
Schnelle, lokale CDKN1A (p21) Akkumulation in menschlichen Zellkernen als Marker von Schwerionenspuren

B. Jakob

Die Strahlentherapie ist eine der Säulen zur Behandlung lokalisierter Tumorstadien. Aufgrund vorteilhafter physikalischer und strahlenbiologischer Eigenschaften gewinnt der Einsatz von Ionenstrahlen zunehmend an Interesse in der Tumortherapie [1]. Diese medizinischen Anwendungen haben die Grundlagenforschung zum Verständnis der molekularen Basis der zellulären Antwort auf Schädigungen durch Teilchenstrahlung stimuliert. Dabei scheint es essentiell, die frühen Signaltransduktionsmechanismen aufzuklären, welche die anfänglich induzierten DNA-Schäden mit der generellen Strahlenantwort der Zelle verknüpfen.

Eine der grundlegenden und charakterisierenden Eigenschaften der Teilchenstrahlen ist die im Vergleich zu Photonenstrahlung unterschiedliche Energiedeposition auf mikroskopischer Ebene. Während eine Bestrahlung mit Röntgen- oder Gammastrahlen zu einer weitgehend homogenen Verteilung der Dosis in der Zelle führt, zeigen die Spuren der beschleunigten Ionen eine inhomogene Energiedeposition, die zu hohen lokalen Ionisierungsdichten entlang der Trajektorien führt. Auf molekularer Ebene resultiert diese hohe Ionisierungsdichte in einer erhöhten Komplexität der generierten DNA-Schädigung, die eine besondere Herausforderung an die zellulären Reparatursysteme stellt [2].

Um Einblicke in die Reparatur- und Signalwege nach Ionenbestrahlung zu bekommen, wurde im Rahmen dieser Arbeit orts aufgelöst die zelluläre Strahlenantwort ausgewählter Proteine mittels Immunfluoreszenzfärbung in Humanfibroblasten detektiert. Eines der zuerst untersuchten Proteine war CDKN1A (p21). Bekannt war, dass dieses Protein nach Röntgen- oder Gammabestrahlung p53-abhängig induziert wird und u.a. durch seine Funktion als Inhibitor der cyclinabhängigen Kinase für den Zellzyklusarrest am G1/S-Kontrollpunkt mitverantwortlich ist [3]. CDKN1A zeigt bereits wenige Minuten nach der Bestrahlung mit schweren Ionen eine Akkumulation in subnuklearen Foci, deren Anzahl mit der zu erwartenden Poisson-Verteilung der Zahl der Ionendurchgänge gut übereinstimmt (s. Abb. 1) [4]. Aufgrund der Schnelligkeit der CDKN1A-Akkumulation ist davon auszugehen, dass es sich bei dem Phänomen um eine intranukleare Proteintranslokation von zum Bestrahlungszeitpunkt bereits vorhandenem CDKN1A handelt. Experimente unter Verwendung von DNase weisen auf eine Bindung von CDKN1A an Chromatin/DNA hin [5]. Mittlerweile wurde durch Kultivierung von Zellen auf Kernspurdetektoren direkt nachgewiesen, dass jedem der zu beobachtenden CDKN1A-Foci ein Ionendurchgang an dieser Stelle zuzuordnen ist [6]. Es ist uns somit zum ersten Mal gelungen, die inhomogene, lokale physikalische Dosisverteilung einer Teilchenstrahlung direkt *in situ* in einer schnellen biologischen Reaktion sichtbar zu machen.

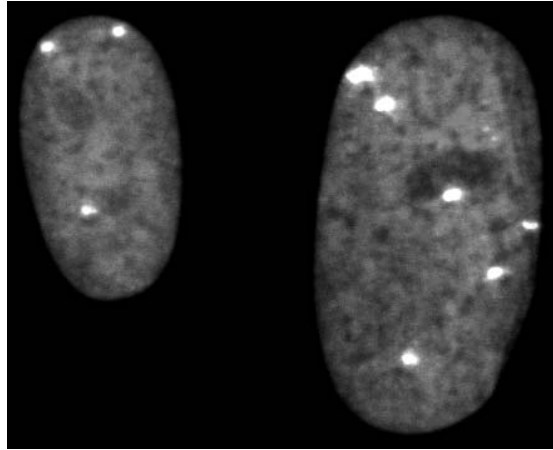


Abb. 1a: Lokal begrenzte CDKN1A Akkumulation (weiße Flecken, ursprünglich grüne Fluoreszenz) in Zellkernen von Humanfibroblasten (gefärbt mit PI) nach Bestrahlung mit Uranionen (9,1 MeV/u; Fluenz: $2,2 \cdot 10^6$ Ionen \cdot cm $^{-2}$). Bildbreite: 48 μ m.

