

Genomische Instabilität von AT-Zellen

Horst D. Lohrer, Hedwig Richter, Nicole Stephan, