

Patrick Alexander Schweizer

Dr. med.

## **DNA-Reparatur lymphoblastoider Zellen von Patienten mit dem Smith-Magenis Syndrom**

Geboren am 20.01.1976 in Freiburg im Breisgau.

Staatsexamen am 16.06.2003 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Deutsches Krebsforschungszentrum

Doktorvater: Herr Prof. Dr. rer. nat. Helmut Bartsch

Das Smith-Magenis Syndrom (SMS) ist ein multisymptomatisches Syndrom, dem eine hemizygoter Deletion eines genreichen Abschnittes im Bereich der Bande 11.2 des kurzen Arms von Chromosom 17 zugrunde liegt. Aktuell wird davon ausgegangen, dass für die Symptomatik vor allem die hemizygoter Deletion des Gens *RAI1* eine wichtige Rolle spielt. Ein weiteres wichtiges Kandidatengen im kritischen Bereich der SMS-Deletion ist *TOP3 $\alpha$* . Diesem Gen aus der Familie der Topoisomerasen werden wichtige Funktionen bei der DNA-Reparatur, insbesondere der Doppelstrangbruch-Reparatur zugeschrieben. In der vorliegenden Arbeit wurden mit dem alkalischen Comet-Assay die Reparatureigenschaften von Zellen zweier Patienten mit dem Smith-Magenis Syndrom, sowie jeweils zugehörigen Kontrollzellen eines gesunden Elternteils analysiert.

Bei den Comet-Assay Experimenten nach Schädigung der Zell-DNA mit  $\gamma$ -Strahlung und Wasserstoffperoxid, welche beide vornehmlich Einzelstrangbrüche an der DNA verursachen, unterschieden sich die SMS-Zellen in ihrem Reparaturverhalten nur geringfügig von den gesunden Elternkontrollen. In den Experimenten mit Bleomycin, das einen hohen Anteil an Doppelstrangbrüchen erzeugt, zeigte sich jedoch ein erheblicher Unterschied in Form einer starken Reparaturverzögerung bei den SMS-Zellen gegenüber den Kontrollzellen. In den Versuchen mit der ausschließlich Doppelstrangbrüche erzeugenden Restriktionsendonuklease *Msp I* und Einbringen des Enzyms in die Zellen mittels Elektroporation war bei den SMS-Zellen im Gegensatz zu den Elternkontrollen im beobachteten Zeitraum von 120 Minuten keine Reparatur der induzierten DNA-Schäden zu erkennen. Aufgrund dieser Ergebnisse liegt die Vermutung nahe, dass bei den SMS-Zellen ein Reparaturdefizit für DNA-

Doppelstrangbrüche besteht. Im Zell-Überlebens-Assay zeigte sich ein Absterben der mit MSP I und Elektroporation behandelten SMS-Kulturzellen im Vergleich zu einem Fortgang der Zellproliferation der gleich behandelten Kontrollzellen. Dies unterstreicht eine defizitäre Doppelstrangbruch-Reparatur der SMS-Zellen im Vergleich zu den Elternkontrollen. Des Weiteren war in den Comet-Assay Untersuchungen eine erhöhte Hintergrundschädigung bei den unbehandelten SMS-Zellen aufgefallen. Diese Ergebnisse lassen eine verminderte Aktivität eines für DNA-Doppelstrangbruch-Reparatur und genetische Stabilität wichtigen Enzyms bei den SMS-Zellen vermuten. Um eine Einschätzung der individuellen Ausstattung der Zellen mit Reparaturenzymen zu gewinnen, wurde im zweiten Teil der Arbeit mittels cDNA-Arrays die konstitutive mRNA-Expression von über 70 bekannten Reparaturenzymen, darunter auch die Topoisomerase III $\alpha$  in SMS-Zellen und Elternkontrollen vergleichend untersucht. Hierbei zeigten sich nur geringfügige Unterschiede, insbesondere kamen in der mRNA-Expression des *TOP3 $\alpha$*  Gens keine signifikanten Unterschiede zur Darstellung. Deutliche Unterschiede zeigten sich in der Expression des Doppelstrang-Reparaturgens *MRE11*, welches auf Seiten der SMS-Zellen weniger stark exprimiert wurde. Dies könnte eine mögliche Erklärung für die im Comet-Assay beobachtete Reparaturdefizienz der SMS-Zellen für Doppelstrangbrüche sein. Da *MRE11* nicht in dem bei SMS deletierten Abschnitt liegt, kommt allerdings eine hemizygoten Deletion dieses Enzyms als Ursache der erniedrigten Expression nicht in Betracht.

Als Ursache für die verminderte DNA-Reparaturkapazität von Doppelstrangbrüchen bei SMS-Zellen wäre außerdem denkbar, dass im sehr reichen Abschnitt der SMS-Deletion für DNA-Reparatur und Zellproliferation wichtige, bisher noch nicht näher charakterisierte Gene liegen. Das Finden eines molekulargenetischen Korrelates der beobachteten Reparaturdefizite muss Gegenstand weiterführender Experimente sein. Außerdem sollte eine größere Anzahl an Zellen verschiedener SMS-Patienten auf DNA-Reparaturdefizite geprüft werden. Inwieweit die beobachteten Reparaturdefizite *in vivo* für das Krankheitsbild des Smith-Magenis Syndrom relevant sind muss sich ebenfalls in zukünftigen Studien zeigen.