

---

## **Reparatur von durch Röntgenstrahlen induzierten DNA-Doppelstrangbrüchen in spezifischen *NotI* Restriktionsfragmenten humaner Fibroblasten: Zusammenfügung korrekter und inkorrektter Enden**

M. Löbrich, Gießen

Bei der Wechselwirkung von ionisierender Strahlung mit der DNA von menschlichen Zellen können neben Basenschäden, alkalilabilen Stellen, DNA-Protein-Vernetzungen und Einzelstrangbrüchen auch Doppelstrangbrüche entstehen. Letzteren kommt eine entscheidende Bedeutung zu, und es ist schon seit vielen Jahren bekannt, daß sie in Bezug auf Zellinaktivierung, Mutationen, Chromosomenaberrationen und neoplastische Transformationen eine bedeutende Rolle spielen. Eine Fehlreparatur von Doppelstrangbrüchen kann zu vererbbaaren genetischen Veränderungen führen und sich somit möglicherweise als maligne Entartung manifestieren. Nicht zuletzt aus diesem Grunde wird dem Studium der Doppelstrangbruch-Reparatur beträchtliche Aufmerksamkeit gewidmet, wobei die Frage nach der Reparaturqualität eine zentrale Rolle einnimmt.

Methoden, die üblicherweise zum Nachweis von genomischen Doppelstrangbrüchen in Säugetierzellen eingesetzt werden, umfassen die neutrale Sedimentationsanalyse, die neutrale Filterelution sowie in den letzten Jahren die Pulsfeldgelelektrophorese, bei welcher der ins Gel eluierbare DNA-Anteil (der sog. Fraction of Activity Released, oder FAR-Wert) quantifiziert wird. Diese Verfahren beruhen im wesentlichen auf der Analyse des durchschnittlichen Molekulargewichtes der strahleninduzierten DNA-Fragmente und sind zur Messung der von einer bestimmten applizierten Strahlendosis pro Genom induzierten Anzahl von Doppelstrangbrüchen gut geeignet. Werden sie jedoch zum Nachweis von Reparaturereignissen eingesetzt, so können damit keine Aussagen über die Reparaturqualität getroffen werden. Sämtliche Verbindungsereignisse von Doppelstrangbruchenden, ein Verbinden der ursprünglich zusammenhängenden Bruchenden, als auch ein Verbinden von Enden unterschiedlicher Doppelstrangbrüche führt in gleichem Maße zum Anstieg im durchschnittlichen Molekulargewicht und wird daher als Reparatur nachgewiesen. Außerdem ist es mit den erwähnten Verfahren nicht möglich, die Induktion und Reparatur der Brüche in ausgewählten Genombereichen zu untersuchen und somit DNA-Bereiche, die möglicherweise an der biologischen Schadensreaktion präferentiell beteiligt sind, zu identifizieren.

Ein in unserer Arbeitsgruppe entwickeltes Verfahren, die sog. Hybridisierungsmethode, erlaubt die Quantifizierung von Reparaturereignissen, bei denen ein Verbinden der korrekten, d.h. der ursprünglich zusammenhängenden Bruchenden auftritt, und ermöglicht außerdem den Nachweis von Fehlreparatur-Ereignissen. Das Verfahren umfaßt nach der Lyse von bestrahlten und zur Reparatur inkubierten Zellen einen Restriktionsverdau der gereinigten DNA mit selten schneidenden Restriktionsenzymen. Die erzeugten Restriktionsfragmente können, im Gegensatz zu intakten Chromosomen, elektro-phoretisch separiert und mit der Methode des "Southern-Blotting" auf eine

Trägermembran aus Nylon oder Nitrozellulose übertragen werden. Eine Hybridisierung mit radioaktiv markierten "single copy" DNA-Sonden, deren Sequenz nur ein einziges Mal im Genom auftritt und die demzufolge auch nur an einen DNA-Bereich hybridisieren, erlaubt den Nachweis eines ganz bestimmten Restriktionsfragmentes. Dadurch erscheint im Hybridisierungsbild für unbestrahlte Zellen ein Einbanden-Muster, während im Falle von auftretenden Doppelstrangbrüchen die Intensität dieser Bande abgeschwächt ist und eine Verschmierung des Signals unterhalb der Bande im niedrigeren Molekulargewichts-Bereich sichtbar wird. Durch Reparatur der Doppelstrangbrüche verschiebt sich diese Verschmierung wieder zu höherem Molekulargewicht, die ursprüngliche Bande des intakten Restriktionsfragmentes wird aber nur dann wiederhergestellt, wenn die korrekten Bruchenden verknüpft werden. Somit ist also durch eine Quantifizierung der Ursprungsbande die Messung von korrekten Verbindungs-Ereignissen möglich. Ein Vergleich der so erhaltenen Häufigkeit von korrekten Reparatur-Ereignissen mit Ergebnissen von Methoden, die sämtliche Verbindungs-Ereignisse nachweisen, wie z.B. die FAR-Methode, liefert dann die Fehlreparatur-Häufigkeit im untersuchten Restriktionsfragment. Durch den Einsatz unterschiedlicher DNA-Sonden zu verschiedenen Restriktionsfragmenten kann die Fehlreparatur-Häufigkeit in ganz bestimmten Genombereichen gemessen werden.

