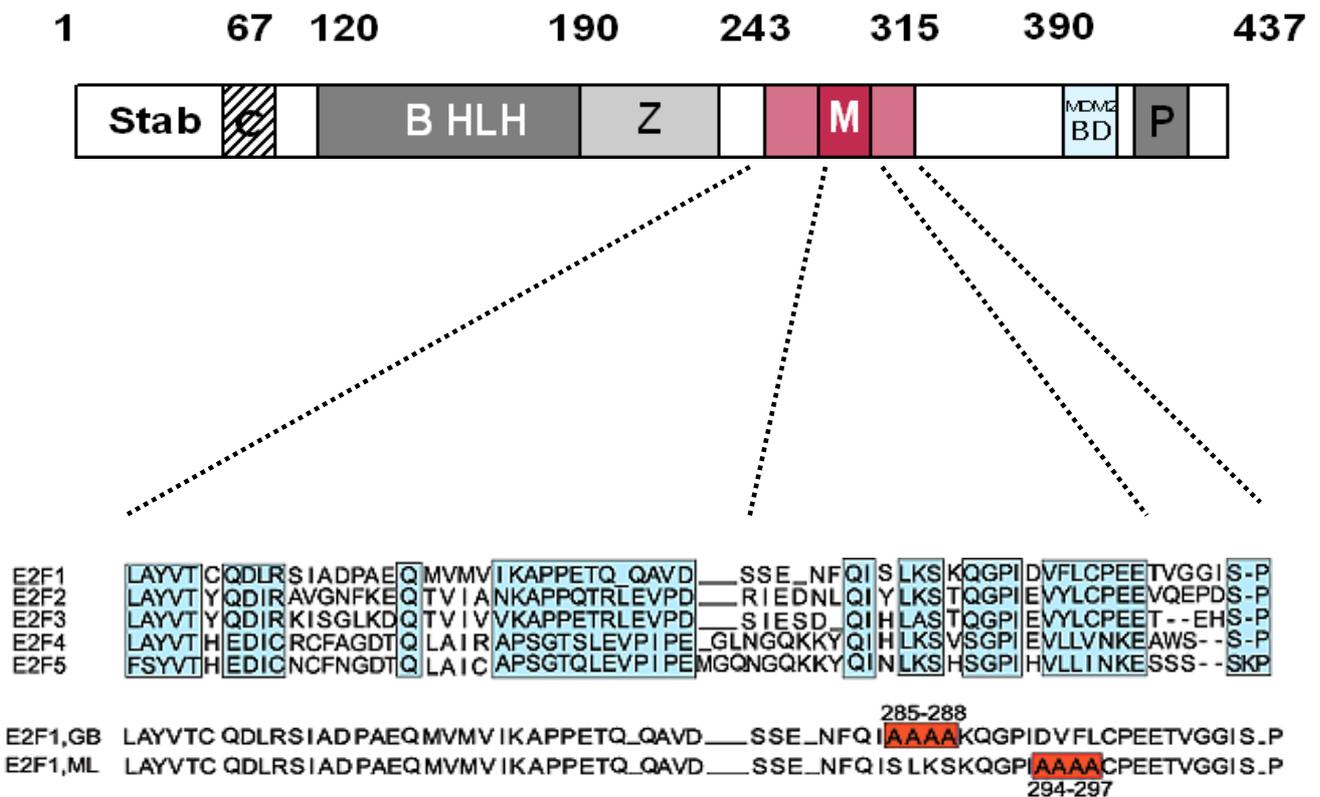


Abb. 8: E2F1-Deletionsmutanten mit ihren verschiedenen funktionellen Bindungsdomänen

4.1.1.1 E2F1-Fusionsproteine

Die Abbildung 9 zeigt die verschiedenen funktionellen Domänen von E2F1. Ausgehend von der konservierten Region Marked Box ist zudem die Marked Box aller E2F-Mitglieder dargestellt und zeigt blau hervorgehobene Bereiche als hochkonservierte Regionen. Auf dieser Grundlage wurden die Substitutionsmutanten GB (AS 285-288) sowie ML (AS 294-297) generiert, in denen an unterschiedlichen Stellen jeweils vier Aminosäuren durch Alanin ersetzt wurden.

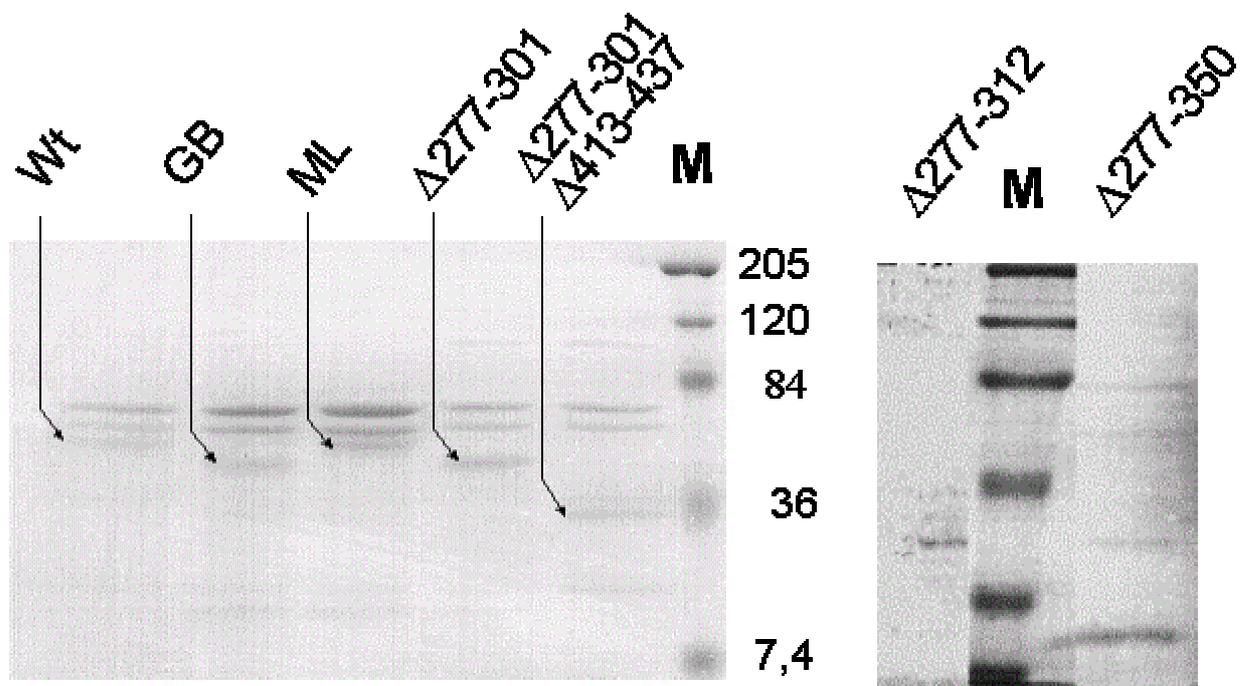


- Stab = Stabilisierungsdomäne
- C = Cyclin-Bindungsstelle
- BHLH = DNA-Bindung
- Z = Zipper
- M = Marked Box
- MDM2-BD = MDM2-Bindungsdomäne
- P = Pocketprotein-Bindungsdomäne

Abb. 9: Marked Box der verschiedenen E2F-Mitglieder und E2F1-Substitutionsmutanten

Die oben angeführten E2F1-Fusionsproteine wurden für GST-Präzipitationsexperimente und Phosphorylierungs-Experimente als GST-Fusionsprotein bzw. für die Verwendung in Biacore-Messungen als His-Fusionsprotein exprimiert. Die Aufreinigungen erfolgten entsprechend Kap. 3.3.3 oder 3.3.2. Die unten abgebildeten Polyacrylamidgelen zeigen ein repräsentatives Beispiel für die Aufreinigung (Abb. 10 A, B). Hierbei ist zu erwähnen, dass der Transkriptionsfaktor E2F nach dessen Aufreinigung stets ein charakteristisches Bandenmuster mit drei Banden aufweist (Huber et al. 1993), wobei sich die Spezifität der verschiedenen Proteinkonstrukte in der untersten der drei Banden zeigt. Dies wurde durch entsprechende Western-Blot-Nachweise abgesichert. Eine Besonderheit wies das in der Marked Box mutierte E2F-Konstrukt GB auf, welches reproduzierbar - vermutlich durch eine Laufanomalie des Proteins – eine scheinbare Größe von 45 KD aufwies. Die vermutete Laufanomalie bestätigte sich auch im Western Blot (Abb. 10 B).

A)



B)

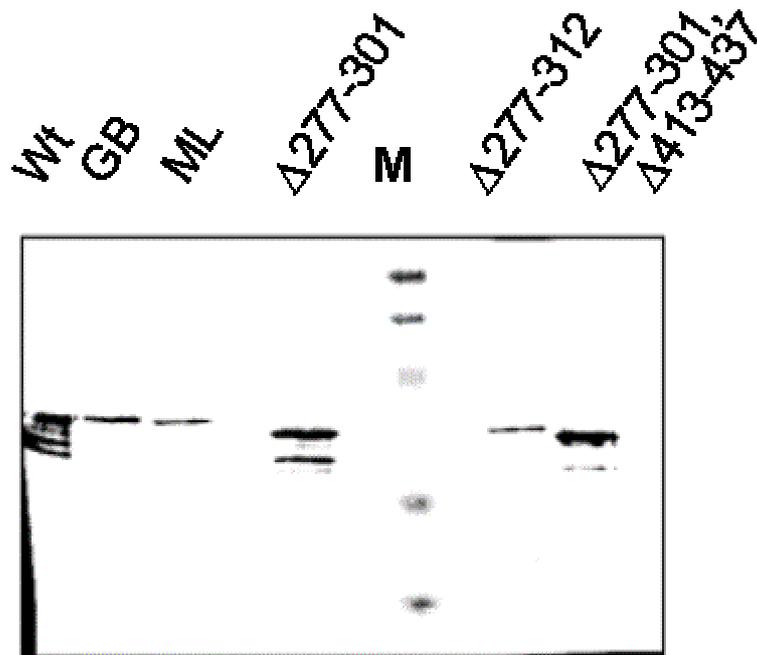


Abb. 10: Aufgereinigtes His-Fusionsprotein von E2F1 und Deletionsmutanten. A) Coomassie-Färbung nach Expression und Aufreinigung über den His-Terminus. B) Western-Blot: anschließender Immunoaffinitäts-Nachweis des in A) verwendeten Polyacrylamidgels mit α -E2F1-mAb.

4.1.1.2 Ku70-GST-Fusionsprotein

Das Gel in Abb. 11 zeigt die Ergebnisse der einzelnen Aufreinigungsstufen. Ku70 ist ein DNA-bindendes Protein, wodurch die Aufreinigung des Proteins deutlich erschwert wurde. Als Resultat von technisch wie zeitlich sehr anspruchsvollen Optimierungen für eine bestmögliche Protein-Aufreinigung wurde eine geeignete Kombination aus verschiedenen Aufreinigungstechniken herausgearbeitet: Das Protein wurde zunächst über eine GST-Affinitätschromatographie aufgereinigt (Abb. 1, Spur 2 und 3). Die Bindungsstärke bei der Dimerisierung der GST-Anker ist jedoch – im Vergleich zu anderen Aufreinigungstechniken mit His- oder Flag-Tag-Proteinanker – verhältnismäßig schwach. Der Grad der Aufreinigung war demzufolge nur gering, lediglich grobe Verunreinigungen konnten entfernt werden. In der anschließenden FPLC-Aufreinigung wurde eine hohe Reinheit des exprimierten Proteins erreicht (Abb. 11, Spur 9 und 10). Durch eine abschließende α -Ku70-Immunoaffinitäts-chromatographie konnte eine sehr gute Erhöhung der Konzentration

des Proteins mit einer zusätzlichen Aufreinigung erreicht werden (Abb. 11, Spur 6), die den Reinheitskriterien für eine Biacore-Anwendung genügt.

Für die Biacore-Messungen wurde aufgrund der geringen Mengenanforderungen im Mikromaßstab gearbeitet. Ein Maß für den Grad der Aufreinigung des aufgereinigten GST-Ku70 zeigt das Silbergel in Abb. 11.



Abb. 11: Silber-Färbung verschiedener Ku70-Eluate

Spur 1) 80 kD-Marker; Spur 2) 1. GST-Eluat; Spur 3) 2. GST-Eluat; Spur 4) Zellextrakt; Spur 5) Marker; Spur 6) Immunoaffinitätschromatographie-Eluat; Spur 7) BSA; Spur 8) Marker; Spur 9) 1. FPLC-Eluat; Spur 10) 2. FPLC-Eluat

4.1.2 GST-Präzipitations-Experiment (GST-Pull-Down)

Mehrere Techniken ermöglichen den Nachweis einer Interaktion zwischen zwei Proteinen. Es wurde unter Verwendung der oben angegebenen Proteinkonstrukte zuerst ein GST-Präzipitationsexperiment durchgeführt, wodurch ein *in vitro* Nachweis der Interaktion von Ku70 sowie Ku80 und E2F1 erbracht werden sollte. Aufgrund der Bindung von GST an Glutathion lässt sich das GST-Fusionsprotein direkt aus dem Zelllysate gewinnen. Diese Eigenschaft wird für den Nachweis einer Interaktion eines GST-Proteins mit einem anderen Protein genutzt.

Für den Nachweis der Komplex-Bildung des Transkriptionsfaktors E2F1 und den Reparaturproteinen Ku70 und Ku80 wurden jeweils 1 µg der nach 3.3.1 generierten GST-E2F1-Fusionsproteine nach Kap. 3.3.8 an die mit Milchpulver vorbehandelte Glutathion-Sepharose gebunden. Als Positiv-Kontrolle diente das nach 3.4.2 hergestellte HeLa-Kernextrakt. Als Negativ-Kontrolle diente die erste Proteindomäne des Transmembranproteins von EDG6 als GST-Fusionsprotein. Das membranständige signalgebende Protein sollte aufgrund seiner Lokalisation und Funktion keine Interaktion, weder zu Ku70 noch zu Ku80, aufweisen. Die GST-Proteine wurden nach einer PAGE durch eine Coomassie-Färbung detektiert (Abb. 12).

Hierzu wurden zwei verschiedene Verfahren des Präzipitationsexperiments durchgeführt: Zum einen wurde nun der E2F1-Sepharose-Komplex in HeLa-Kernextrakt suspendiert, in dem anderen Verfahren wurde hierzu die E2F1-Sepharose mit *in vitro*-Translationsprodukt (3.3.9) aus Ku70 bzw. Ku80 inkubiert. Nach vier Stunden weiterer Inkubation wurde der Sepharose-Protein-Komplex dreimal gewaschen, aufgekocht und elektrophoretisch aufgetrennt. Der Nachweis erfolgte durch einen Western Blot durch monoklonale, AP-konjugierte Antikörper gegen Ku70 (Abb. 12 A) sowie Ku80 (Abb. 12 B). Es konnte gezeigt werden, dass sowohl bei der Verwendung von Kernextrakt (Abb. 12 A und B, Spur 5) – 7)) wie auch bei dem Einsatz von *in vitro*-Translaten (Abb. 12 A, Spur 2) – 4), Abb. 12 B, Spur 1) – 3)) eine Bindung von Ku an E2F1 stattfindet. Zudem konnte auch festgestellt werden, dass sowohl eine Bindung von Ku70 als auch bei Ku80 eine Bindung mit E2F1-Wildtyp zu erkennen ist. Als Negativ-Kontrolle diente die erste Proteindomäne des Transmembranproteins von EDG6 als GST-Fusionsprotein (Abb. 12 A und B, Spur 8). Das membranständige signalgebende Protein sollte aufgrund seiner Lokalisation und Funktion keine Interaktion, weder zu Ku70 noch zu Ku80, aufweisen. Erwartungsgemäß gab die Positiv-Kontrolle, die Verwendung von Kernextrakt, ein deutlich positives Signal, EDG6-GST zeigte als Negativ-Kontrolle keine Interaktion zu Ku70 oder Ku80.