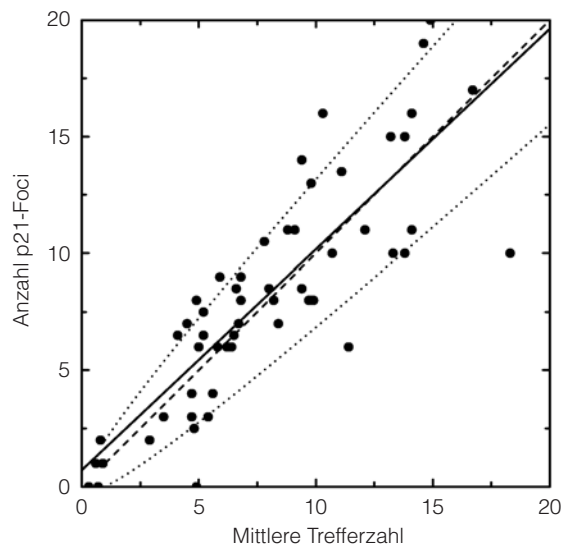


Abb. 1b: Korrelation von mittlerer Anzahl erwarteter Ionendurchgänge durch die Zellkerne und beobachteter Zahl von CDKN1A Foci aus einem Experiment mit Bleiionen. Durchgezogene Linie: Lineare Regression durch die Datenpunkte; gestrichelt: erwartete Korrelation für den Idealfall. Die punktierten Linien geben die Breite der zu erwartenden Poissonverteilung um die Mittelwerte wieder.

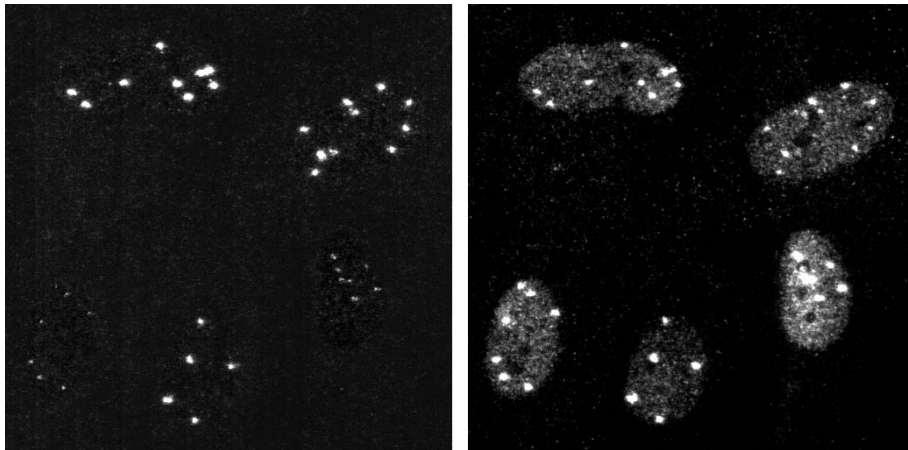


Abb. 2: Räumliche und zeitliche Colokalisation von CDKN1A und strahlungsinduzierter DNA-Reparaturfoci in Zellkernen nach Bestrahlung mit Goldionen (3,4 MeV/u; Fluenz: $1,9 \cdot 10^6$ Ionen \cdot cm⁻²). Die Bilder wurden gleichzeitig aus einem doppelt gefärbten Präparat aufgenommen und die Kanäle zur besseren Visualisierung getrennt.

Links: grüner Kanal: CDKN1A.

Rechts: roter Kanal: Lokale Ansammlung von hMre11 weist auf Bereiche der DNA-Doppelstrangbruchreparatur hin. Beide Kanäle zeigen ein identisches Muster der hellen Flecken an den Stellen der Ionendurchgänge. Größe der Bilder: 160 μ m.

Die Akkumulation von CDKN1A an den Stellen der Ionendurchgänge bleibt über mehrere Stunden (abhängig vom LET der verwendeten Partikularstrahlen) sichtbar, bevor die Proteinansammlungen diffuser werden und sich wieder auflösen. Aus der Schnelligkeit der Bildung, der DNA-Bindung und der Reversibilität und Verweildauer der CDKN1A-Foci lässt sich auf eine mögliche, neue Funktion in der Erkennung oder Prozessierung von strahlungsinduzierten DNA-Schäden schließen.

