

Zusammenfassung Dissertation Jan Chemnitz

Nach UV-Bestrahlung synchronisierter Zellen am G1/S-Übergang erfolgte unabhängig vom p53-Status die ATR-abhängige Initiation der Intra-S-Phasen Schadensantwort. Die Aktivierung der UV-spezifischen ATR-Kinase führt zur Phosphorylierung und konsequenterweise zur Degradation der Zyklin E-Cdk2-aktivierenden Phosphatase Cdc25A. Die ATR-abhängige Inhibition der für den Eintritt in die S-Phase essenziellen Zyklin E-Cdk2-Aktivität verhindert die Rekrutierung des Pol α -Ladungsfaktors Cdc45 an den Replikationsursprung und somit die Initiation der bidirektionalen DNA-Replikation.

In dieser Arbeit konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass die ATR-initiierte zweistündige S-Phasen Schadensantwort nur in solchen Zellen für weitere sechs Stunden aufrechterhalten werden kann, die die transkriptionell aktive p53-Isoform $\Delta p53$ exprimieren. Die $\Delta p53$ -abhängige, sechsstündige Attenuation der S-Phasen Progression erfolgte durch die $\Delta p53$ -vermittelte Transaktivierung des *p21*-Promoters, dessen Genprodukt die Aktivität der S-Phasen treibenden Kinase Zyklin A-Cdk2 durch Komplexbildung reduzierte. Durch die Reduktion der S-Phasen Kinaseaktivität wurde die Replikation für insgesamt acht Stunden inhibiert, bevor in den darauf folgenden vier Stunden das Genom vollständig repliziert wurde. Die durch eine niedrige Zyklin A-Cdk2-Aktivität bedingte Replikationsinhibition erfolgte jedoch in *wtp53*-Zellen und *wt* $\Delta p53$ -exprimierenden *mutp53*-Zellen auf verschiedenen Ebenen. In UV-bestrahlten *wtp53*-Zellen führte die Reduktion der Zyklin A-Cdk2-Aktivität zur Interaktion von *wtp53* mit dem „origin“-kompetenten DNA Polymerase α -Primase Komplex. Die Bindung von *wtp53* an DNA Polymerase α -Primase inaktivierte deren intrinsische Primaseaktivität und führte konsequenterweise zur Inhibition der Initiation bidirektionaler DNA-Replikation. Somit ist „volle Länge“-p53 während der geschädigten S-Phase zwar transkriptionell inaktiv, besitzt aber eine von einer Gen-Transaktivierung unabhängige Funktion im Intra-S-Phasen Kontrollpunkt. In *wt* $\Delta p53$ -exprimierenden *mutp53*-Zellen, deren mutierter Tumorsuppressor die Primaseaktivität nicht inhibiert, war die Initiationsreaktion der DNA-Replikation folglich nicht supprimiert. In diesen Zellen unterbindet aber die durch $\Delta p53$ -bedingte niedrige Zyklin A-Cdk2-Aktivität die für den Elongationsprozess der DNA-Replikation notwendige Interaktion zwischen DNA Polymerase δ und ihrem Prozessivitätsfaktor PCNA. Während in bestrahlten *wtp53*-Zellen die Initiation und konsequenterweise auch die Elongation der DNA-Replikation inhibiert war, erfolgte in

bestrahlten wt Δ p53-exprimierenden mutp53-Zellen die Replikationsinhibition lediglich durch Verhinderung der Elongationsreaktion. In beiden Zelltypen erlaubt aber die Δ p53-induzierte Reduktion der Zyklin A-Cdk2 Aktivität die Inhibition der DNA-Replikation.

Untersuchungen zeigten, dass während der Δ p53-induzierten achtstündigen Attenuation der S-Phasen Progression, in der keine Replikation statt fand, der DNA-Schaden vollständig repariert wurde und erst nach Abschluss der Reparatur das Genom dupliziert wurde. Ein anderer Sachverhalt ergab sich bei der Untersuchung von mutp53-Zellen, die kein funktionelles Δ p53 exprimieren und somit die Progression durch die replikative S-Phase nicht attenuieren können. In diesen Zellen werden DNA-Schäden zwar während der DNA-Replikation repariert, allerdings attenuieren diese mutp53-Zellen nach erfolgter DNA-Replikation den Zellzyklus in der G2-Phase, in der der größte Teil der geschädigten DNA repariert wird. Es kann jedoch angenommen werden, dass die vollständige Reparatur geschädigter DNA vor Beginn der Replikation des zellulären Genoms zur Erhaltung der genomischen Stabilität beiträgt, während die Duplikation von unvollständig reparierter bzw. fehlerhaft reparierter DNA zur Manifestation von Mutationen führt.