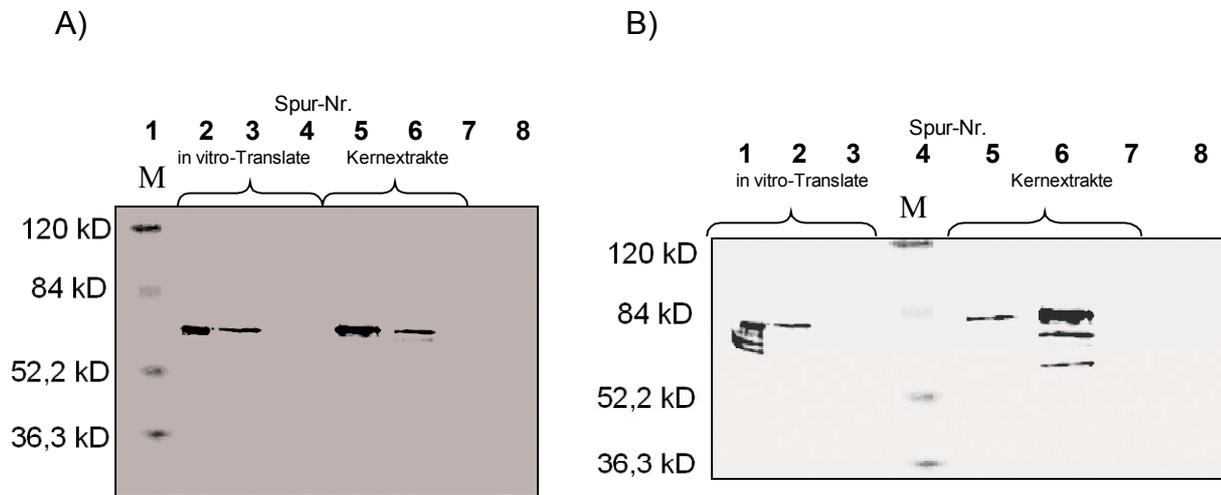


Abb. 12: Western-Blot mit Kernextrakt und *in vitro*.Translaten:

A) Ku70

Spur 1) Marker
 Spur 2) E2F1,wt-GST
 Spur 3) E2F1, MB-GST
 Spur 4) E2F1- Δ 270-350-GST.
 Spur 5): E2F1,wt-GST
 Spur 6) E2F1, MB-GST
 Spur 7) E2F1,-270-350-GST
 Spur 8) EDG6 (1. TMD) -GST

B) Ku80

Spur 1) E2F1,wt-GST
 Spur 2) E2F1, MB-GST
 Spur 3) E2F1- Δ 270-350-GST.
 Spur 4) Marker
 Spur 5): E2F1,wt-GST
 Spur 6) E2F1, MB-GST
 Spur 7) E2F1- Δ 270-350-GST
 Spur 8) EDG6 (1. TMD) -GST

Die E2F1-Deletionsmutanten E2F1- Δ 277-350 und E2F1- Δ 277-301, Δ 413-437 zeigten in einem weiteren Experiment (Daten hier nicht gezeigt) keine Interaktion, weder mit Ku70 noch mit Ku80. Die Ergebnisse belegen, dass die Interaktionsstelle von Ku70/Ku80 in der Marked Box-Region zu finden ist. Zudem zeigen diese Ergebnisse (Spur 3 in Abb 12 A u. bzw. Spur 2 in 12 B), dass die Anwesenheit der Market Box von E2F1 für den Nachweis der Interaktion von Ku70 und Ku80 mit E2F1 *in vitro* nicht notwendig ist.

Da die Interaktion von Ku70 und Ku80 mit dem E2F1-Wildtyp jedoch noch stärker ist, lässt sich eine synergistische Interaktion – unter Beteiligung vermutlich flankierender Regionen – vermuten. Quantitative Aussagen über die Relationen der Bindungsstärken beider E2F1-Konstrukte sind hier jedoch nicht möglich.

Aus den oben beschriebenen Ergebnissen (Abb. 12) konnte kein Unterschied in der Höhe der Bindungsaffinität von Ku70 und Ku80 an E2F1 abgeleitet werden, da die

Bandenintensität sowohl bei Ku70 wie auch bei Ku80 nahezu identisch ist. Einer der Gründe hierfür liegt vermutlich in dem hohen Eigenanteil von Ku70 und Ku80 in den Retikulozytenlysaten, die für die *in vitro*-Translation verwendet wurden.

Weitere Gründe sind die Häufigkeit des Heterodimers von ungefähr 1 % der nukleären Proteine und die generell eingeschränkte Quantifizierbarkeit eines Western-Blots, wodurch eine Unterscheidung der Bindungsstärke zwischen diesen beiden Proteinen zu E2F1 nur bedingt möglich ist.

4.2 E2F6 reprimiert die E2F1-abhängige Transkription

Die Funktion von E2F1, E2F2 und E2F3a liegt in der Induktion der Transkription E2F-abhängiger Gene und dem Voranschreiten des Zellzyklusses. E2F3b - 5 hingegen aktivieren Gene, deren Expression eine Differenzierung der Zelle bewirkt. Sowohl der Protein-Komplex E2F1-Ku70 wie auch E2F6 besitzen ein transkriptionell repressives Verhalten und daher eine ähnliche Wirkungsweise. In diesem Kontext sollte mit dem auch für spätere Untersuchungen verwendeten Reporter wtE2F-Luc (s.3.5.1) die Repression der E2F1-abhängigen Transkription durch E2F6 untersucht werden. Der synthetisch generierte Reporter wtE2F-Luc besitzt drei Bindungsstellen für E2F in seinem Promoter. Hierdurch wird eine starke Induktion des Promoters sichergestellt. Die Lumineszenz als Maß für die Promotoraktivität kann nach Transkription und Expression eines Luciferasegens mit Hilfe eines spezifischen Substrats gemessen werden. Hierbei wird vorausgesetzt, dass die Stärke der Induktion der E2F-Promotoren der Stärke der Induktion des Kontrollgens entspricht, da E2F kein häufig-codiertes Gen ist.

Die dann in den Versuchen gemessenen unterschiedlichen Signalstärken werden aufgrund der Proportionalität der Induktion verwendet. Es kann direkt als Maß für die jeweilige Transkriptionsstärke abgeleitet und verglichen werden.

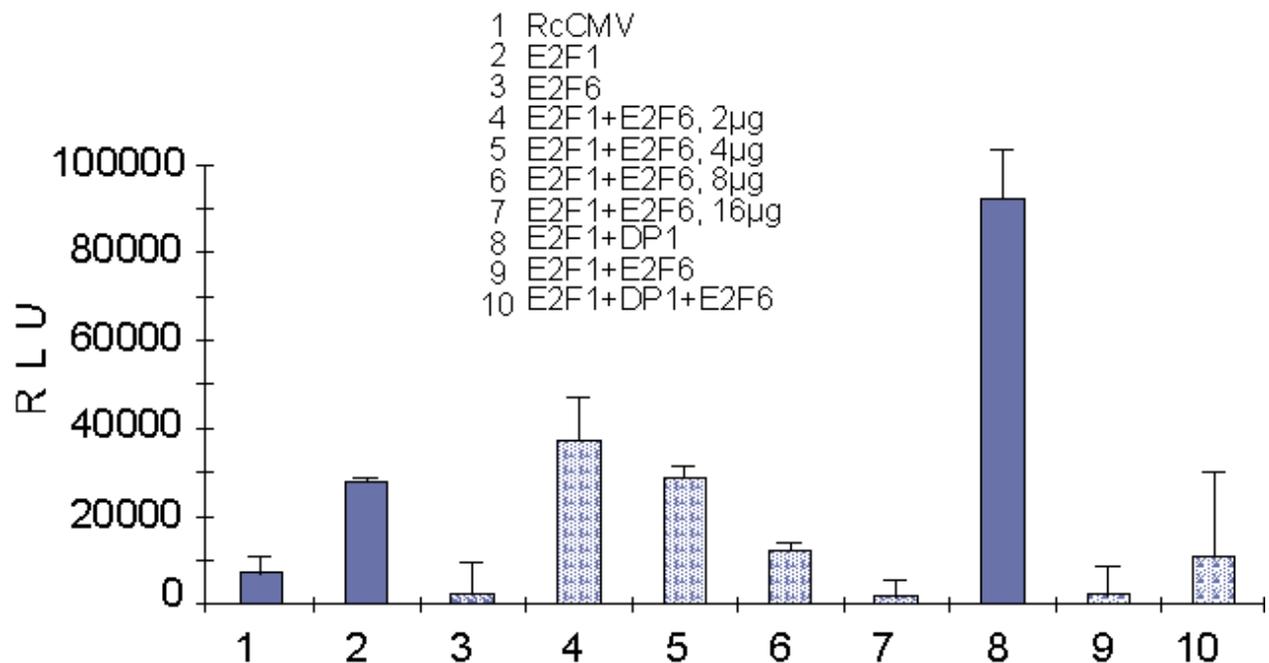


Abb. 13: E2F6 agiert als E2F-spezifischer Repressor der transkriptionellen E2F-abhängigen Aktivität, gezeigt sind Luciferasewerte (Einkanal-Messung). HeLa-Zellen wurden mit oben angegebenen Plasmiden transient transfiziert.

Abbildung 13 zeigt die Höhe der Transkriptions-Aktivität des E2F-abhängigen Promoters in einer dualen Luciferase-Messung in RLU (relative light units) an. Als Negativ-Kontrolle diente hier die Transfektion des Promoters ohne zusätzliche Transfektion von E2F. Diese zeigt erwartungsgemäß eine geringe transkriptionelle Aktivität, die durch die Anwesenheit von endogenem, aktiven E2F bei unsynchronisierten Zellen eine Grundaktivität von 10000 RLU besitzt. Die Koftransfektion von E2F1 führt zu einer dreifach höheren Aktivität des Promoters, wobei die Transfektion von E2F6 die transkriptionelle Aktivität des Promoters beinahe auf Null setzt. Letzteres bestätigt die oben angeführte These, dass endogenes E2F für die Aktivität des Promoters in Ansatz 1 verantwortlich ist. In Ansatz 3 zeigte sich der repressive Charakter von E2F6. Die Ansätze 4 bis 7 zeigen die Koftransfektion von E2F1 und unterschiedliche Konzentrationen von E2F6. Schon bei der doppelten Menge des E2F6-kodierenden Plasmids zeigte sich im Vergleich zum transfizierten E2F1 alleine eine Repression der transkriptionellen Aktivität, die mit der jeweiligen Verdopplung der Konzentration von E2F6 sukzessive sinkt. Die Koftransfektion von 8

μg E2F6 führt zu einer vollständigen Repression der Transkription und hebt die aktivierende Wirkung von E2F1 komplett auf. Die transkriptionelle Aktivität des Promoters ist bei der Kotransfektion von DP1 mit E2F1 dreifach höher als bei der alleinigen Transfektion von E2F1. Die deutliche Verstärkung der Transkription durch die Heterodimere des E2F1/DP1-Proteinkomplexes ist bekannt und physiologisch sinnvoll; sie bietet die Möglichkeit zur differentiellen Genregulation.

Diese erheblich stärkere Aktivierung des Promoters - im Vergleich zur Aktivierung ohne DP1 - kann in gleicher Weise durch die Kotransfektion mit E2F6 vollständig neutralisiert werden. Überdies konnte in Abb. 13 gezeigt werden, dass E2F6 neben der Komplexierung von E2F1 auch die Promoter-Aktivität vollständig reprimiert.

Der Mechanismus der Repression durch E2F6 war bis zu diesem Zeitpunkt noch unbekannt. Die Bindungsregion von E2F6 an E2F1 ist ebenfalls noch nicht bekannt, wengleich angenommen werden kann, dass die Interaktion über die Dimerisierungsdomäne im N-terminalen Bereich erfolgt.

4.3 Protein-Protein-Wechselwirkungs-Analysen

Die vorhergehenden Versuche aus Kapitel 4.1 wiesen die Marked Box-Region von E2F1 eindeutig als Bindungsregion für Ku70 sowie für Ku80 aus. Die Ergebnisse schließen jedoch nicht - so im Falle der GST-Pulldown-Experimente - die potentielle Stabilisierung des E2F1-Ku70/80-Komplexes durch andere anwesende Proteine aus. Zudem ist bei den vorhergehenden Versuchen nur eine qualitative Aussage möglich, die keine Beurteilung des funktionellen Komplexes im Hinblick auf die Stärke der Affinität ermöglicht.

Für die Quantifizierung der Bindung wurden biomolekulare Interaktions-Analysen (BIA) unter Verwendung des Biacore 2000 Systems durchgeführt. Diese Meßmethode basiert auf dem physikalischen Prinzip der Oberflächen-Plasmonresonanz (engl.: surface plasmon resonance, SPR) und ermöglicht die Messung von Protein-Protein-Wechselwirkungen in Abwesenheit von Kofaktoren, in dem die Wechselwirkung gereinigter Proteine betrachtet wird. Hiermit war es möglich, die Stärke der Protein-Protein-Wechselwirkung zwischen Ku70 und E2F1 sowie den Deletionsmutanten von E2F1 zu quantifizieren.

Zu Beginn der Messung strömt E2F1 (Wt- oder Deletionsprotein) als Ligand über seinen Bindungspartner Ku70. Es erfolgt eine Bindung, deren Stärke sich in dem Anstieg der Assoziationskurve darstellt. Die Dissoziation des Komplexes beginnt mit dem Injektionsstop bei einem kontinuierlichen Pufferfluss. Der kinetische Verlauf der Bindung gibt eine Aussage über die funktionelle Relevanz der Regulation von E2F1 durch die DNA-PK. Die Immobilisierung des Ku70-Proteins – im Weiteren als Ligand bezeichnet – zeigt schematisch die Abbildung 14:

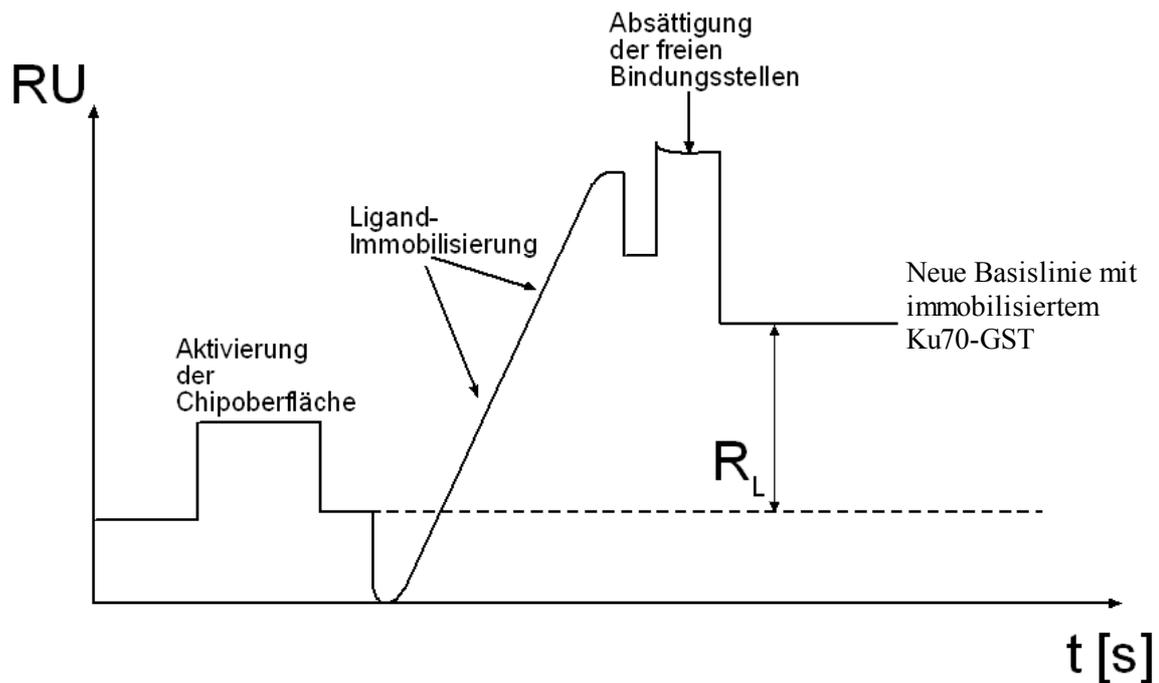


Abb. 14: Schematische Darstellung der Aktivierung der Chipoberfläche mit nachfolgender Ligand-Immobilisierung.
 R_L entspricht hier der Menge an gebundenem Liganden.

Eine Aussage über die Affinität zwischen zwei Proteinen ist nur bei einer Beladung des Chip von 500 – 1500 RU immobilisierten Proteins möglich (entspricht einer Immobilisierungsdichte von 0,5 - 1,5 ng/mm²). Oberhalb dieser Grenze tritt ein Masseffekt auf durch die dann hohe Konzentration an Komplexbildungen dicht über der Chipoberfläche. Die Genauigkeit der Kinetik-Messungen ist zudem sehr abhängig von der Reinheit des Proteins. Das an den Chip zu immobilisierende Protein sollte mehr als 10% Arginin - und Lysin-Reste besitzen, da die Kopplung des Proteins an die Chipoberfläche über eine sogenannte Aminkopplung erfolgt. Die Chipoberfläche des verwendeten CM5-Chips besteht aus einer Dextranoberfläche, welche durch die initiale Injektion eines 1:1-Gemisches aus EDC (1-Ethyl-3-[dimethylaminopropyl]-carbodiimid-HCl) und NHS (N-Hydroxysuccinimid) aktiviert wird. Die Bindung ist im nebenstehenden Reaktionsschema (Abb. 15) dargestellt.

