
Untersuchungen zu Entstehungsmechanismen chromosomaler Aberrationen nach ionisierender Bestrahlung

A. Wojcik, Warszawa, Polen

Chromosomale Aberrationen spielen in der Strahlenbiologie als Maß des Zellschadens von Anfang an eine besondere Rolle. Aus der Sicht des Strahlenschutzes erlangten chromosomale Aberrationen eine besondere Bedeutung als man in den 60er-Jahren anfang ihre Frequenz in menschlichen peripheren Lymphozyten als Maß einer hervorgegangenen Strahlenexposition zu untersuchen. Dieser biologische Dosimeter wird heute von vielen Arbeitsgruppen eingesetzt.

Trotz langjähriger Forschung sind die Entstehungsmechanismen chromosomaler Aberrationen immer noch nicht vollständig bekannt. In Anbetracht ihrer zentralen Rolle in der Strahlenforschung erscheinen Arbeiten, die zur Aufklärung der Entstehungsmechanismen von strahleninduzierten chromosomalen Veränderungen beitragen, notwendig und wichtig.

Eine offene Frage im Zusammenhang mit den Entstehungsmechanismen von Aberrationen ist der Zeitpunkt der Umwandlung von DNA Schäden in chromosomale Schäden. Lange Zeit wurde angenommen, dass der strahleninduzierte DNA Schaden nur während der ersten Interphase zur Entstehung chromosomaler Aberrationen führen kann. Diese Annahme führte dazu, dass bei der Analyse von Aberrationen großer Wert darauf gelegt wurde, nur die ersten Mitosen nach Bestrahlung zu untersuchen. Seit einigen Jahren gibt es immer mehr Hinweise darauf, dass zumindest bei einigen Zellsystemen DNA Schäden auch während der späteren Zellzyklen nach Bestrahlung zur Entstehung neuer Aberrationen führen können. Weissenborn und Streffer [4] haben in Präimplantationsembryonen der Maus die Aberrationsfrequenz in den ersten drei Zellzyklen nach Bestrahlung mit Röntgenstrahlen und Neutronen analysiert und fanden Aberrationen, die während der zweiten und dritten Interphase nach Bestrahlung entstanden sind. Da dieser Effekt nach Bestrahlung mit Neutronen besonders deutlich war, lag die Vermutung nahe, dass die verantwortlichen Läsionen DNA Doppelstrangbrüche sind. Um diese Hypothese zu testen, haben wir Versuche durchgeführt, in denen Präimplantationsembryonen im Zygotenstadium mit dem Restriktionsenzym Alu I behandelt wurden, welches ausschließlich DNA Doppelstrangbrüche induziert. Die Untersuchung der Aberrationsfrequenz in den ersten drei Nachbehandlungsmetaphasen ergab, dass nach Alu I keine neuen Aberrationen in den späteren Interphasen entstehen. Somit kann angenommen werden, dass nach Bestrahlung andere Läsionen als DNA Doppelstrangbrüche für den beobachteten Effekt verantwortlich sind [5].

Ein Thema der biologischen Strahlenforschung, welches für die Risikoabschätzung von Strahlung im niedrigen Dosisbereich von Interesse ist, ist das Phänomen des "Adaptive Response". Hierunter versteht man, dass eine kleine Strahlendosis eine erhöhte zelluläre Strahlenresistenz induzieren kann, bzw. dass die Wirkung einer darauffolgenden,

