

Jinrong Fu

Dr. med.

DNA Fragility in Murine Neural Progenitor Cells - Attempts to Identify Early Replicating Fragile Sites and Interrupt Transcription Activity

Einrichtung: Deutsches Krebsforschungszentrum (DKFZ)

Doktorvater: Prof. Dr. Peter Lichter

Die Anhäufung von DNA-Doppelstrangbrüchen (DSBs) und die daraus resultierende genomische Instabilität werden häufig mit der Entstehung zahlreicher Krankheiten und Krebserkrankungen in Verbindung gebracht. In den letzten Jahren fanden Forscher Genomabschnitte, in denen DNA-Schäden unter Replikationsstress vermehrt auftreten und DSB-Cluster bilden. Die DSBs in diesen Abschnitten führen oft zu Genmutationen oder Translokationen, die die Entstehung von Erkrankungen wie Medulloblastom und Burkitt-Lymphom begünstigen. Bis jetzt wurden zwei Gruppen von DSB Clustern identifiziert - wiederkehrende DNA-Doppelstrangbruch-Cluster (RDCs) unter Aphidicolin (APH)-Behandlung und früh-replizierende fragile Stellen (ERFS) unter Hydroxyharnstoff (HU)-Behandlung. Sie wurden jeweils in neuralen Vorläufer- und Stammzellen (NPSCs) und B-Lymphozyten der Maus kartiert. Trotz des Unterschieds, dass die RDC-Gene spät replizieren und die ERFS-Gene früh replizieren, haben sie ein gemeinsames Merkmal: Sie werden aktiv transkribiert. Diese Eigenschaft bringt ein anderes Forschungsthema hervor - die Transkriptions-Replikationskonflikten als Ursache der DSB-Bildung. Zahlreiche Studien fanden heraus, dass die Kollisionen zwischen den Transkriptions- und Replikationsapparaten schädliche Folgen mit sich bringen. Vorläufige Ergebnisse unseres Labors zeigten, dass das DSB-Niveau auf dem RDC-Gen *Ctnna2* bei vollständiger Ausschaltung der Transkriptionsaktivität durch Deletion des Promotors und des Enhancers deutlich reduziert wurden.

In meiner Studie versuchte ich, frühen Replikationsstress in aus embryonalen Stammzellen abgeleiteten neuralen Progenitorzellen (ESC-NPCs) der Maus zu induzieren, um die NPC-ERFSs zu kartieren, und herauszufinden, ob sie an der Entstehung bestimmter Krankheiten beteiligt sind. Bei der Behandlung der Zellen mit HU konnte ich jedoch keine signifikante DSB-Akkumulation außerhalb der repetitiven Regionen feststellen. Dies könnte auf mehrere Faktoren zurückzuführen

sein, wie z. B. die niedrige HU-Konzentration und die kurze Behandlungszeit, die in zukünftigen Experimenten optimiert werden sollten. Darüber hinaus sollte die Zellzyklus-Synchronisation in der G1/S-Phase in Betracht gezogen werden, um die HU-vermittelte DSB-Akkumulation in der frühen S-Phase zu erhöhen. Darüber hinaus vermute ich, dass APH- und HU-induzierte DSBs zwei Kategorien fragiler Stellen darstellen, die auf unterschiedlichen Entstehungsmechanismen beruhen, die in der M- bzw. G1/S-Phase wirken. Schließlich sind weitere Untersuchungen der genauen molekularen Wege von der Induktion des Replikationsstresses bis zur DSB-Bildung erforderlich. Das Auffinden und die Lokalisierung der potenziellen ERFS-spezifischen Spaltungs- oder Bindungsproteine könnte dazu beitragen, ERFSs in verschiedenen Zelltypen effizienter zu detektieren.

Der zweite Endpunkt meiner Studie besteht darin, das Transkriptionsterminationssignal, drei Polyadenylierungs (Poly(A))-Sequenzen, in der Mitte des RDC-Gens *Ctnna2* einzufügen. Anschließend sollten die Transkriptionsaktivitäten für die Exons vor und nach der Insertionsstelle gemessen werden, um die Herunterregulierung der Transkriptionsaktivität zu bestätigen. Die wirksame Beendigung der Transkription durch Poly(A)-Sequenzen ebnet den Weg für weitere Änderungen der Transkriptionslänge im Gen durch Veränderung der Poly(A)-Insertionsstelle. Durch die Analyse des DSB-Musters und der DSB-Dichte, die verschiedenen Transkriptionslängen entsprechen, kann die Beziehung zwischen Transkription und DNA-Schäden quantitativ gemessen werden. In meinen Experimenten ist es mir gelungen, die Transkriptionsaktivität der Exons nach den Poly(A)-Sequenzen mäßig zu reduzieren. In zukünftigen Experimenten sollte es möglich sein, die Transkriptionsaktivität in größerem Umfang zu senken, indem die drei Poly(A)-Sequenzen durch Cre-lox-Rekombination zusammengefügt werden. Dabei ist jedoch zu bedenken, dass die Effizienz der Poly(A)-Sequenz ortsspezifisch ist, so dass eine alternative Insertionsstelle erforderlich sein könnte, um die Transkriptionsaktivität nach der Poly(A)-Sequenzen vollständig auszulöschen. Entsprechend den Ergebnissen früherer Studien, die auf schädliche Auswirkungen von Transkriptions-Replikationskonflikten hinweisen, erwarte ich eine positive Korrelation zwischen dem DSB-Niveau und der Transkriptionslänge des Gens.

Insgesamt stellen die genaue Kartierung der fragilen Stellen und die Aufklärung der Rolle der Transkription bei der DSB-Bildung eine große Herausforderung dar, bieten aber auch enorme Möglichkeiten für die Erforschung der genomischen Instabilität und deren Zusammenhang mit der Entstehung von Krankheiten und Krebs. Sie besitzen ein enormes Potenzial nicht nur für die Aufdeckung der Mechanismen, die menschlichen Krankheiten und Krebserkrankungen zugrunde liegen, sondern auch für die Entdeckung potenzieller Angriffspunkte für die Krebstherapie und -prävention in der Zukunft. Ich bin davon überzeugt, dass künftige Entdeckungen auf diesem Gebiet einen erheblichen Nutzen für die Gesundheit der Menschen bringen werden.