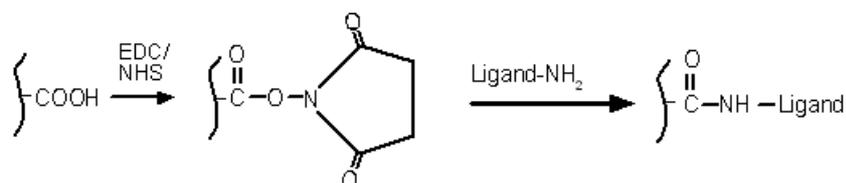


Abb. 15: Reaktionsweg als Vorbereitung für eine Amin-Kopplung auf einem Biacore (CM5)-Immobilisierungschip

4.3.1 Immobilisierung von Ku70-GST

Der Anteil von Lysin- und Arginin-Resten betrug bei dem Fusionsprotein GST-Ku70 17%. Die Beladung des Chips erfolgte bei pH 5,5, womit eine hinreichende Ladungsdichte des Fusionsproteins gegeben war ($pI = 6,18$). Der Beladungsschritt geht aus der Abbildung 16 hervor.

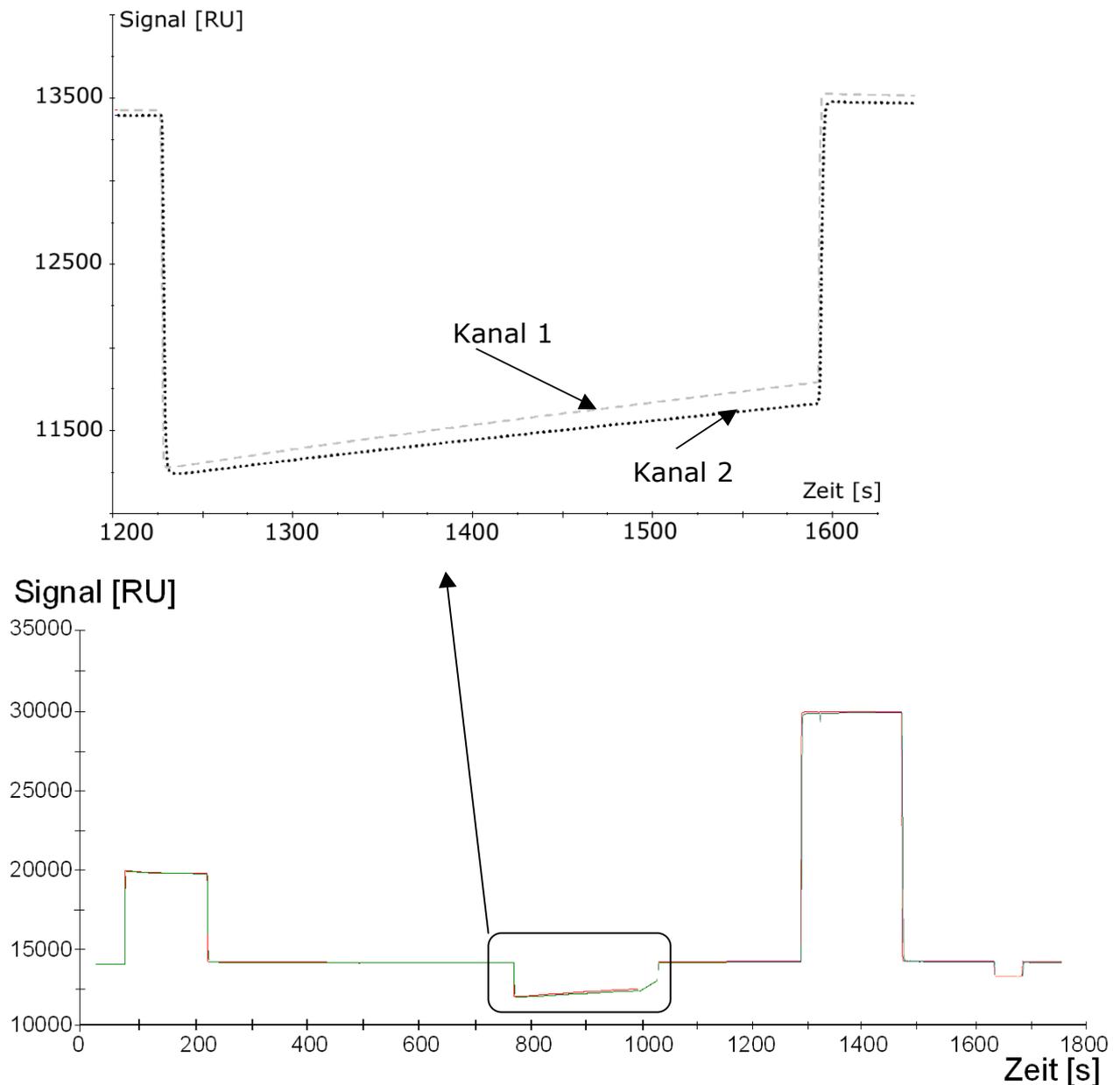


Abb. 16: Immobilisierung von Ku70-GST auf dem später verwendeten CM5-Chip.
Die einzelnen Kanäle wurden wie folgt beladen: Kanal 1: 500 RU Ku70-GST; Kanal 2: 1100 RU Ku70-GST; Kanal 3: 1100 RU BSA; Kanal 4: leer.

Die Abbildung 16 zeigt eine gleichmäßige und kontinuierliche Immobilisierung von Ku70-GST auf der Chipoberfläche. Die Basislinie des Sensogramms bleibt auch nach der Säuberung der Oberfläche mit 0,01 M HCl konstant. Diese sehr wichtige Erkenntnis zeigt eine stabile Bindung des Proteins an den Chip. Die Basislinie nach der Säuberung des Chips als abschließender Schritt der Immobilisierung wird als Bezugslinie für nachfolgende Kinetik-Messungen verwendet. Bei einem drastischen Abfall der Basislinie (>10%) hätte eine erneute Immobilisierung an einem neuen Chip durchgeführt werden müssen.

4.3.2 Bindungs-Kinetiken der verschiedenen E2F1-Deletionsmutanten

Um für die Protein-Protein-Wechselwirkung die Assoziations- (K_A) und die Dissoziationskonstanten (K_D) zu bestimmen, wurden in einem laminaren Fluss fünf verschiedene Konzentrationen des jeweiligen Proteins verwendet. Zur Vermeidung des Massetransfer-Effektes ist dabei eine Flussgeschwindigkeit von 10 $\mu\text{l}/\text{min}$ gewählt worden. Der Masse-Transfer-Effekt führt bei zu geringem Fluss durch die Ausbildung eines Konzentrationsgradienten unmittelbar über dem Chip zu einem geringeren Anstieg bzw. Abfall der Assoziations- und der Dissoziationsphase. Ku80-GST wurde hier als Positiv-Kontrolle für die Biacore-Messungen verwendet, das - bis auf die erste Transmembrandomäne - verkürzte EDG6-GST diente als Negativ-Kontrolle.

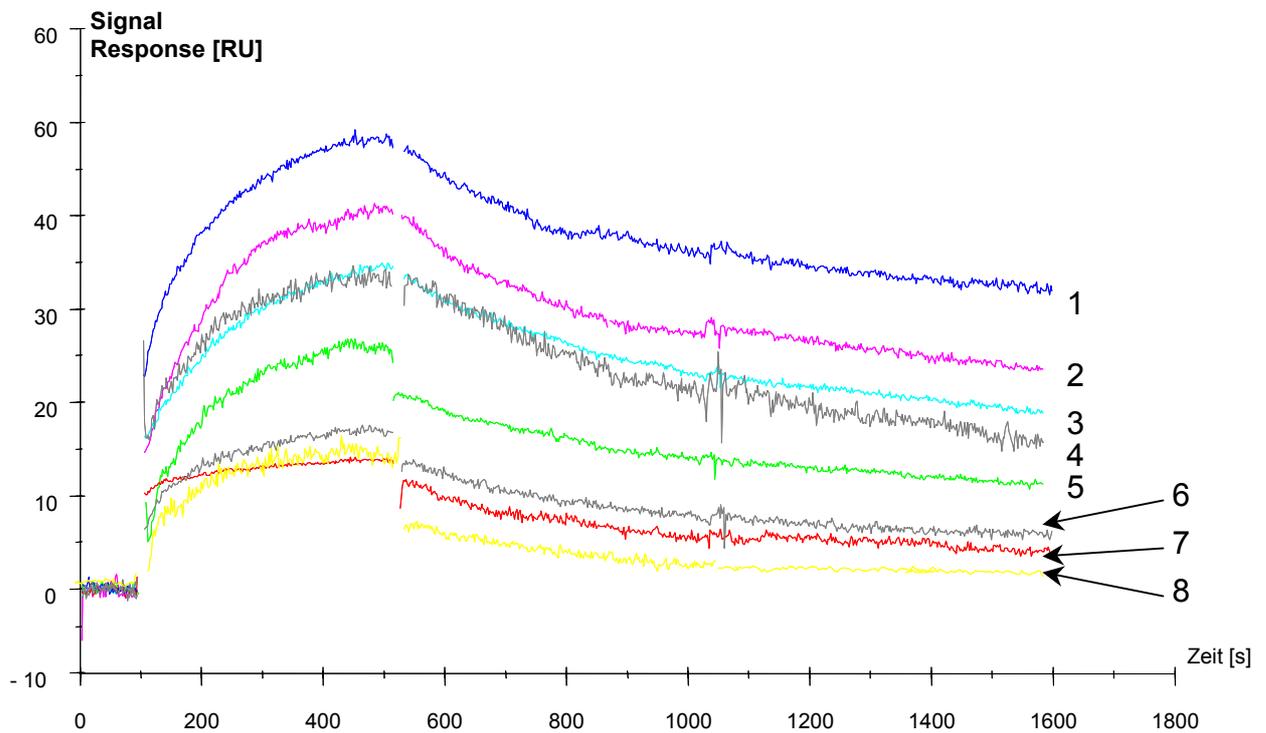


Abb. 17: Sensogramm der E2F1-His-Proteinmutanten in Interaktion mit immobilisierten Ku70-GST bei einer Analyt-Konzentration von 90 mM.

1) Ku 80; 2) E2F1-wt; 3) E2F1-GB; 4) E2F1-ML; 5) E2F1- Δ 277-301; 6) E2F1- Δ 277-350; 7) E2F1-aa 1-243; 8) EDG6, aa 1-33

Für die kinetische Analyse einer Interaktion ist es notwendig, die Konzentration des Analyten zu variieren, da die Konstanten K_A und K_D nur errechenbar und nicht direkt messbar sind. Eine direkte Bestimmung dieser Konstanten würde eine Rückkehr der Kurve auf die Basislinie erfordern, was aus Zeitgründen nicht durchführbar wäre. Die Konstanten werden daher aus den Steigungen der Assoziations- und der Dissoziationskurven errechnet. Mit steigender Konzentration steigt auch die Signalintensität. Dieser Effekt ist nachfolgend exemplarisch für die Interaktion von wtE2F1-His mit Ku70-GST dargestellt (Abb. 18):

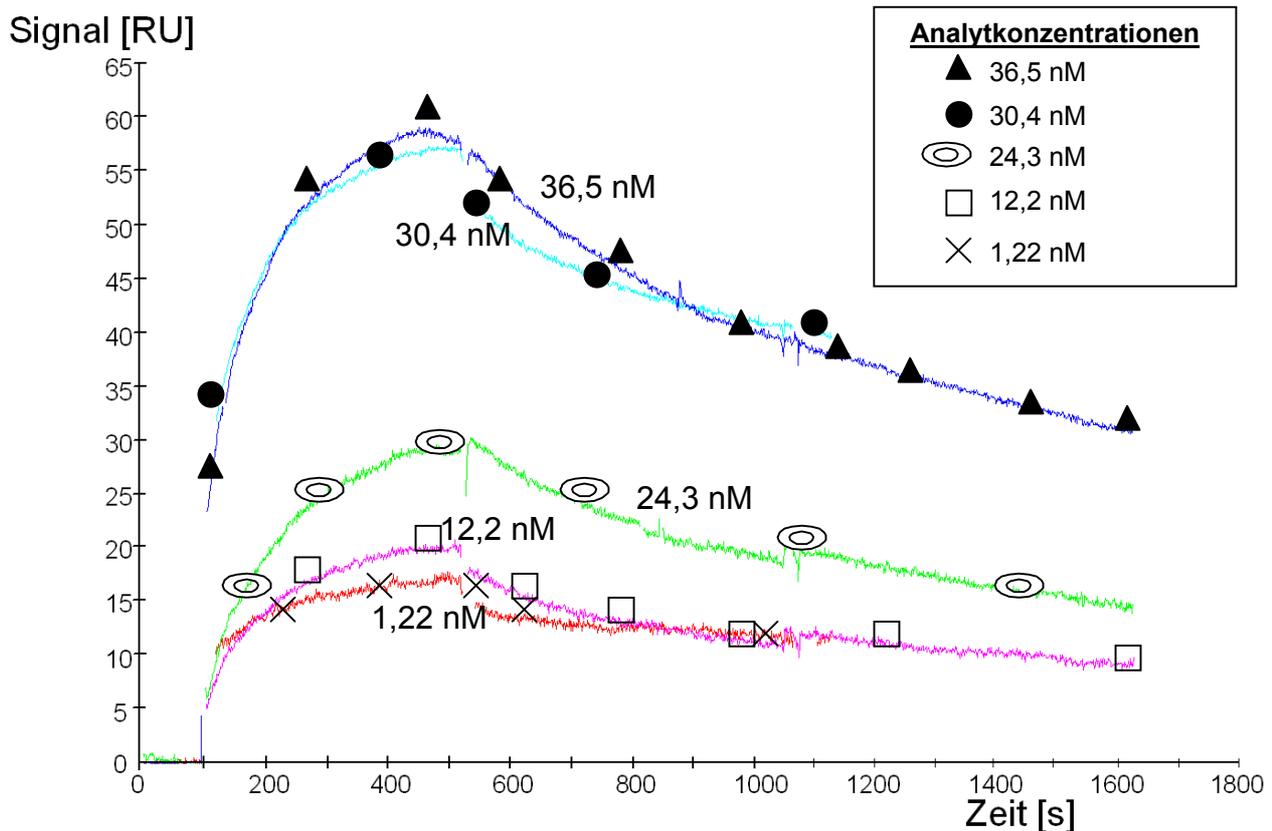


Abb. 18: Sensogramm der Interaktion von Ku70-GST (immobilisiert) mit wtE2F1-His (Analyt).

Nach der Variation der Konzentrationen für alle Analyten wurden die Sensogramme der untersuchten Protein-Protein-Wechselwirkungen mit dem Programm BiaEvaluation (Version 3.0, Fa. Biacore) ausgewertet. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 2 zusammengefasst:

Analyt	K_A [mol \cdot l $^{-1}$]	σ [mol \cdot l $^{-1}$]	K_D [l \cdot mol $^{-1}$]	σ [mol \cdot l $^{-1}$]
Ku80	$9,01 \cdot 10^9$	$1,08 \cdot 10^4$	$1,12 \cdot 10^{-9}$	$5,88 \cdot 10^{-5}$
E2F1, WT	$3,29 \cdot 10^8$	$3,48 \cdot 10^4$	$3,26 \cdot 10^{-9}$	$1,00 \cdot 10^{-5}$
E2F1, GB	$9,51 \cdot 10^7$	$6,22 \cdot 10^3$	$5,35 \cdot 10^{-8}$	$1,15 \cdot 10^{-4}$
E2F1, ML	$8,98 \cdot 10^7$	$1,03 \cdot 10^3$	$9,69 \cdot 10^{-8}$	$4,88 \cdot 10^{-2}$
E2F1- Δ 277-302	$2,06 \cdot 10^7$	$2,42 \cdot 10^3$	$3,32 \cdot 10^{-7}$	$1,10 \cdot 10^{-3}$
E2F1- Δ 277-350	$7,24 \cdot 10^6$	$4,87 \cdot 10^3$	$1,38 \cdot 10^{-6}$	$1,07 \cdot 10^{-3}$
E2F3, 1-242	$2,38 \cdot 10^5$	$1,10 \cdot 10^2$	$4,06 \cdot 10^{-5}$	$1,12 \cdot 10^{-3}$
EDG6, 1-33	$1,06 \cdot 10^5$	$2,28 \cdot 10^2$	$2,17 \cdot 10^{-5}$	$1,35 \cdot 10^{-2}$

Tabelle 2: Ergebnisse der Biacore-Analysen. Assoziations- und Dissoziationskonstanten von Ku70-Gst und den angegebenen Analyten. Die Bindungsaffinitäten wurden errechnet aus den Geschwindigkeitskonstanten k_a und k_d . Es wurde ein 1:1-Bindungsmodell zu Grunde gelegt.