größeren Strahlendosis kleiner ist, als dieses ohne eine Vorbestrahlung der Fall wäre [7]. "Adaptive Response" wird immer wieder in der Diskussion herangezogen als Hinweis darauf, dass niedrige Strahlenexpositionen eine Steigerung der Strahlenresistenz bewirken können und daher für Überlegungen des Strahlenschutzes vorzusehen sind. Es ist bemerkenswert, dass trotz zahlreicher Untersuchungen die Frage nach den Mechanismen von "Adaptive Response" offen ist. Wir nutzten die Präimplantationsembrionen der Maus dazu, zu analysieren, ob Extrakte aus Zellen, die ein "Adaptive Response" zeigen, Faktoren enthielten, welche in anderen Zellen ein "Adaptive Response" hervorrufen können. Zygoten der Maus wurden mit Extrakten aus adaptierten Jurkat Zellen mikroinjiziert, anschließend bestrahlt und in der ersten Mitose fixiert. Die Analyse chromosomaler Aberrationen zeigte, dass die Injektion von Extrakten aus adaptierten Zellen kein "Adaptive Response" in den Embryonen hervorruft [3]. Interessanterweise beobachteten wir erniedrigte mitotische Indizes in den Embryonen, die mit Extrakten aus adaptierten Jurkat Zellen injiziert wurden, was darauf hindeutet, dass die Extrakte der adaptierten Zellen Faktoren enthielten, die die Zellzykluskinetik der Embryonen beeinflussten. Dieses Ergebnis verdeutlicht die Komplexität des Phänomens "Adaptive Response" [7].

Seit der Entdeckung, dass ionisierende Strahlung chromosomale Aberrationen induzieren kann, wurde die Frage verfolgt, ob die Verteilung von Aberrationen auf den Chromosomen zufällig ist. Trotz intensiver Forschung konnte keine Übereinstimmung darüber getroffen werden, welche Chromosomen mehr oder weniger Aberrationen aufweisen als es ihrem DNA Gehalt entsprechen würde. Die Ursache für die fehlende Übereinstimmung der Ergebnisse ist nicht geklärt. In den meisten Studien wurden entweder die Zellen eines Spenders untersucht, oder die Ergebnisse von Zellen mehrerer Spender zusammengefasst. Eine mögliche Erklärung der heterogenen Ergebnisse könnte sein, dass es individuelle Unterschiede in der Strahlenempfindlichkeit einzelner Chromosomen gibt. Wir haben mit "Chromosome Painting" die strahleninduzierten Aberrationsfrequenzen in den Chromosomen 1 und 2 von zwei Spendern untersucht [8]. Es zeigte sich, dass in Zellen beider Spender die Strahlenempfindlichkeit der beiden Chromosomen unterschiedlich ist und zudem von der Art der Aberration abhängt. Ferner zeigte sich, dass die Ergebnisse nicht immer reproduzierbar waren. Dieser Befund deutet darauf hin, dass intraindividuelle Schwankungen für das Fehlen eindeutiger Ergebnisse bezüglich der Strahlenempfindlichkeit individueller Chromosomen mitverantwortlich sind.

Eine Form chromosomaler Aberrationen, die erst in den 50er-Jahren eindeutig nachgewiesen wurde, sind Schwesterchromatidaustausche. Ihre Entstehungsmechanismen sind bis heute weitgehend unbekannt. Schwesterchromatidaustausche können sichtbar gemacht werden, wenn Zellen über zwei S-Phasen 5-Brom-2'-desoxyuridin (BrdU) in die DNA einbauen und anschließend fixiert und entsprechend gefärbt werden. Obwohl sie ein Ausdruck homologer Rekombination sind, weiss man nicht genau, welche Läsionen zur Schwesterchromatidaustausch-Entstehung führen. Fest steht, dass alkylierende Agenzien sehr effizient Schwesterchromatidaustausche induzieren. Ionisierende Strahlung hingegen löst Schwesterchromatidaustausche nur dann aus, wenn Zellen, die über einen Zellzyklus BrdU eingebaut haben in der folgenden G₁ Phase bestrahlt werden. Einige Autoren haben angenommen, dass strahleninduzierte Schwesterchromatidaustausche gar keine „echten“ Schwesterchromatidaustausche sind, sondern auf Inversionen zurückzuführen sind und somit „falsche“ Schwesterchromatidaustausche darstellen. Um diese Hypothese zu testen, haben wir eine Methode

