

Intragenomische Heterogenität der Induktion und Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen

A. Sak, Berlin

Zellen von Weichteilsarkomen, Gliomen und Karzinomen zeigen große Unterschiede in der zellulären Strahlenempfindlichkeit. Der relevante initiale Strahlenschaden sind DNA-Doppelstrangbrüche. Ein bis zwei nicht-reparable DNA-Doppelstrangbrüche pro Zelle führen zum reproduktiven Zelltod [2, 5, 7]. Trotz der Bedeutung der DNA-Doppelstrangbrüche für den Zelltod wurden die molekularen Schritte vom initialen Strahlenschaden bis zum Zelltod und insbesondere die für die Strahlenresistenz bedeutsamen Mechanismen noch nicht aufgeklärt. Vier kritische Parameter zwischen der Induktion von DNA-Schäden durch ionisierende Strahlen und dem reproduktiven Zelltod werden derzeit intensiv untersucht:

1. die initiale Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen,
2. die Geschwindigkeit der DNA-Doppelstrangbruch-Reparatur,
3. der Anteil residueller Schäden und
4. die Reparaturgenauigkeit.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Induktion und Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen auf Regionen, die das Onkogen *c-myc* enthalten, im Vergleich zum Gesamtgenom analysiert [8, 9]. Die Daten zur Induktion, Reparatur und den residuellen DNA-Doppelstrangbruch-Schäden in der Kolonkarzinom-Linie (COLO320HSR) und der Mammakarzinom-Linie (MCF-7) sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

Trotz der im Vergleich zum Gesamtgenom im Mittel übereinstimmenden DNA-Doppelstrangbruch-Induktion auf dem *c-myc* Locus der Linie COLO320HSR, wurde eine Abweichung von der Gleichverteilung der DNA-Doppelstrangbrüche über die 130kbp Restriktionsfragmente, mit höheren Induktionswerten in der Mitte der Fragmente gefunden [9]. Die niedrigere DNA-Doppelstrangbruch-Induktion an den Enden der 130kbp *c-myc* Fragmente deutet auf geschützte Regionen hin. Eine Möglichkeit der Erklärung hierfür ist, daß die 130kbp großen *c-myc* Fragmente an den Enden Regionen aufweisen, die für die Assoziation mit der Kernmatrix verantwortlich sind. Bei MCF-7 fanden

Tab. 1: Induktion und Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen auf dem Gesamtgenom im Vergleich zur *c-myc* Region, Mittelwerte \pm SD.

Zelllinien	DSB-Induktion $\times 10^{-9}$ [dsb/bp/Gy]		DSB-Reparatur $T_{1/2}$ [min]		Restschaden [%]	
	Gesamt	<i>c-myc</i>	Gesamt	<i>c-myc</i>	Gesamt	<i>c-myc</i>
COLO320HSR	7,1 \pm 0,8	10,0 \pm 1,5	86,0 \pm 23,0	9,4 \pm 3,2	1,4 \pm 11,6	32,5 \pm 5,0
MCF-7	6,7 \pm 0,5	27,5 \pm 6,9	79,0 \pm 20,0	23,0 \pm 13,0	6,4 \pm 7,6	4,8 \pm 14,6

wir dagegen eine höhere Induktionsrate auf dem *c-myc* Locus als im Gesamtgenom. Eine Hypersensitivität der *c-myc* Region von MCF-7 für Einzelstrangbruch-Induktion wurde ebenfalls beschrieben [3]. Die Konformation des Chromatins und der Grad der Assoziation mit Proteinen sind wichtige Faktoren, die die Schadensinduktion beeinflussen. So kann die DNA-Doppelstrangbruch-Induktion in proteinfreier DNA im Vergleich zum nativen Chromatin bis zu 50 Mal höher liegen [10]. Die Schutzfunktion der Proteine bezüglich der Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen ist in replizierenden DNA-Regionen mindestens um den Faktor 2 weniger ausgeprägt und kann auf die offene Chromatinstruktur von replizierenden DNA-Regionen zurückgeführt werden.

Die Reparaturhalbwertszeit auf dem *c-myc* Locus ist im Vergleich zum Gesamtgenom etwa um den Faktor $9,1 \pm 4,1$ signifikant schneller bei COLO320HSR ($p < 0,0001$) bzw. $3,6 \pm 1,0$ bei MCF-7 ($p = 0,0005$). Die Halbwertszeit der Reparatur in den größeren *c-myc* Fragmenten mit einem geringeren Transkriptionsanteil bei COLO320HSR unterscheidet sich hingegen nicht signifikant von dem des Gesamtgenoms bzw. dem transkriptions-inaktiven Alpha-Satelliten Locus.