Die Bindungskonstanten der verschiedenen Proteine zeigen deutliche Unterschiede in ihren Affinitäten zu Ku70 auf. So ist bei der Positiv-Kontrolle Ku80 eine außerordentlich starke Bindung festzustellen ($K_A = 9,01 \cdot 10^9$, $K_D = 1,12 \cdot 10^{-9}$), deren Stärke vergleichbar ist mit der Bindung monoklonaler Antikörper zu ihren Antigenen ($K_D = 5 \cdot 10^{-7} - 5 \cdot 10^{-10}$). Die Bindungsaffinität des Wildtyps von E2F1 zu Ku70 ist erwartungsgemäß schwächer, da eine starke Bindung zwischen diesen beiden Proteinen aufgrund der regulativen Funktionen von Ku70 und Ku80 notwendig ist. Mit einer Affinitäts-, bzw. einer Dissoziationskonstanten von $K_A = 3,29 \cdot 10^8$ und $K_D = 3,26 \cdot 10^{-9}$ wird eindeutig eine spezifische Protein-Protein-Wechselwirkung zu Ku70 bestätigt. Die Substitutionsmutanten E2F1-GB und E2F1-ML zeigen geringere Affinitäten zu Ku70 (3,5-fach bei der Mutante GB sowie 3,7-fach bei E2F1-ML im Vergleich zu E2F1-WT). Verglichen mit den Deletionsmutanten zeigt sich absolut nur ein geringer Verlust der Bindungsaffinität. Die Substitution der Aminosäuren führt demzufolge nur zu einer geringfügigen Änderung der Tertiärstruktur, die jedoch weiterhin eine Bindung mit hoher Affinität zulässt.

Wesentlich deutlicher zeigt sich der Verlust der Bindungsaffinität zu Ku70 bei der Deletionsmutante E2F1- Δ 277-302, bei der die stark konservierte Region der Marked Box deletiert wurde ($K_A = 2,06 \cdot 10^7$; $K_D = 3,32 \cdot 10^{-7}$). Die Höhe der Bindungsaffinität ist im Vergleich zu E2F1-WT 16-fach schwächer. Bei der Deletionsmutante E2F1- Δ 277-350, bei der zu der stark konservierten Region der Marked Box auch C-terminal flankierende Bereiche deletiert wurden, verringert sich die Affinität sogar um das 45-fache. Aus diesem Ergebnis kann man die Schlussfolgerung ableiten, dass die C-terminal angrenzenden Bereiche einen stabilisierenden Einfluss auf die Ku70/E2F-Wechselwirkung besitzen. Die Deletionsmutante E2F3-1-243 besitzt keine Bindungsspezifität gegenüber Ku70, die Affinität ist – im Vergleich zum Wildtyp von E2F1 – 1400-fach schwächer. Hiermit konnte festgestellt werden, dass der N-terminale Bereich von E2F1 für die Bindung an Ku70 ohne Bedeutung ist. Der N-Terminus entspricht in seinem Bindungsverhalten nahezu der Negativ-Kontrolle EDG6-1-33, die mit einer Assoziationskonstanten von $K_A = 1,06 \cdot 10^5$ und $K_D =$

$2,17 \cdot 10^{-5}$ mit Ku70 nicht wechselwirkt. Durch diese in vitro-Untersuchungen konnte somit nicht nur eindeutig der Beweis erbracht werden, dass die Marked-Box von E2F1 für die Bindung zu Ku70 essentiell ist, sondern auch, dass die Interaktion hochspezifisch ist.

4.4 Phosphorylierung von E2F1 durch die DNA-PK

Die DNA-PK ist ein Mitglied der PIKL-Proteinfamilie. Weitere Mitglieder dieser Gruppe sind ATM sowie die Kinase ATR (Vassilev et al. 1998). Unlängst konnte gezeigt werden, dass ATM sowie ATR den N-Terminus von E2F1 phosphorylieren kann und somit involviert sind in der Regulation der E2F1-Aktivität in Folge von DNA-Schäden, nicht jedoch bei E2F2 oder E2F3 (Lin et al. 2001). Für die DNA-PK ist bisher nur bekannt, dass sie in Anwesenheit von DNA eine Reihe von Transkriptionsfaktoren in vitro phosphoryliert (p53, SP-1). Die vorangegangenen Experimente zeigen deutlich eine Interaktion von E2F1 zu den beiden Untereinheiten der DNA-PK, Ku70 und Ku80. Die Annahme einer Phosphorylierung von E2F1 durch die DNA-PK liegt daher nahe und ist Gegenstand der nachfolgend gezeigten Experimente. Nach der unter 3.3.10 beschriebenen Methode, die Phosphorylierung von Proteinen durch die DNA-PK in Anwesenheit von DNA, wurden folgende E2F1-Deletionsmutanten verwendet:

- I) E2F1- Δ 277-302, Δ 413-437
- II) E2F1- Δ 277-312
- III) E2F1- Δ 277-350

Die Kinasierung eines Kontroll-Proteins (ein p53-Fragment) in Anwesenheit von DNA diente als Kontrolle und als Maß für die Aktivität der DNA-PK. Als DNA für die Katalyse wurde ein bidirektionaler Histonpromoter (pCL-1 A/B) verwendet, aus dem die Promoterregion isoliert worden war. Die jeweiligen Versuchsansätze ohne DNA dienten für das entsprechende Protein als direkten Vergleich, da dort nur die basale

Kinase-Aktivität der DNA-PK vorhanden war und die radioaktiv markierten Phosphatgruppen nicht katalytisch auf das Protein übertragen werden können. Die Ergebnisse sind in Abb. 19 dargestellt.

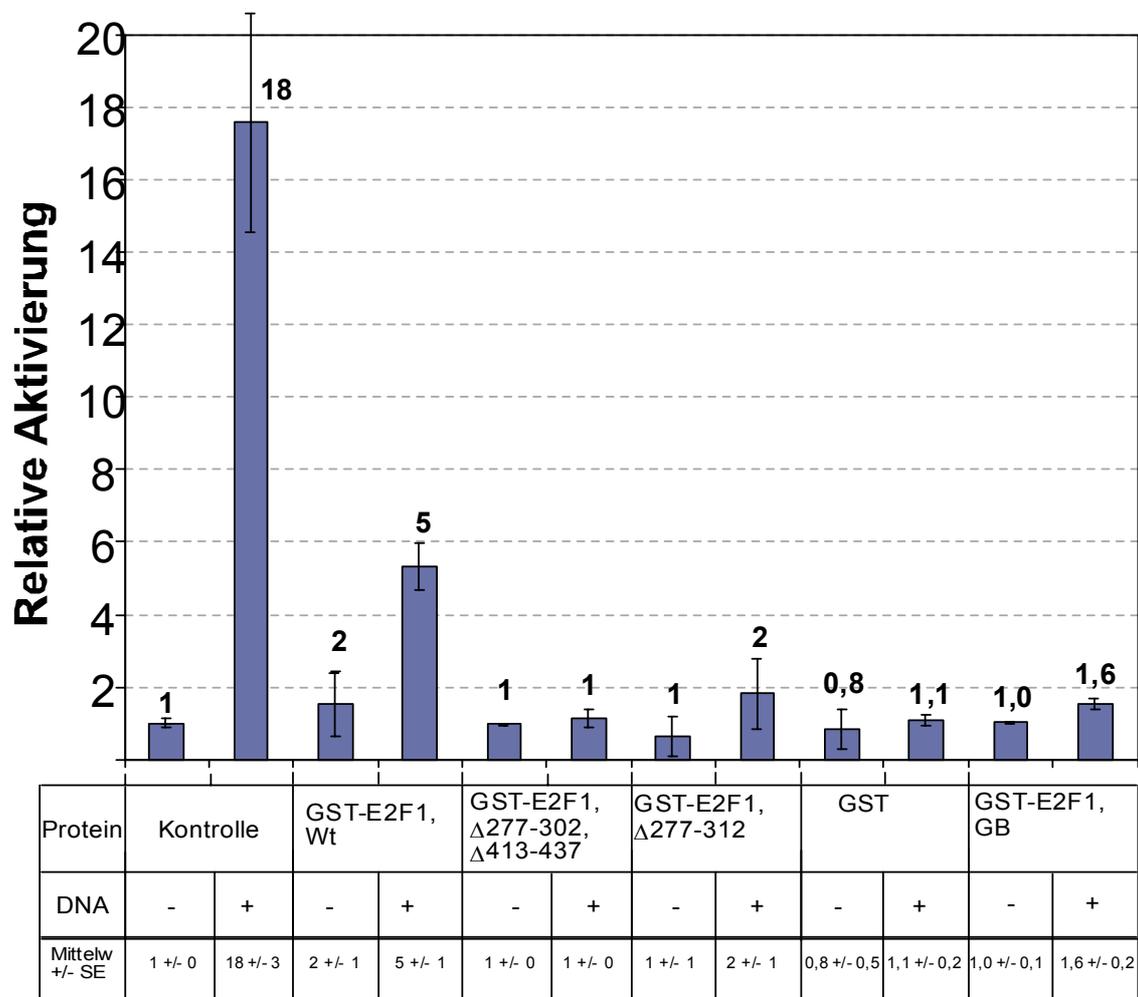


Abb. 19: In vitro-Nachweis der Kinasierung von GST-wtE2F1 und GST-E2F1-Deletionsmutanten. Dargestellt wird hier die relative Phosphorylierung von GST-E2F-1 Fusionsproteine durch die DNA-PK, berechnet aus den Messwerten des Szintillationsmessgeräts. Die Positiv-Kontrolle ist ein von Protein p53 abgeleitetes Polypeptidfragment. (Mittelwerte \pm SE; $n \geq 3$).

Die oben dargestellten Werte ergaben sich aus dem Quotient von Szintillations-Messwerte des Proteins zu denen der Kontrolle (ohne DNA). Die Versuche zeigten eine deutliche Phosphorylierung des wtE2F1-Proteins durch die DNA-PK. Die relative Phosphorylierung des Wildtyp-Proteins – in Anwesenheit der Marked Box – war im Vergleich zur Kontrolle um Faktor fünf höher. Weder die Deletionsmutante

E2F1- Δ 277-312 noch die Substitutionsmutante E2F1, GB zeigten in den Versuchen relevante Phosphorylierungswerte. Auch die Deletionsmutante E2F1- Δ 277-302, Δ 413-437, die in einem kleineren Bereich von 25 Aminosäuren der Marked Box deletiert ist, zeigte keine über dem Kontrollwert hinausgehende Phosphorylierung des Proteins durch die DNA-PK. Die – im Vergleich zu E2F1 – wesentlich höhere Kinasierung des p53-Polypeptids ergibt sich aus der im Vergleich zu den gereinigten E2F-Proteinen höheren Molarität des eingesetzten p53-Peptids sowie seiner Optimierung für den Test.

Hierdurch konnte eindeutig belegt werden, dass E2F1 ein Substrat der DNA-PK dargestellt. Ferner wurde durch die verwendeten Mutanten gezeigt, dass für die Kinasierung von E2F1 durch die DNA-PK die konservierte Region der Marked Box absolut notwendig ist und die Phosphorylierung nur in diesem Bereich erfolgt. Die Ergebnisse der Deletionsmutanten E2F1- Δ 277-302, Δ 413-437 und E2F1- Δ 277-312 zeigten auch auf, dass die Pocketprotein-Domäne für die Kinasierung von E2F1 nicht erforderlich ist. Desweiteren konnten die Aminosäuren Ser 285 und Ser 288 als Phosphorylierungsstelle der DNA-PK identifiziert werden.

In der nachfolgenden Abbildung (Abb. 20) sind die möglichen Phosphorylierungsstellen dargestellt:

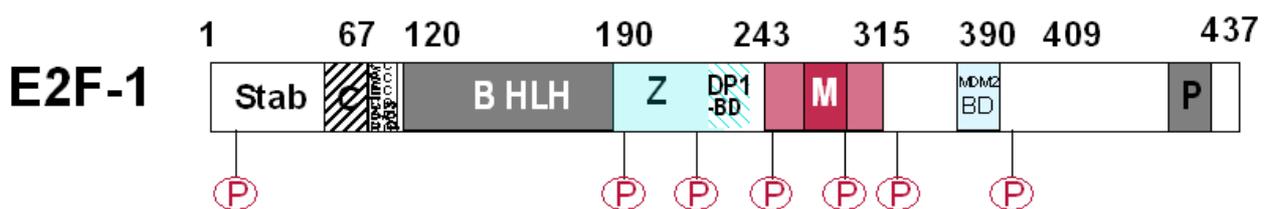


Abb. 20: Potentielle Phosphorylierungsstellen von E2F1

4.5 Zellzyklus-Experimente

Eine Blockade des Zellzyklus-Fortschritts nach der Entstehung von DNA-Schäden ist von entscheidender Bedeutung für die Erhaltung eines intakten Zellsystems. Die Art des Regulationsmusters, vor allem aber, welche Proteine daran beteiligt sind, ist abhängig von der Zellzyklusphase. Die Untereinheiten der DNA-PK, Ku70 und Ku80, sind hierbei notwendig für die Reparatur von DNA-Einzel- und Doppelstrangbrüchen. Eine Beteiligung dieser Proteine ist bisher nur bei der G₂-Phase bekannt. Eine Regulation, genauer eine Blockierung des Zellzyklus-Fortschritts in der G₁-Phase nach der Induktion von DNA-Schäden konnte für Ku bisher nicht nachgewiesen werden. Um so größere Bedeutung gewinnen daher die bisher vorgestellten Ergebnisse, die eine Protein-Protein-Interaktion zwischen Ku und E2F nachweisen. Die beschriebenen regulatorischen Funktionen von E2F1 sowie Ku70 und Ku80 lassen vermuten, dass die gefundene Interaktion zwischen den regulatorischen Untereinheiten der DNA-PK und E2F1 im eukaryotischen System physiologisch relevant ist. Dies gilt es hier zu beweisen.

Die Interaktion stellt die Regulation eines Transkriptionsfaktors durch ein Reparaturprotein dar. Zu vermuten wäre – in Anlehnung an den Regulationsmechanismus über pRB – eine reprimierende Funktion dieses Proteinkomplexes.

Es war deshalb wichtig ein Verfahren zu entwickeln, um die Interaktion von E2F mit der DNA-PK biochemisch und funktionell genauer zu charakterisieren.

Frühere Untersuchungen von (Dahm-Daphi et al. 1998) und (Dikomey et al. 1998) zeigten, dass ein unterschiedlicher Grad der Bestrahlung unterschiedliche Prozesse in den Zellen initiiert. So wächst bei hohen Bestrahlungswerten die Apoptoserate, während bei niedrigen Bestrahlungswerten ausschließlich DNA-Schäden erzeugt werden. In diesem Zusammenhang ist aber auch die Wahl der Strahlungsart entscheidend. Während durch die Bestrahlung mit UV-Strahlen nur Einzelstrangbrüche mit sogenannten CPDs (engl., cyclobutane pyrimidine dimers) erzeugt werden, führt die Bestrahlung mit Gamma-Strahlen zu DNA-Doppelstrangbrüchen.

Wie zuvor im Abschnitt 4.1.1 beschrieben, wurde im Yeast-Two-Hybrid-Screen neben E2F3 auch E2F1 als Interaktionspartner für Ku70 identifiziert (Zitat Diss. G. Kaba). E2F1 besitzt - im Vergleich zu E2F3 - eine 3,5-fach höhere Induktion der S-Phase (Helin et al. 1993) und durch den „dualen“ Charakter (siehe auch Kapitel 1.2) eine dominantere Stellung im Zellzyklus. Die nachfolgenden Zellzyklus-Untersuchungen wurden daher mit E2F1 durchgeführt.

Um die physiologische Bedeutung und die Auswirkungen der Interaktion von E2F1 und Ku70/80 zu untersuchen, wurden CHOK-Zellen mit sowie ohne Ku in Zellzyklus-Experimenten untersucht. Die Zellen wurden mit E2F1-Wildtyp- und E2F1-Deletionsmutanten-, sowie Ku70- und Ku80-Plasmiden transfiziert und nach γ -Bestrahlung in Transkriptionsanalysen und Zellzyklusphasen-Bestimmungen untersucht.