angewendet, mit der die Frequenz von strahleninduzierten Inversionen und Schwesterchromatidaustauschen verglichen werden konnte. Menschliche Lymphozyten wurden über eine S-Phase mit BrdU kultiviert, in der folgenden G₁ Phase bestrahlt und bis zur nächsten Mitose ohne BrdU weiterkultiviert. Die so gewonnenen mitotischen Zellen hatten BrdU nur in der einen Chromatide eingebaut, wodurch eine differentielle Färbung mit einem Fluorochromgekoppelten anti-BrdU Antikörper möglich war. Gleichzeitig hybridisierten wir die Zellen mit einer FISH-Sonde, welche mit der p14 Bande des Chromosoms 3 hybridisierte. Nun haben wir die Frequenz von solchen parazentrischen, interstitiellen Schwesterchromatidaustauschen untersucht, in welchen das FISH-Signal terminal eingebunden war. In den Schwesterchromatidaustauschen, die auf eine Inversion zurückzuführen sind, müsste das FISH-Signal in Relation zum Zentromer verschoben sein. Die Untersuchung ergab eindeutig, dass das in den meisten Fällen nicht der Fall war [6]. Es ist also klar, dass entgegen der früheren Annahmen locker ionisierende Strahlung „echte“ Schwesterchromatidaustausche induzieren kann, zumindest in Zellen, die mit BrdU markiert wurden.

Dieses Ergebnis erlaubt keine Aussage bezüglich der DNA Läsionen, die zur Entstehung von Schwesterchromatidaustauschen führen. Die gängige Methode des Schwesterchromatidaustausch-Nachweises beruht auf der Verwendung von BrdU, einer Substanz, welche in der Position 5 des Pyrimidinrings halogeniert ist und insbesondere nach ionisierender Bestrahlung zur radikalen Dissoziation neigt. Dabei entsteht ein Uracilradikal, welches selbst DNA Schäden und möglicherweise Schwesterchromatidaustausche induziert. Wir waren daran interessiert, ob ionisierende Strahlung niedriger LET auch Schwesterchromatidaustausche in Zellen induzieren kann, welche gar kein BrdU eingebaut haben. Um dieses Ziel zu erreichen, entwickelten wir eine Methode, mit der Zellen in vivo mit Biotin-16-2'-desoxyuridin-5'-triphosphat (Biotin-dUTP) markiert werden konnten [1, 2]. Auf Grund seiner chemischen Struktur konnte angenommen werden, dass Biotin-dUTP unter Bestrahlung keine radikalische Reaktion zeigt. Der Nachweis einer Inkorporation in die DNA erfolgte mit fluoreszenzmarkiertem Avidin. Die Versuche, die mit Biotin-dUTP und Röntgenstrahlen durchgeführt wurden, ergaben eine niedrigere Frequenz von Schwesterchromatidaustauschen als das mit BrdU der Fall war. Somit konnten Strahlenschäden im BrdU als eine wesentliche Quelle von Läsionen, die zur Entstehung von „echten“ Schwesterchromatidaustauschen führen, eindeutig nachgewiesen werden.

Literatur

- [1] Bruckmann, E.; Wojcik, A.; Obe, G.: *Chrom. Res.* 7 (1999a) 185–189
- [2] Bruckmann, E.; Wojcik, A.; Obe, G.: *Chrom. Res.* 7 (1999b) 277–288
- [3] Shadley, J.D.; Wojcik, A.; Bonk, K.; Streffer, C.: *Nukleonika* 42 (1997) 629–640
- [4] Weissenborn, U.; Streffer, C.: *Int. J. Radiat. Biol.* 54 (1988) 381–394
- [5] Wojcik, A.; Bonk, K.; Müller, W.-U.; Obe, G.; Streffer, C.: *Radiat. Res.* 145 (1996) 119–127
- [6] Wojcik, A.; Opalka, B.; Obe, G.: *Mutagenesis* 14 (1999) 633–637

- [7] Wojcik, A.; Shadley, J.D.: Human Epidemiological Risk Assessment 6 (2000) 281–300
- [8] Wojcik, A.; Streffer, C.: Int. J. Radiat. Biol. 74 (1998) 573–581