In primären menschlichen Hautfibroblasten wurde die Induktion der Brüchen nach Röntgenbestrahlung in drei unterschiedlichen *NotI*-Restriktionsfragmenten des langen Armes von Chromosom 21 quantifiziert. Die untersuchten Fragmente mit Größen von 1,2 Mbp, 2 Mbp und 3,2 Mbp ergaben eine identische Induktionsrate von sechs Doppelstrangbrüchen pro Gbp und Gy, was auf das Gesamtgenom bezogen ungefähr 40 Brüchen pro Gy Strahlendosis entspricht. In Reparaturexperimenten mit primären menschlichen Hautfibroblasten wurde das korrekte Verbinden von Bruchenden in zwei *NotI*-Restriktionsfragmenten untersucht. Sowohl nach einer akuten Bestrahlung von 80 Gy als auch nach verdoppelter Strahlendosis ergab sich in beiden untersuchten Fragmenten, daß ungefähr 25% aller initial induzierten Doppelstrangbrüche über ein Verbinden von inkorrekten Bruchenden behoben werden. Ebenso ergab sich durch Anwendung einer Methode, die auf einer Molekulargewichts-Analyse aller erzeugten Restriktionsfragmente beruht, eine Fehlreparatur-Häufigkeit von 25% im gesamten Genom. Dadurch konnte das mit der Hybridisierungsmethode erhaltene Ergebnis in den beiden untersuchten *NotI*-Fragmenten bestätigt und auf das gesamte Genom erweitert werden. Diese Fehlreparatur-Häufigkeit entspricht in etwa 10 Fehlreparatur-Ereignissen pro Zelle und Gy. Die Auflösung der Hybridisierungsmethode mit ungefähr 100 kbp, bei einem untersuchten Fragment von einigen Mbp, ist wesentlich größer als bei Methoden zur Messung von zytologisch beobachtbaren Austauschereignissen. So können z.B. Chromosomenaberrations-Untersuchungen mit Hilfe von *fluorescence in situ hybridization* (FISH) oder auch die Methode des *premature chromosome condensation* (PCC) Deletionen und interchromosomale Austauschaberrationen erst ab einer Größe von vielen Mbp registrieren, und die meisten intrachromosomalen Veränderungen wie Inversionen bleiben vollkommen unberücksichtigt. Dies erklärt die höhere Fehlreparatur-Häufigkeit von Doppelstrangbrüchen im Vergleich zu der Häufigkeit von Chromosomenaberrationen, die bei ungefähr einem nachweisbaren Ereignis pro Zelle und Gy liegt, und prädestiniert gleichzeitig die Hybridisierungsmethode zur quantitativen Erfassung und zum Studium der Entstehungsmechanismen von genetischen Veränderungen. Die Kinetik der Fehlreparatur-Ereignisse war in unseren Untersuchungen vergleichbar mit der Kinetik der Entstehung von Austauschaberrationen von Interpha-

se-Chromosomen, die mit der PCC-Methode gemessen wurden. Dies untermauert, daß die mit der Hybridisierungsmethode gemessenen Fehlreparatur-Ereignisse auf DNA-Ebene auch auf chromosomaler Ebene durch Aberrationen zum Ausdruck kommen, dort jedoch in Folge des stark begrenzten Auflösungsvermögens nur bedingt nachgewiesen werden können.

Besondere Anwendungsmöglichkeiten der beschriebenen Hybridisierungsmethode liegen in Untersuchungen zur Zellzyklusabhängigkeit der Fehlreparatur-Ereignisse, speziell in der Beantwortung der Frage, ob die Qualität der Reparatur in der G<sub>2</sub>-Phase des Zellzyklus bei Vorhandensein von Schwesterchromatiden verbessert ist. Dies würde dann auf ein Vorliegen von homologen Rekombinationsmechanismen bei der Doppelstrangbruchreparatur in Säugetierzellen schließen lassen. Einblicke in die enzymatischen Vorgänge bei der Verbindung von korrekten und inkorrekten Bruchenden ließen sich mit entsprechenden Nagetiermutanten gewinnen, deren Strahlenempfindlichkeit durch einen genau charakterisierten Enzymdefekt bei der Doppelstrangbruchreparatur bedingt ist. Weitere Anwendungsmöglichkeiten der Hybridisierungsmethode betreffen Studien zur intragenomischen Heterogenität der Doppelstrangbruch-Induktion und Reparatur. Dabei kommt der Abhängigkeit der Bruchinduktion und vor allem der Reparaturqualität von der Organisationsstruktur der DNA besondere Bedeutung zu. So sind möglicherweise DNA-Bereiche mit einer hohen Kopienzahl repetitiver Sequenzen oder etwa hoch transkriptionsaktive Genomregionen präferentiell an Fehlreparaturereignissen und somit an der biologischen Schadensreaktion beteiligt.