Als direkten Vergleich zu den bestrahlten Zellen diente eine parallel mitgeführte Versuchsreihe unter Verwendung unbestrahlter Zellen. Innerhalb dieser Versuchsreihen diente jeweils ein Transfektionsansatz mit einer E2F1-Deletionsmutante ohne die Marked Box als Vergleichsansatz. Ergänzend zu den Zellzyklus-Experimenten bei CHO-K₁-Zellen mit γ -Strahlen wurden gleiche Experimente auch mit den Ku-defizienten XRS1-Zellen durchgeführt, die jedoch keine Aussagen zuließen (Daten hier nicht gezeigt). Die FACS-Messungen wurden durch das Software-Programm Modfit 2.0 – bezogen auf die Zellzyklusphasen – analysiert (Abb. 26).

4.5.1 Überprüfung der Promoter-Aktivierung

Um die optimale Aktivierung des verwendeten Promoters zu garantieren, wurde vor den eigentlichen Zellzyklus-Experimenten in regelmäßigen Abständen die Aktivierung des Reporters getestet. Hierzu wurden nicht-synchronisierte CHO-K₁-Zellen transfiziert (Kap. 3.4.3.1) und die Luciferase-Aktivität (Kap. 3.5.2.1) bestimmt. Um eine optimale transkriptionelle Aktivität von E2F1 zu erreichen, wurde ein DP1:CMV-Konstrukt kotransfiziert. Im Kontrollansatz wurde ausschließlich der jeweilige Promoter transfiziert. Das Ergebnis ist im Diagramm (Abb. 21) dargestellt:

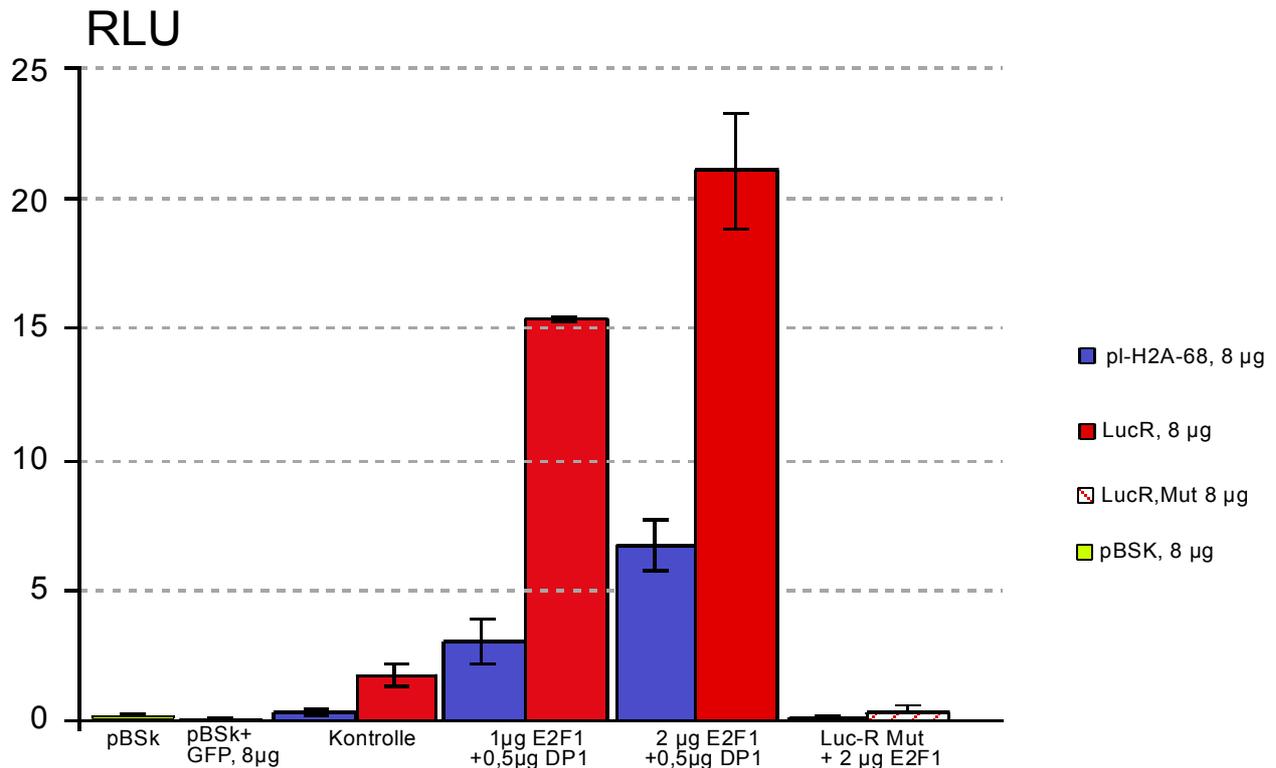


Abb. 21: Ergebnisse der dualen Luciferase-Messung nach transienter Transfektion. Die Abszisse zeigt die relative Aktivierung im Vergleich zur Negativ-Kontrolle.

Der Promoter pI-H2A-68 besitzt eine einzige E2F-Promotersequenz von 68 Nukleotiden. Dieser wurde für die – vor dieser Arbeit durchgeführten – Transfektions-Experimente verwendet (Zitat, Aufzeichnungen v. G. Kaba). Er besitzt eine geringere transkriptionelle Aktivität als der Promoter LucR der drei aufeinander folgende E2F-Bindungsstellen besitzt. Bei dem Promoter LucR-Mut sind alle drei E2F-Bindungsstellen mutiert und ermöglichen somit keine Bindung von E2F-Proteinen.

Die Abb. 21 zeigt bei der Transfektion mit 2 µg E2F1 und 0,5 µg DP1 eine mehr als 8-fache Aktivierung des E2F-Luc-Promoters im Vergleich zum Transfektionsansatz ohne E2F1/DP1, die Aktivierung relativ zum Promoter pI-H2A-68 ist fast 3,5-mal stärker. Nach der Transfektion mit 1 µg E2F1 und 0,5 µg DP1 war die Promoter-Aktivierung immerhin schon über 6-fach höher als ohne zusätzliche E2F1-Transfektion (Kontrolle).

Die transkriptionelle Aktivität des Promoters ist proportional höher (Faktor drei) als der Promoter pH2A-68. Aufgrund des wesentlich höheren transkriptionellen Aktivierungspotentials gegenüber dem Promoter pH2A-68 wurde für die Zellzyklus-Experimente der Promoter LucR verwendet.

Für die Zellzyklus-Experimente wurde die Transfektion mit dem LucR-Promoter und 2µg E2F1 sowie 0,5µg DP1 gewählt. Der Unterschied in der Aktivierung des Promoters LucR zur Aktivierung von pH2A-68 ist dort zwar geringer, jedoch ist die absolute Aktivierung des LucR-Promoters weitaus höher. Daher wurde dieser Transfektionsansatz gewählt, um eine möglichst effiziente Aktivierung des E2F-abhängigen Promoters zu garantieren. Zudem zeigten Vorversuche in Zellzyklus-Experimenten generell erheblich niedrigere Luciferase-Messwerte, obwohl die synchronisierten Zellen einheitlich in die S-Phase eintreten, somit eine einheitliche Aktivierung des E2F-abhängigen Promoter erfolgte.

4.5.2 Synchronisation der Zellpopulationen

Normal proliferierende Zellen befinden sich in unterschiedlichen Zellzyklusphasen. Durchschnittlich setzen sich die Zellpopulationen aus folgenden Anteilen - je nach Zelltyp mit mehr oder minder großen Abweichungen- zusammen:

G1: ~ 48 %
S: ~ 32 %
G2: ~ 15 %
M: ~ 5 %

Für die zu untersuchende Thematik ist eine einheitliche Zellpopulation in der späten G₁-Phase erforderlich. Dies wurde durch die Inkubation mit dem Reagenz L-Mimosin erreicht.

Denkbar wäre auch eine Synchronisation durch Cyclosporin A gewesen, jedoch bleibt die Effizienz der Synchronisation hinter der von L-Mimosin zurück. Der Wirkmechanismus bzw. die Zielproteine der Reagenzien schließt die Verwendung von Wortmannin aus; gleiches gilt so auch für Staurosporin. Als einen weiteren Ansatz zur Synchronisation der Zellen wurde das Verfahren von Darroudi and Natarajan (1987) zum Beginn der Untersuchungen herangezogen (Daten nicht

gezeigt). Bei dieser Methode werden die Zellen durch einen zweitägigen Inkubationsschritt in FKS-freiem Medium in der G₁-Phase arretiert („aushungern“). Diese Methode ist zwar sehr schonend für die Zellen und schließt etwaige Störungen des Transkriptionsapparates durch ein Reagenz aus, jedoch erwies sich diese Methode als sehr ineffizient. Sie führt zu einer unscharfen Synchronisation. Zudem erforderte dieses Verfahren eine zu hohe Verdünnung bei der Aussaat von CHO-K₁- und XRS1-Zellen, was häufig zum Absterben der Zellen führte.

Die Abb. 22 zeigt repräsentativ die nahezu vollständige Synchronisation von CHO-K₁-Zellen in der späten G₁-Phase im Vergleich zu einer unsynchronisierten Zellpopulation.

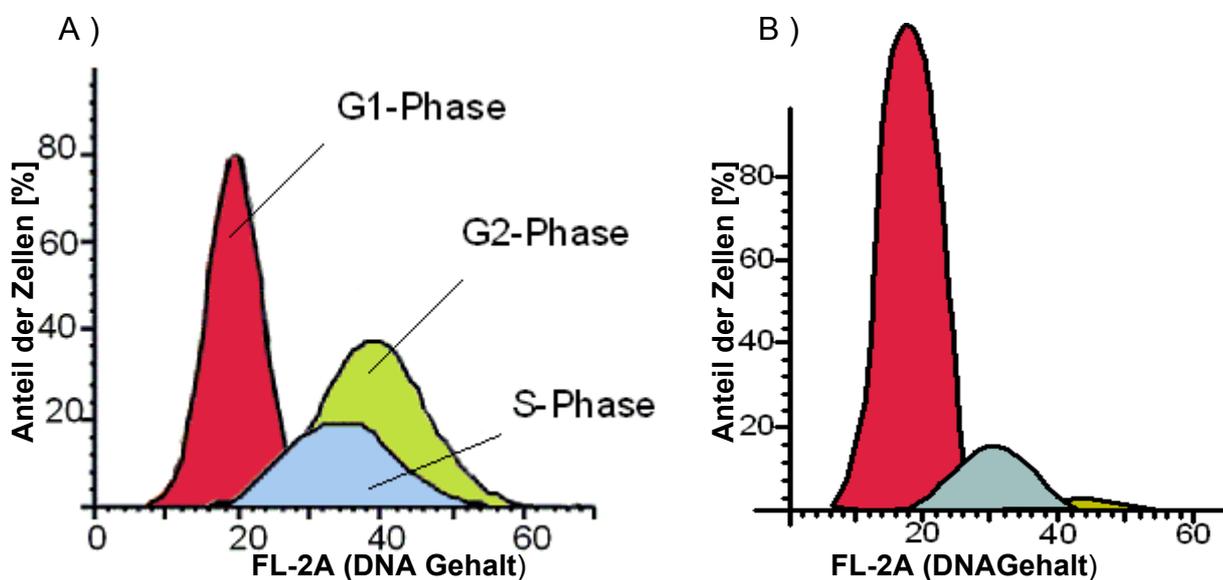


Abb. 22: Schematische Darstellung der Zellzyklusphasen-Verteilung bei CHO-K1-Zellen.

A) Asynchrone, exponentiell wachsende Zellen; B) In der späten G₁-Phase mit Mimosin behandelte synchronisierte Zellen.

Die Bestimmung der Zellzyklus-Phasen erfolgt anhand der DNA. Die mit Propidiumjodid gefärbte DNA zeigt durch ihre – in den einzelnen Phasen – unterschiedliche Form (einzeln-/doppelsträngig) einen dem Zellzyklus entsprechenden Fortschritt und eine Erhöhung von FL-2A. Die Überlappung – und somit genauere Bestimmung – der einzelnen Phasen wird daher über diesem Weg identifiziert. Das Auswertungs-Programm ermöglichte die genaue Bestimmung von fünf Subphasen innerhalb der S-Phase. Der Anteil an Zellen in der S-Phase bei mit Mimosin synchronisierten Zellen bezieht sich ausschließlich auf die erste Subphase

der S-Phase. Es konnten nahezu 95% aller Zellen durch Mimosin synchronisiert werden.

4.5.3 Bestimmung der optimalen Bestrahlungsmenge

Die Bestrahlung der Zellen erfolgte direkt in den 21 cm² Zellkultur-Schalen. Für die Bestrahlung diente ein eigens hierfür ausgewiesenes Gerät mit einer ⁶⁰Co-Quelle. Die Zellen wurden für die Bestimmung der optimalen Bestrahlungsmenge zuvor mit einem Kontrollplasmid transfiziert und synchronisiert. Die Bestrahlung der Zellen erfolgte fünf Stunden nach dem Release (Wiedereintritt in den Zellzyklus), weitere drei Stunden später wurden die Zellen geerntet. Das Ergebnis zeigt die Abb. 23.

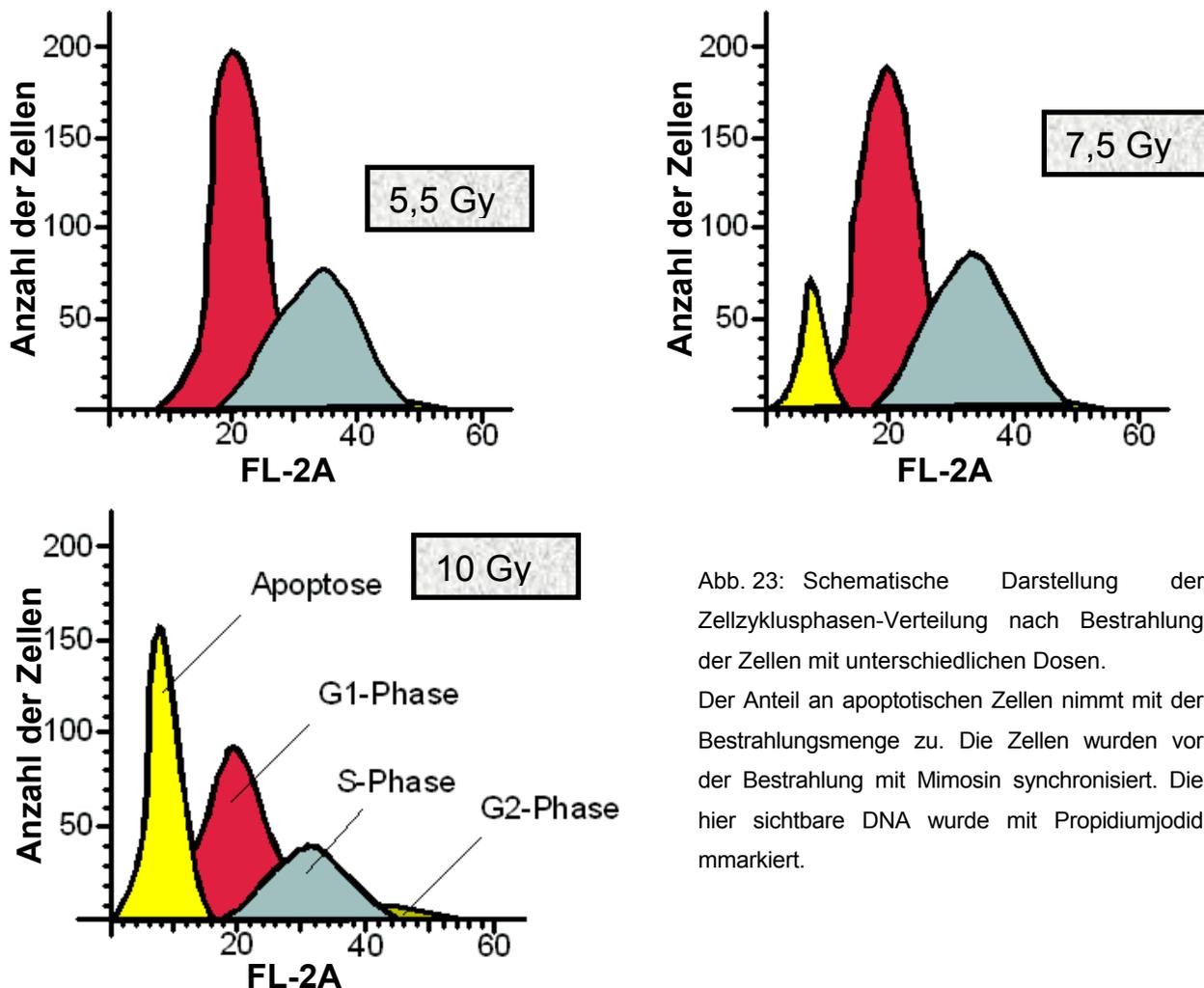


Abb. 23: Schematische Darstellung der Zellzyklusphasen-Verteilung nach Bestrahlung der Zellen mit unterschiedlichen Dosen.