Eine Erklärungsmöglichkeit für die schnellere Reparaturhalbwertszeit von DNA-Doppelstrangbrüchen auf dem *c-myc* Locus ist, dass die unterschiedliche Konformation bzw. die Lokalisation des *c-myc* Genes auf den Chromosomen die Zugänglichkeit dieser Region für Reparaturenzyme erleichtert. So wurde gezeigt, dass aktive Gene mehr an der Chromosomenperipherie lokalisiert sind [4]. Ein weiterer Grund könnte in den verwendeten Methoden zur Messung der DNA-Doppelstrangbruch-Reparatur auf dem *c-myc* Locus bzw. dem Gesamtgenom liegen. Die Methode zur Messung der DNA-Doppelstrangbruch-Reparatur auf dem Gesamtgenom gibt einen Mittelwert der verschiedenen Mechanismen zur Wiederverknüpfung der DNA-Doppelstrangbrüche wieder. Es sind dies die intramolekulare Wiederverknüpfung durch nicht-konservative (illegitime) Rekombination oder End-zu-End ("end-joining") Verknüpfung, sowie intermolekulare Verknüpfung durch konservative homologe Rekombinationsmechanismen. Die Hybridisierungsmethode kann zwischen der intra- und intermolekularen Wiederverknüpfung unterscheiden. Intermolekulare Rekombination von gebrochenen Enden (DNA-Doppelstrangbrüche) durch End-zu-End Verknüpfung oder illegitime Rekombination würde im Gegensatz zur intramolekularen Rekombination nicht zur Wiederherstellung der ursprünglichen Restriktionsfragmente führen. Ein funktioneller Zusammenhang zwischen der Rekombinationsreparatur und Transkription, wie für die Exzisions-Reparatur von UV-Schäden gezeigt [1, 6], kann ebenfalls die unterschiedlichen Kinetiken erklären. Der Unterschied in dem Anteil nicht reparierter DNA-Doppelstrangbrüche von Gesamtgenom und einer spezifischen Region (*c-myc*) bei COLO320HSR weist auf den Anteil inkorrekt reparierter DNA-Doppelstrangbrüche hin.

Die Untersuchung der Induktion und Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen nach ionisierenden Strahlen auf spezifischen Genregionen kann von weitreichender Bedeutung sein. Bei deutlichen intragenomischen Unterschieden von transkribierten im Vergleich zu inaktiven Genen bzw. dem Gesamtgenom, wären die bisher angewendeten Methoden zum Nachweis von DNA-Doppelstrangbrüchen in der Gesamt-DNA wenig geeignet, Vorhersagen über die zelluläre Strahlensensitivität zu machen. Für den Strahlenschutz wären die Erkenntnisse über die differentielle Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen auf aktiv transkribierenden Regionen, die wichtige, für die Tumorinduktion bzw. Tumorprogression relevante Gene enthalten, ebenfalls von Bedeutung, weil

nur die Schädigung eines wichtigen Genes zur Mutation, Tumorinduktion bzw. Tumorerkrankung führt.

Literatur

- [1] Bohr, V. A.; Smith, C.A.; Okumoto, D.S.; Hanawalt, P.C.: DNA repair in an active gene: removal of pyrimidine dimers from the DHFR gene of CHO cells is much more efficient than in the genome overall. *Cell* 40 (1985) 359–369
- [2] Bryant, P. E.: Enzymatic restriction of mammalian cell DNA: Evidence for double-strand breaks as potentially lethal lesions. *Int. J. Radiat. Biol.* 48 (1985) 55–60
- [3] Bunch, R.T.; Gewirtz, D.A.; Povirk, L.F.: Ionizing radiation-induced DNA strand breakage and rejoining in specific regions as determined by an alkaline unwinding/Southern blotting method. *Int. J. Radiat. Biol.* 68 (1995) 553–562
- [4] Eils, R.; Saracoglu, K.; Münkler, C.; Imhoff, J.; Sätzler, K.; Bertin, E.; Dietzel, S.; Schröck, E.; Ried, T.; Cremer, T.; Cremer, C.: Three-dimensional imaging approaches and Monte Carlo simulations: Development of tools to study the morphology and distribution of chromosome territories and subchromosomal targets in human cell nuclei. *Zoological Studies (Suppl. 1)* (1995) 7–10
- [5] Frankenberg-Schwager, M.; Frankenberg, D.; Blöcher, D.; Harbich, R.; Adamczyk, C.: Irreparable DNA double-strand breaks induced in eukaryotic cells by sparsely or densely ionizing radiation and their importance for cell killing. *Mutat. Res.* 96 (1982) 132
- [6] Mellon, I.; Spivak, G.; Hanawalt, P.C.: Selective removal of transcription-blocking DNA damage from the transcribed strand of the mammalian DHFR gene. *Cell* 51 (1987) 241–249
- [7] Obe, G.; Johannes, C.; Schulte-Frohlinde, D.: DNA double-strand breaks induced by sparsely ionizing radiation and endonucleases as critical lesions for cell death, chromosomal aberrations, mutations and oncogenic transformation. *Mutagenesis* 7 (1992) 3–12
- [8] Sak, A.; Stuschke, M.: Repair of ionizing radiation induced DNA double-strand breaks (dsb) at the c-myc locus in comparison to the overall genome. *Int. J. Radiat. Biol.* 73 (1998) 35–43
- [9] Sak, A.; Stuschke, M.; Stapper, N.; Streffer, C.: Induction of DNA double-strand breaks (DSB) by ionizing radiation at the c-myc locus compared to the whole genome: a study using pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) and gene probing. *Int. J. Radiat. Biol.* 69 (1996) 679–685
- [10] Sak, A.; Stuschke, M.; Wurm, R.; Budach, V.: Protection of DNA from ionizing radiation induced double-strand breaks: influence of replication and nuclear proteins. *Int. J. Radiat. Biol.* 76 (2000) 749–756