Um diese postulierte neue Funktion von CDKN1A weiter zu charakterisieren, wurde mit einer Reihe von Experimenten begonnen, die, unter Einschluss der Verwendung anderer menschlicher Zelllinien mit definierten genetischen Defekten, die gleichzeitige Anfärbung zweier Proteine nach der Bestrahlung beinhalten. Besonders interessant sind in diesem Zusammenhang Zelllinien mit bekannten Reparaturdefekten und die Untersuchung von Proteinen, die in den verschiedenen Wegen der DNA-Reparatur beteiligt sind, in Kombination mit der CDKN1A Detektion.

So zeigt z.B. auch das hMre11-Protein in konfluenten Fibroblasten nach der Bestrahlung mit schweren Ionen eine strenge Korrelation in der örtlichen Ausbildung subnuklearer Foci in Bezug auf CDKN1A und damit auf die Ionendurchgänge (s. Abb. 2) [5]. Das hMre11 Protein assoziiert zusammen mit Rad50 und dem in der autosomalen Erbkrankheit Nijmegen Breakage Syndrome mutierten Protein NBS1 an geschädigter DNA und ist dort vermutlich an der Doppelstrangbruchprozessierung beteiligt [7]. CDKN1A und hMre11 unterscheiden sich jedoch in dem Zeitverlauf der strahlungsinduzierten Akkumulation. Darüber hinaus ergaben Experimente mit Fibroblasten aus Biopsien von Nijmegen Breakage Syndrome Patienten trotz positiver CDKN1A Antwort keine hMre11

Anreicherung im Bereich der Ionendurchgänge. Die Ausprägung der CDKN1A Foci ist demzufolge unabhängig von der Ausbildung des hMre11/Rad50/NBS1-Proteinkomplexes an der geschädigten DNA [5].

Ausblick

Die lokale Dosisdeposition schwerer Ionen mit der dadurch bewirkten räumlich begrenzten Schädigung der DNA im Zellkern erlaubt und vereinfacht die Detektion von Proteinveränderungen, die an der strahlungsabhängigen Schadensprozessierung beteiligt sind.

Durch die Möglichkeit, einzelne Ionendurchgänge in Zellkernen *in situ* wenige Minuten nach der Bestrahlung mit schweren Ionen durch die Akkumulation von CDKN1A zu markieren, eröffnet sich eine Vielzahl experimenteller Möglichkeiten, um Rückschlüsse auf Signal- und Reparaturwege nach Bestrahlung im Allgemeinen und Teilchenstrahlung im Besonderen zu ziehen. Des Weiteren seien hier Experimente mit niedriger Fluenz aufgeführt, in denen auf diese Weise getroffene von nicht getroffenen Zellen unterschieden und sog. Bystandereffekte untersucht werden können.

Literatur

- [1] Kraft, G.: Radiotherapy with heavy ions: Radiobiology, clinical indications and experience at GSI, Darmstadt. *Tumori* 84 (1998) 200–204
- [2] Ward, J.F.: The complexity of DNA damage: relevance to biological consequences. *Int. J. Radiat. Biol.* 66 (1994) 427–432
- [3] Elledge, S.J.: Cell cycle checkpoints: Preventing an identity crisis. *Science* 274 (1996) 1664–1672
- [4] Jakob, B.; Scholz, M.; Taucher-Scholz, G.: Immediate localized CDKN1A (p21) radiation response after damage produced by heavy-ion tracks. *Radiat. Res.* 154 (2000) 398–405
- [5] Jakob, B.; Scholz, M.; Taucher-Scholz, G.: Characterization of CDKN1A (p21) binding to sites of heavy ion induced damage: Colocalization with proteins involved in DNA repair. *Int. J. Radiat. Biol.* (in press)
- [6] Scholz, M.; Jakob, B.; Taucher-Scholz, G.: Direct evidence for the spatial correlation between individual particle traversals and localized CDKN1A (p21) response induced by high LET irradiation. *Radiat. Res.* (in press)
- [7] Carney, J.P.; Maser, R.S.; Olivares, H.; Davis, E.M.; Le Beau, M.; Yates, J.R.; Hays, L.; Morgan, W.F.; Petrini, J.H.: The hMre11/hRad50 protein complex and Nijmegen breakage syndrome: linkage of double-strand break repair to the cellular DNA damage response. *Cell* 93 (1998) 477–486