Der Anteil an apoptotischen Zellen nimmt mit der Bestrahlungsmenge zu. Die Zellen wurden vor der Bestrahlung mit Mimosin synchronisiert. Die hier sichtbare DNA wurde mit Propidiumjodid markiert.

Schon die γ -Bestrahlungsmenge von 7,5 Gy führte bei CHO-K₁-Zellen zu einer – wenn auch geringfügigen – im Hinblick auf die Fragestellung unerwünschten Induktion von Apoptose (7 %). Die Erhöhung der γ -Bestrahlungsmenge auf 10 Gy

zeigte eine weitere, deutliche Erhöhung der Apoptoserate (26 %). Im Kontext einer Transfektionsrate von ungefähr 40% würde dies zu einer weiteren Reduktion der im Zellzyklus-Experiment generell niedrigen Zellzahlen erfolgreich transfizierter Zellen führen. Überdies unterliegt die Induktion von Apoptose im Vergleich zu DNA-Reparaturmechanismen anderen Regulationsmechanismen (Pierce et al. 1999). Als Beispiel soll hier die Erhöhung der DNA-Bindungsfähigkeit von E2F1 als Induktions-Vorstufe von Apoptose erwähnt sein (Kowalik et al. 1995). Um eine niedrige Apoptoserate, aber eine ausreichende Anzahl von DNA-Doppelstrang-Brüchen hervorzurufen, wurden die Zellzyklus-Experimente mit 5 Gy durchgeführt. Frühere Arbeiten von (Huang and Claycamp 1993) zeigten auch hier schon eine hohe Induktion von DNA-Brüchen.

4.5.4 Transfektionen für den Zellzyklus

Die proliferierenden Zellen wurden bei einer Konfluenz von ungefähr 70 % transfiziert. Hierzu wurden die Zellen zwei Stunden lang mit FKS-freiem Minimalmedium inkubiert („ausgehungert“). Erfahrungen in Vorversuchen haben gezeigt, dass hierdurch die Zellen effizienter DNA inkorporieren und die Transfektionsrate somit erhöht wird. Die Zellen wurden anschließend für 24 h mit folgenden Plasmid-Ansätzen transfiziert:

- 1) pBSK (Kontrolle)
- 2) E2F1-wt + DP1
- 3) E2F1-wt + DP1 + Ku70 + Ku80
- 4) E2F1- Δ 277-350 + DP1 + Ku70 + Ku80
- 5) Ku70 + Ku80

Die angeführten Transfektionsansätze wurden zusätzlich mit dem Reporter LucR-Wt kotransfiziert. Des weiteren wurden die Zellen mit dem Konstrukt des Oberflächen-Antigens H-2K^K (Maus) transfiziert. Dies ermöglicht eine eindeutige Identifizierung der positiv transfizierten Zellen durch einen FITC-markierten Antikörper in den FACS-Analysen.

4.5.5 Kontrolle der Koexpression des MHC-Moleküls auf eine E2F-unabhängige Ku70-Expression

Die Kotransfektion der Versuchsansätze mit dem Oberflächen-Antigen H-2K^K (Maus) ermöglichte eine eindeutige Identifizierung der positiv transfizierten Zellen durch einen FITC-markierten Antikörper in den FACS-Analysen. Zellen, die nicht oder nur gering transfiziert wurden, wiesen nur eine sehr geringe FITC-Signalintensität auf (s. Abb 24).

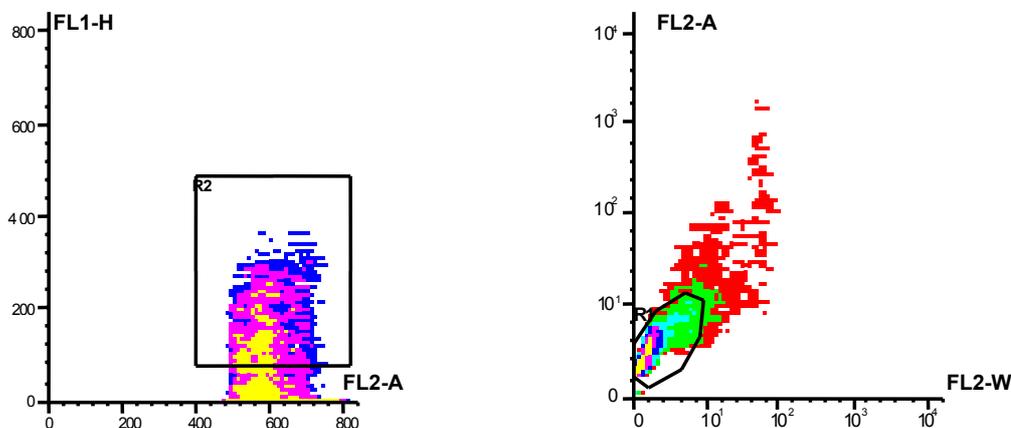


Abb. 24: Darstellung einer FACS-Messung nach einem Zellzyklus-Experiment.

Erfolgreich transfizierte Zellen werden über eine Doppelfärbung mit einer zuvor festgelegten Messeinstellung identifiziert (siehe Fenster). Hierbei wurde sowohl auf die Globularität (SSC über FSC) als auch auf die FITC-positiven Zellen geachtet. Die Doppelfärbung der Zellen erfolgte für Laserkanal 1 durch einen FITC-markierten Ak, für den Laserkanal 2 durch Propidiumiodid.

Um sicherzustellen, dass keine E2F-unabhängige Beeinflussung der MHCII-Expression durch Ku70 erfolgt, wurde bei den Transfektionsansätzen mit und ohne Ku70 sowie mit und ohne E2F1 transfiziert. Zusätzlich wurde der Parallel-Ansatz bestrahlt. Ein repräsentatives Beispiel zeigt die Abb. 25:

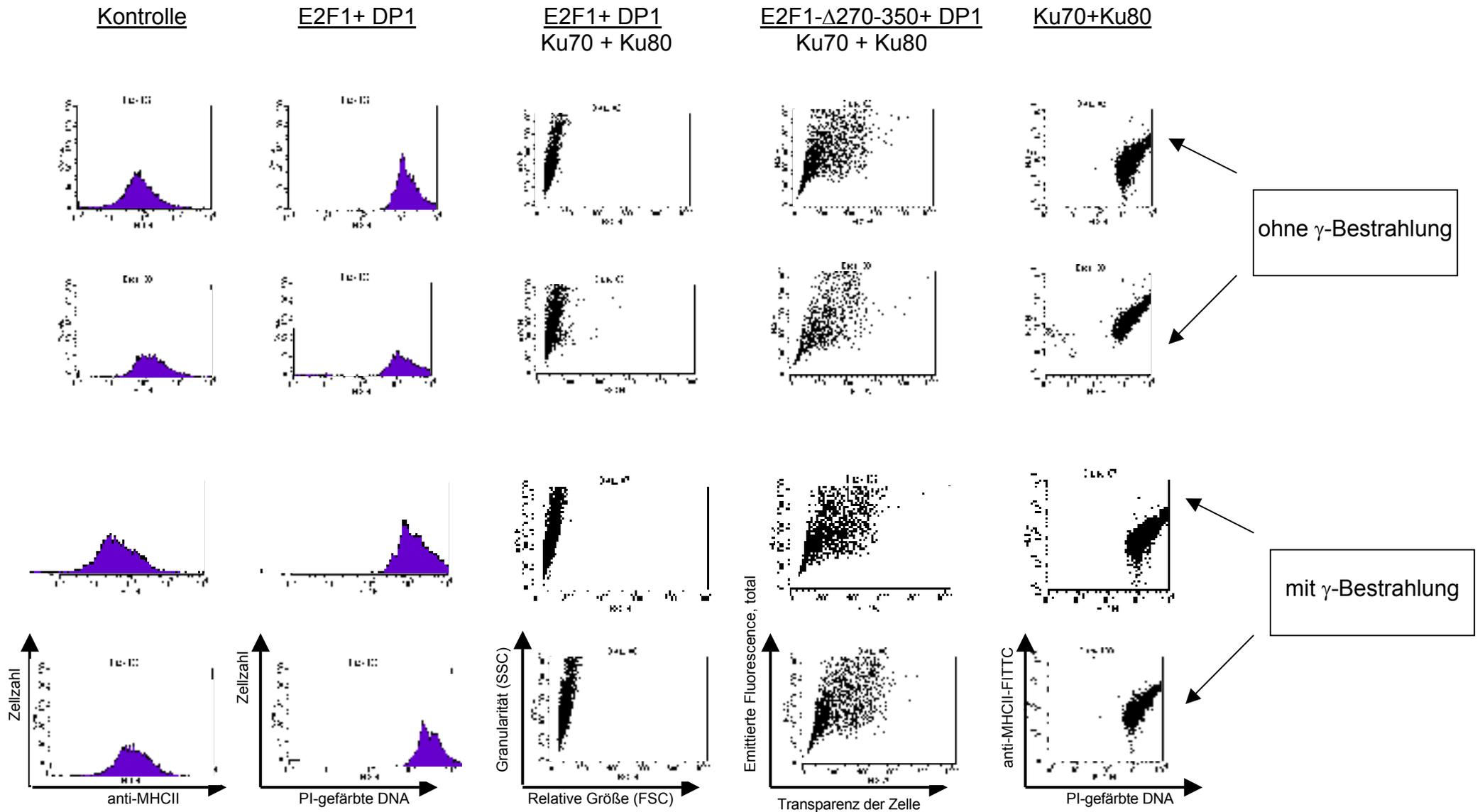


Abb. 25: Beispiel von Diagrammen am FACS-Gerät nach erfolgten Zellzyklus-Experiment und Doppelfärbung der Zellen.

Die in Abb. 25 dargestellten Diagramme zeigen die repräsentativen Ergebnisse von Vorversuchen für die Zellzyklus-Experimente nach Transfektion, Synchronisation (durch Mimosin) und Bestrahlung mit anschließendem Release durch den Austausch von Mimosin-Lösung mit Serumzugabe.

Die Abbildungen von Zellanzahl über FL1-H zeigt die Anzahl FITC-markierter Zellen. Anhand der nahezu identischen Anzahl von Zellen zeigt sich zwischen den beiden Transfektionsansätzen eine gleich hohe Koexpression des MHC-Moleküls bei E2F-unabhängiger Ku70-Expression.

Dies zeigt, dass die Expression von Ku70 und der transkriptionell repressive Charakter von Ku70 nach Bestrahlung keinen negativen Einfluss auf die Gleichmäßigkeit der MHC-Expression besitzt.

4.5.6 Zellzyklus-Verhalten bei unbestrahlten Zellen

Eine wesentliche Grundvoraussetzung für erfolgreiche Zellzyklus-Experimente ist die Verwendung von eukaryotischen Zellen, die sich in niedriger Passage nach dem Auftauen in der Zellkultur befinden.

Die Experimente an bestrahlten und unbestrahlten Zellen wurden parallel durchgeführt, um den (zeitlichen) Effekt der Bestrahlung beobachten zu können.

Die CHO-K₁-Zellen zeichneten sich im Vergleich zu den Ku-defizienten XRS1-Zellen (Daten nicht gezeigt) durch ein etwas schnelleres Wachstum aus. XRS1-Zellen zeigten eine Neigung zur Kolonie-Bildung, was die Effizienz der Transfektion etwas herabsetzte.

Die nachfolgenden Diagramme (Abb. 27 und Abb. 28) sind auf der Abszisse mit $t = 20$ h begrenzt. Das letzte Aliquot des jeweiligen Ansatzes wurde nach 30 h genommen. Dieses hatte jedoch nur die Funktion der Überprüfung auf den Wiedereintritt in den nächsten Zellzyklus. Da der zeitliche Zwischenraum zum vorhergehenden Wert sehr hoch ist, darf jedoch keine Interpolation zum letzten Wert erfolgen. Der Zeitpunkt $t = 0$ h entspricht im zeitlichen Verlauf dem Ersatz des Mimosin-haltigen (FKS-freien) Medium durch normales Kulturmedium.

Die unbestrahlten Zellen verblieben in der Zeit, die für die Bestrahlung der anderen Hälfte der Zellen notwendig war, im Brutschrank. Es ergab sich ein zeitlicher Vorsprung im Zellzyklus-Fortschritt gegenüber den Ansätzen bestrahlter Zellen von durchschnittlich fünf Stunden, der bei allen Ansätzen erkennbar ist. Dies kann u. a. in der unterbrochenen Inkubation der bestrahlten Zellen liegen. Zum besseren Verständnis des Arbeitsablaufes soll die Abb. 26 dienen:

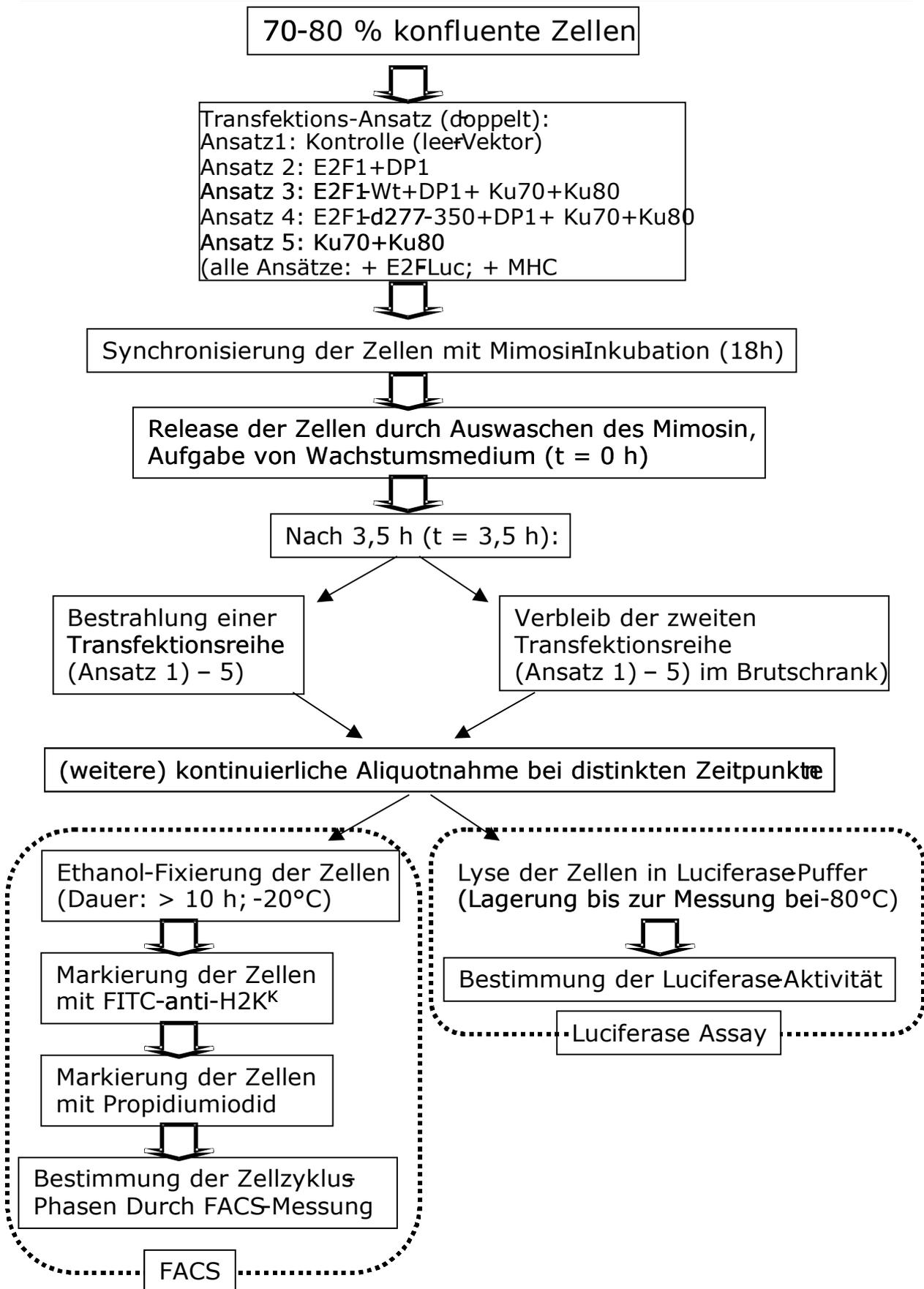


Abb. 26: Flowchart für die Zellzyklus-Experimente

4.5.8.2 CHO-K1-Zellen

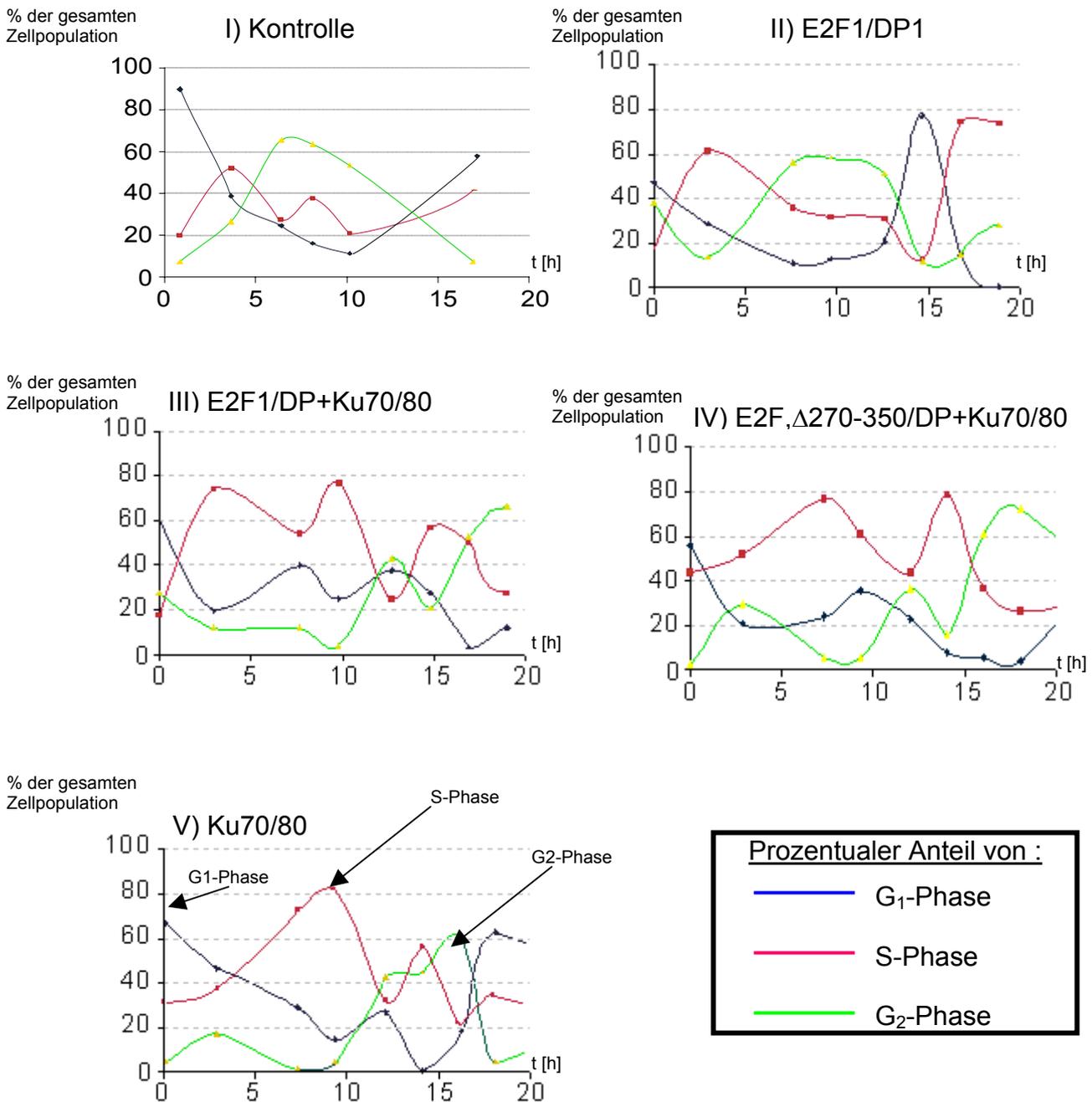


Abb. 27: Darstellung der Zellzyklusphasen-Verteilung von CHO-K1 nach transienter Transfektion mit verschiedenen Ansätzen (I-V)) ohne Bestrahlung. Die dargestellten Ergebnisse zeigen einen von vier Versuchen. Auf eine Mittelwertbildung musste aufgrund der zahlreichen Parameter, die den Versuchsverlauf beeinflussen (Alter der Zellen, Konfluenzrate, Transfektionsrate) verzichtet werden. Entscheidende Resultate – wie der Abschluss der einzelnen Phasen sowie der Wiedereintritt – stimmten jedoch überein. Die Abweichung betrug $8\% \pm 4\%$. Nach 36 h wurde eine abschließende Probe generiert, in der die Zellen auf einen Wiedereintritt in die G₁-Phase untersucht wurden (die Diagramme wurden zur besseren Übersichtlichkeit auf $t = 20$ h begrenzt).

Der Kontroll-Ansatz (I, pBSK) zeigt den Verlauf eines normalen Zellzyklus. Die CHO-K₁-Zellen verlassen einheitlich die G1-Phase und gehen zügig in die S-Phase über, dessen Maximum nach 3,5 h erreicht wird. Die Zellen treten anschließend ohne Verzögerung in die G2-Phase ein, dessen Maximum nach 8 h erreicht ist. Die - im Vergleich zur S-Phase - ungefähr doppelt so lange G2-Phase ist nach 13 h abgeschlossen. Der Wiedereintritt in den nächsten Zellzyklus beginnt 11 h nach dem Release.

Der Ansatz II (E2F1 + DP1) zeigt das Maximum der S-Phase ebenfalls bei 3,5 h. Weiterhin ist jedoch zu beobachten, dass der S-Phasenanteil nur langsam sinkt, die S-Phase in ihrer Gesamtdauer somit verlängert wird. Dies wird durch die Anwesenheit von zusätzlichem (transfizierten) E2F1 hervorgerufen, das die E2F-abhängigen Promotoren stärker induziert und die Zellen hierdurch länger in der S-Phase hält. Die G2-Phase zeigte eine Peak-Verlängerung um 5 h. Der Wiedereintritt in den nächsten Zellzyklus findet demnach erst 13 h nach dem Release statt.

Noch deutlicher zeigt sich diese Verlängerung der S-Phase bei dem Ansatz III (E2F1, Wt + DP1 + Ku70 + Ku80), die von 2 - 17 h andauert und sich im Bereich von 3-10 h im Maximum befindet. Der Eintritt in die G2-Phase beginnt erst nach 11 h und erreicht das Maximum erst nach 19 h. Die Verlängerung der S-Phase kann das Resultat aus einer transienten, aber instabilen Bindung zwischen E2F1 und dem Dimer Ku70/80 sein, die sich 12 h nach dem Zellzyklusstart wieder löst und so den Eintritt in die G2-Phase ermöglicht. Ein ähnlicher Verlauf zeigt sich auch bei Ansatz IV und V. Möglicherweise folgt die Verlängerung der S-Phase aus der Verdünnung der aktiven endogenen E2F-Konstrukte durch die Transfektion von Ku70 und Ku80 und einer daraus folgenden transkriptionellen Aktivität durch E2F1.

Der Ansatz IV (E2F1- Δ 270-350 + DP1 + Ku70 + Ku80) zeigt – verglichen mit Ansatz III – ein ähnliches Zellzyklusprofil, wenngleich der Eintritt in die S-Phase etwas verzögert wird und sich erst zwischen acht und 16 Stunden im Maximum befindet. Da die deletierte Region sich ausschließlich auf die Marked Box mit flankierenden Bereichen begrenzt und die Transaktivierungsdomäne voll funktionsfähig ist, kann diese Mutante die E2F-abhängigen Promotoren aktivieren. Die anschließende G2-Phase ist etwas deutlicher ausgeprägt. Es kommt hier nicht zu einem aktiven, repressiven Komplex durch die fehlende Marked Box, jedoch wird hier schon die

transkriptionell repressive Wirkung von Ku70 und Ku80 deutlich. Der Übergang in einen neuen Zellzyklus erfolgt erst nach 20 h.

Der Ansatz V (Ku70 + Ku80) zeigt einen -verglichen mit den Ansätzen II), III), IV)-verlangsamten Eintritt in die S-Phase mit einem Maximum bei neun Stunden, wie eingangs schon erwähnt vermutlich durch die Verdünnung der aktiven endogenen E2F-Konstrukte durch die Transfektion von Ku70 und Ku80. Die Dauer der S-Phase wie auch die der G2-Phase sind zudem erheblich kürzer, der Eintritt in den nächsten Zellzyklus ist schon ab 17 h zu erkennen.

Die Ergebnisse aus diesem Teilabschnitt sind tabellarisch in Tab. 3 zusammengefasst:

	<u>G1-Phase</u>	<u>S-Phase</u>	<u>G2-Phase</u>
Kontrolle	Phasen-Max.: nicht detektierbar Wiedereintritt: t = 11 h	Phasen-Max.: 3,5 h t: 2 – 7 h	Phasen-Max.: 7,5 h t: 4 – 15 h
E2F1/DP1	Phasen-Max.: 3,5 h Wiedereintritt: t = 13 h	Phase verlängert Phasen-Max.: 3 h t: 2 – 12 h	Phasen-Max: 7-12 h t: 5 – 12,5 h
E2F1/DP1 + Ku70/80	Phasen-Max.: nicht detektierbar Wiedereintritt: nicht detektierbar	Phasen-Max: 3, 10 h Phaseneintritt verzögert t: 2 – 17 h	Phasen-Max.: 19 h t: 11 – >22 h
E2F1-Δ270-350 /DP1 + Ku70/80	Phasen-Max.: / h re-entry delayed: t = 22 h	Phasen-Max.: 5 h verstärkt t: 2 – 12 h	Phasen-Max.: 15 h t: 4 – >22 h
Ku70/80	Phasen-Max.: 18 h (n. Wiedereintr.) re-entry delayed: t = 16 h	Phasen-Max.: 10 h entry delayed t: 3 – 13 h	Phasen-Max.: 16 h t: 10 – 17 h

Tab. 3: Ergebnisse aus den Zellzyklus-Experimenten an CHO-K1-Zellen ohne Bestrahlung.

4.5.7 Zellzyklus-Verhalten nach γ -Bestrahlung

Durch die große räumliche Trennung zwischen Brutschrank und Bestrahlungsquelle und des relativ geringen Fassungsvermögens des Bestrahlungsgerätes entstand ein Wachstumsvorteil für die unbestrahlten Zellen von fast fünf Stunden. Dies spiegelte sich auch in den Zellzyklus-Profilen der einzelnen Ansätze wieder.

4.5.8.3 Bestrahlte CHO-K1-Zellen

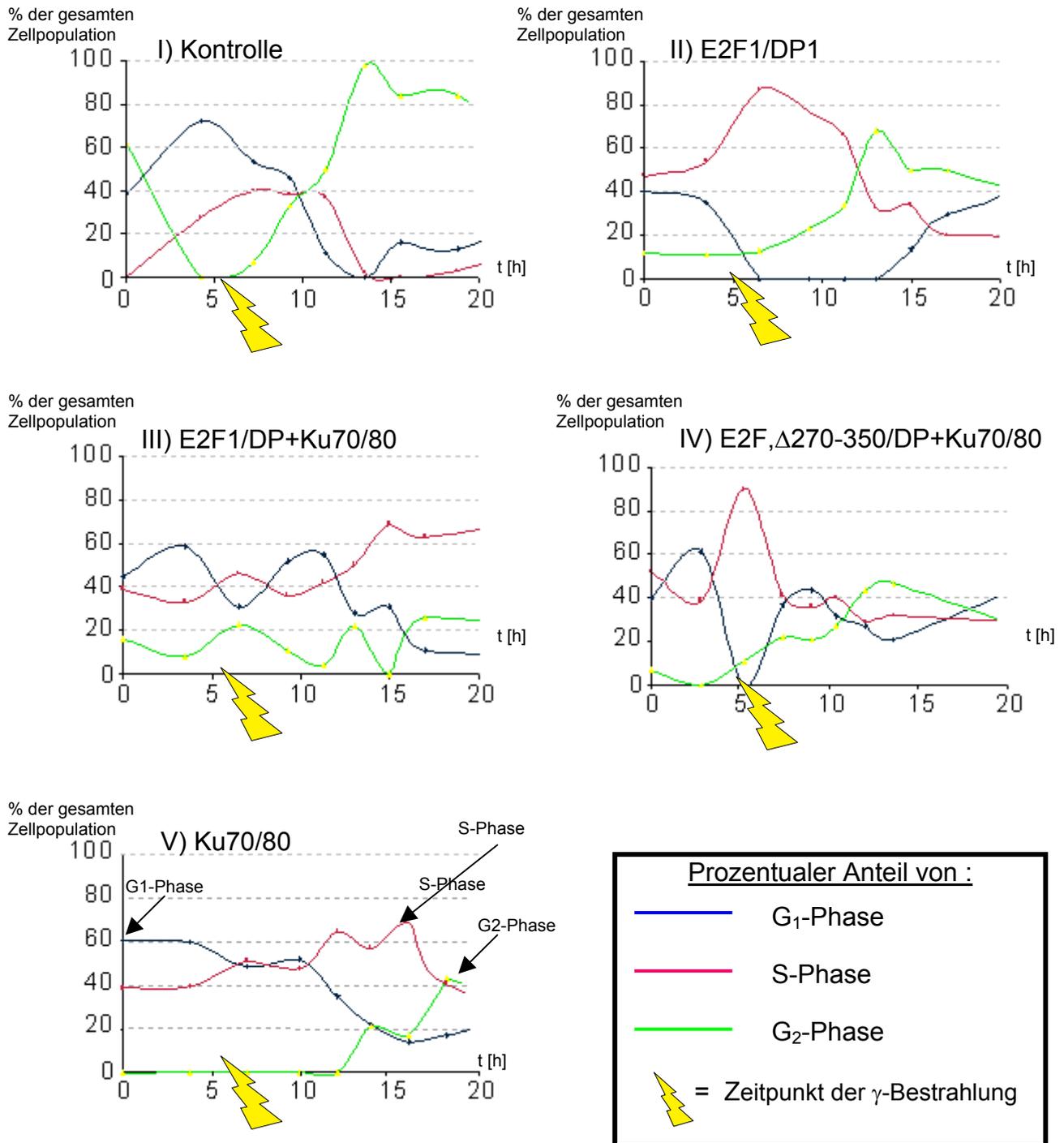


Abb. 28: Darstellung der Zellzyklusphasen-Verteilung von CHO-K1-Zellen nach transienter Transfektion mit verschiedenen Ansätzen (I-V) mit anschließender γ -Bestrahlung (5,5 Gy).

Der Ansatz I (Kontrolle, pBSK) zeigte bei bestrahlten CHO-K₁-Zellen eine starke Überschneidung der einzelnen Zellzyklus-Phasen. Zudem befanden sich über 60 % der Zellen bis zu zehn Stunden nach dem Release in der G₁-Phase. Im Vergleich zu unbestrahlten CHO-K₁-Zellen zeigte sich eine deutliche Verlängerung der G₁-Phase. Dies weist auf eine intensive Reparatur der DNA-Bruchstücke hin. Die S-Phase war stark verkürzt im Vergleich zu den weiteren Ansätzen und denen in CHO-K₁-Zellen. Die G₂-Phase war gegenüber den weiteren Ansätzen außerordentlich stark ausgeprägt, das Maximum befand sich bei 13 h mit 100% und nahm erst nach 18 h ab. Es ist zu vermuten, dass durch die induzierte DNA-Schädigung sich auch hier ein kleiner Anteil von E2F1-Ku70-Ku80-Komplexen gebildet hat, der den Eintritt in die S-Phase hinauszögert.

In Ansatz II führte die Transfektion von E2F1 und DP1 zu einer stärker ausgeprägten S-Phase mit einem Maximum bei 7 h. Ein Verweilen in der G₁-Phase wird durch einen Überschuss an E2F1/DP1 aufgehoben und verhilft den Zellen zu einem schnellen Einstieg in die S-Phase. Es ist zu vermuten, dass durch diesen Effekt die DNA-Reparatur nicht ausreichend erfolgen kann und im Verlauf weiterer Zellteilungen zu Zellmutanten und Apoptose führt. Die anschließende G₂-Phase besitzt einen unauffälligen Verlauf und läuft nach 17 aus. Der Wiedereintritt in einen neuen Zellzyklus beginnt erst nach 18 h.

Nach der Transfektion von E2F1, Wt, DP1, Ku70 und Ku80 zeigt sich in Ansatz III deutlich die Induktion eines Zellzyklus-Blocks in dem Übergang von der G₁-Phase in die S-Phase. Hierbei ist eine über 80%-ige Gewichtung in der G₁- und der S-Phase zu erkennen. Ein Eintritt in die G₂-Phase ist auch nach 20 h nicht feststellbar. Wie zuvor erwähnt, wurden zu jedem Ansatz auch 30 h - Aliquots gemessen um den Wiedereintritt in den Zellzyklus abzusichern. Der Wiedereintritt in den Zellzyklus konnte auch bei diesem Ansatz nachgewiesen werden. Die Komplexbildung von Ku70, Ku80 und E2F1 nach γ -Bestrahlung ist demnach eine reversible, aber feste kovalente Bindung, die nach dessen Lösen einen weiteren Fortschritt im Zellzyklus zulässt.

Der Ansatz IV (E2F1, Δ 270-350, DP1, Ku70 und Ku80) mit der E2F1-Deletionsmutante, der die Marked Box-Region fehlt, zeigte eine kurze S-Phase mit einem scharfen Maximum bei t = 5,5 h. Der Übergang in die G₂-Phase erfolgt etwas verzögert bei t = 11 h mit einem Maximum bei 13 h, der Wiedereintritt in einen neuen Zellzyklus beginnt immerhin schon bei 15 h. In Anlehnung an Ansatz II führt auch

hier die zusätzliche transkriptionelle Aktivität der E2F1-Deletion zu einem schnellen Einstieg in S-Phase, trotz zusätzlichem Ku70 und Ku80, da diese Proteine durch die fehlende Marked Box nicht an E2F1 binden können und ein Zellzyklus-Block am G₁/S-Phasenübergang ausbleibt.

Der Ansatz V (Ku70 und Ku80) zeigt in Übereinstimmung mit dem Ansatz III einen Zellzyklus-Block an dem G₁/S-Phasenübergang. Die Transfektion von Ku70 und Ku80 führt zur Komplexierung von endogenem E2F1, wodurch die Zellen nach γ -Bestrahlung bis 15 h nach dem Release in der frühen S-Phase verweilen. Die - im Vergleich zu Ansatz III - geringere Arrest-Dauer ist dadurch zu erklären, dass bei Ansatz V kein E2F1 zusätzlich transfiziert wird, die absolute Menge an E2F1-Ku70/80-Komplexen geringer ist und demnach die Arrest in seiner Dauer entsprechend reduziert wird. Die Ergebnisse aus diesem Teilabschnitt sind tabellarisch in Tab. 4 zusammengefasst (bezogen auf einen Zeitraum von 20 h):

	<u>G1-Phase</u>	<u>S-Phase</u>	<u>G2-Phase</u>
Kontrolle	Phasen-Max.: 5 h Wiedereintritt: t: nach 20 h G ₁ -Anstieg	Phasen-Max.: 8h, 11h t: 7 – 12 h	Phasen-Max.: 14 h t: 12 – 20 h
E2F1/DP1	Phasen-Max.: nicht detektierbar Wiedereintritt: nach 17 h G ₁ -Anstieg	Phasen-Max.: 7 h Phase verlängert t: 5 – 12 h	Phasen-Max.: 13 h t: 12 – 20 h
E2F1-Wt/DP1 + Ku70/80	Phasen-Max.: 3 h, 12 h Wiedereintritt: nicht detektierbar *	Phasen-Max.: 15 h Phase verlängert t: ab 12 h, (Ende nicht detektierbar)	Phasen-Max.: nicht detektierbar kein Eintritt in die G ₂ - Phase
E2F1-Δ270- 350 /DP1 + Ku70/80	Phasen-Max.: 3 h Wiedereintritt: nach 17 h G ₁ -Anstieg	Phasen-Max.: 6 h t: 3 – 9 h	Phasen-Max.: 13 h t: 11 – 17 h
Ku70/80	Phasen-Max.: 3 h Wiedereintritt: nicht detektierbar	Phasen-Max.: 12 h, 17 h Phase verlängert t: 9 – 18 h	Phasen-Max.: 18 h nach 20 h G ₁ -Anstieg

* bezogen auf den Zeitraum von 20 h.

Tab. 4: Ergebnisse aus den Zellzyklus-Experimenten an CHO-K1-Zellen nach Bestrahlung.

4.5.8 Luciferase-Ergebnisse der Zellzyklus-Experimente bei CHO-K1-Zellen

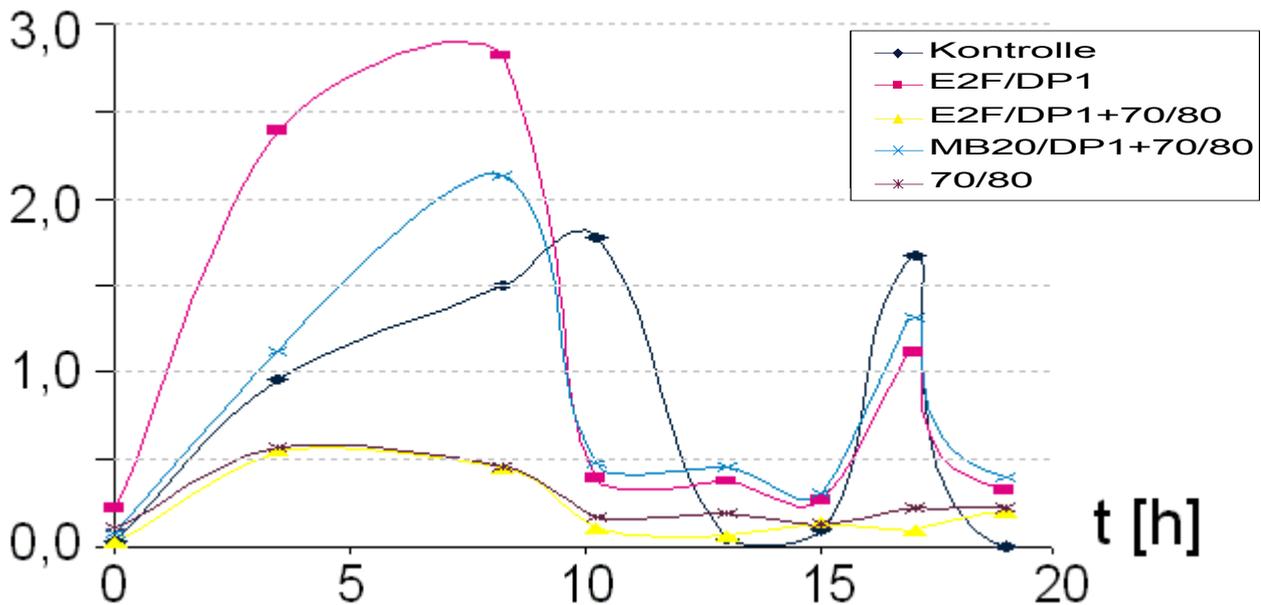
4.5.8.1 Ohne γ -Bestrahlung

Abb. 29: Vergleich der transkriptionellen Aktivität des E2F-abhängigen Promoters E2F,wt-Luc bei verschiedenen Transfektionsansätzen während des Zellzyklus nach transienter Transfektion ohne Bestrahlung.

Darstellung der relativen Luciferase-Aktivität (Duales System) bei CHO-K1 -Zellen mit verschiedenen Ansätzen (I-V)).

Die Aktivität der E2F-abhängigen Promotoren konnte durch den E2F-abhängigen Promoter mit drei E2F-Bindungsstellen in den CHO-K₁-Zellen gut detektiert werden. Sehr deutlich konnte bei den unbestrahlten CHO-K₁-Zellen der Wiedereintritt in den nächsten Zellzyklus erkannt werden. Die Luciferase-Messwerte aus Wiedereintritt in den nächsten Zellzyklus fielen deutlich tiefer aus, ein Grund hierfür wird in der Degradation der transfizierten Konstrukte zu finden sein. Die durch die Anwesenheit von zusätzlichem E2F verlängerte S-Phase bei Ansatz II und IV verhindert nicht den – mit den anderen Ansätzen – synchronen Eintritt in den nächsten Zellzyklus.

Die gemessene Luciferase-Aktivität in Ansatz I (Kontrolle, pBSK) stimmt mit den Daten aus den FACS-Analysen überein und zeigt die Aktivierung des Promoters durch endogenes E2F. Auch die Zeit der Promoter-Aktivierung korreliert weitestgehend mit den Ergebnissen aus den FACS-Analysen (Eintritt der Zellen in

die S-Phase). Der Eintritt in die S-Phase ist jedoch nicht so markant wie der Wiedereintritt in den nächsten Zellzyklus bei der Aktivierung des E2F-abhängigen Promoters durch zusätzlich hinzu transfiziertes E2F.

In dem Transfektions-Ansatz II (E2F1/DP1) zeigt sich eine sehr starke Aktivierung des Promoters, die sich auch mit den Ergebnissen aus der Bestimmung der Zellzyklus-Phasen (4.7.5.1) sehr gut deckt.

In Ansatz III (E2F1/DP1 + Ku70/80) ist nahezu keine Aktivierung des Promoters zu erkennen, so auch in Ansatz V (Ku70/80). Die sehr deutlichen Eintritte in die S-Phase stehen bei Zellzyklus-Phasenbestimmungen in keiner Übereinstimmung mit der ausbleibenden Aktivierung des Promoters und stärken die These eines transienten, aber instabilen Komplexes. Dies konnte durch einen abschließenden Wert bestätigt werden (> 22 h), dessen höhere Luciferasewerte keine weitere Blockierung der E2F-abhängigen Promotoren mehr erkennen ließe.

Der Ansatz VI (E2F1- Δ 270-350/DP1 + Ku70/80) zeigt eine gute Aktivierung des Promoters, die nur durch die deletierte Region der Mutante gemindert wird und somit hinter dem Ansatz II zurückbleibt. Dieses Ergebnis konnte auch durch frühere Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen festgestellt werden, die zeigten, dass die Anwesenheit der Marked Box einen positiven Einfluss auf die Aktivierung von Promotoren hat.

Auch in Ansatz V zeigt sich – ähnlich wie bei Ansatz III – eine nur schwache Aktivierung des E2F-abhängigen Promoters. Durch das Überangebot von Ku70 und Ku80 wird das aktive, endogene E2F möglicherweise blockiert. Erwartet wurden jedoch – verglichen mit Ansatz III – niedrigere Messwerte, da kein E2F1,Wt zusätzlich transfiziert wird.

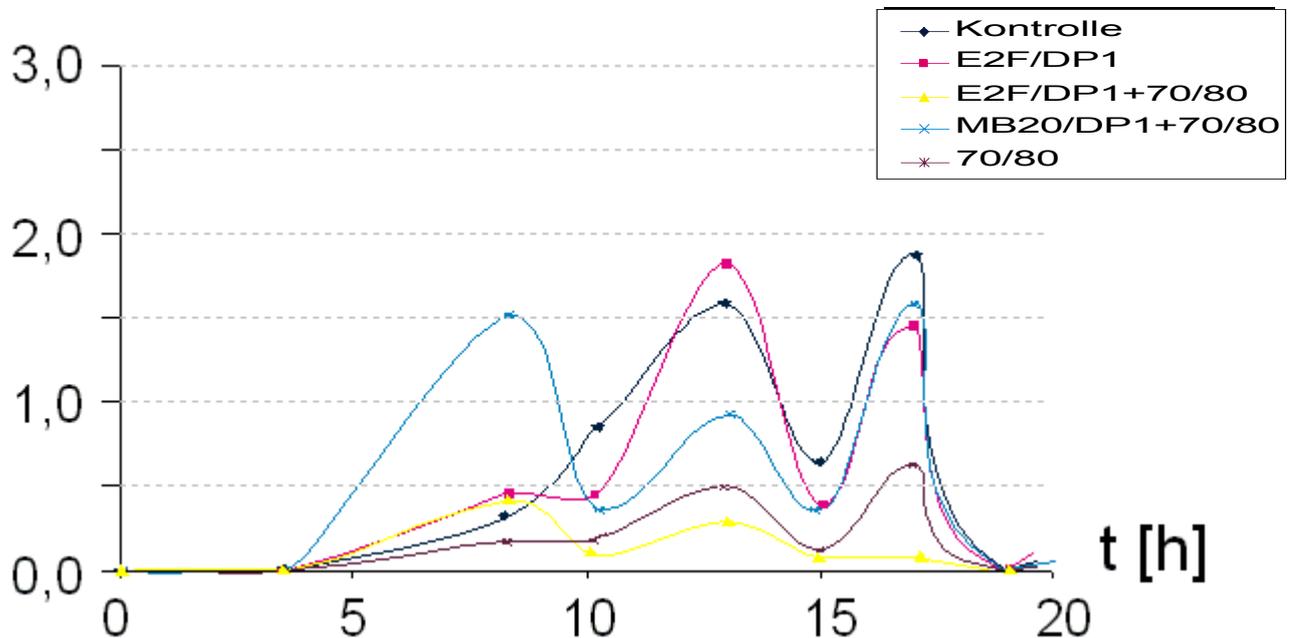
4.5.8.2 CHOK / mit γ -Bestrahlung

Abb. 30: Vergleich der transkriptionellen Aktivität des E2F-abhängigen Promotors E2F,wt-Luc in verschiedenen Transfektionsansätzen während des Zellzyklus nach transients Transfektion und anschließender Bestrahlung (5,5 Gy). Darstellung der relativen Luciferase-Aktivität (Duales System) bei CHO-K₁-Zellen mit verschiedenen Ansätzen (I-V)).

Die Aktivität der E2F-abhängigen Promotoren zeigte bei den bestrahlten CHO-K₁-Zellen eine allgemeine Zeitverzögerung von ungefähr fünf Stunden. Zudem war zu beobachten, dass die Intensität der Luciferase-Messwerte deutlich niedriger ausfällt als bei den Experimenten mit unbestrahlten CHO-K₁-Zellen. Jedoch steht der Wiedereintritt in den nächsten Zellzyklus in zeitlicher Übereinstimmung mit den Experimenten aus unbestrahlten Zellen, was für eine Auflösung des inhibierenden Komplexes nach der Bestrahlung spricht. Die Ergebnisse aus den FACS-Analysen decken sich sowohl zeitlich wie auch von Verhältnissen der Werte zueinander (Ab- und Zunahme von Phasenpopulationen).

Die Aktivierung der E2F-abhängigen Promotoren in Ansatz I (Kontrolle, pBSK) stimmt mit den Ergebnissen aus den Zellzyklus-Phasen-Daten überein. Es zeigte sich, dass die Verminderung der Luciferase-Aktivität nur marginal ist, im Unterschied zu den weiteren Ansätzen. Die Aktivität erreicht fast die des Ansatzes II (E2F1/DP1).

Der Anstieg der Promoter-Aktivität – in Übereinstimmung mit der Luciferase-Aktivität – erfolgt über 5 h später als – im Vergleich zu den FACS – der Einstieg in die S-Phase.

Die ausbleibende Aktivierung der E2F-abhängigen Promotoren in Ansatz III (E2F1/DP1 + Ku70/80) unterstützt die Resultate aus den Zellzyklusphasen-Bestimmungen eines durch γ -Strahlen induzierten Zellzyklus-Blocks in der frühen S-Phase. Der Promoter kann transkriptionell nicht aktiv werden, da dieser vom E2F-Ku70/80-Komplex blockiert wird.

Ansatz IV zeigt eine sehr frühe Aktivierung der E2F-abhängigen Promotoren bei 7,5 h, die 2,5 h später als bei den Zellzyklusphasen-Experimenten auftritt. Der Wert bei dem Zeitpunkt $t = 7,5$ h stimmt sehr gut mit den Werten der FACS-Analysen über, da auch dort ein Eintritt in die S-Phase sichtbar wird. Die marginale Erhöhung der Promoter-Aktivität bei dem Zeitpunkt $t = 12$ h deutet auf ein Artefakt hin, da sowohl bei $t = 10$ h wie auch bei 15 h die Promoter-Aktivität auf ein basales Niveau abgesunken ist. Bei weiteren Versuchen zeigte sich kein Anstieg der Luciferase-Aktivität. Der Wiedereintritt in den nächsten Zellzyklus erfolgt nach 17 h, in guter Übereinstimmung mit den Ergebnissen aus den FACS-Analysen.

Bei Ansatz V zeigt sich mit großer Deutlichkeit die Induktion der Bildung eines E2F1-Ku70/80-Komplexes als Konsequenz aus der Bestrahlung mit γ -Strahlen. Die geringen Luciferasewerte entsprechen ungefähr denen aus Ansatz III und gehen konform mit dem in den Zellzyklusphasen nachgewiesenen Zellzyklus-Block in der frühen S-Phase. Sowohl im Unterschied zu den Ergebnissen aus den FACS-Analysen wie auch den Luciferasewerten aus Ansatz III zeigt sich jedoch nach der Transfektion mit Ku70/80 allein nach γ -Bestrahlung ein Wiedereintritt in den nächsten Zellzyklus.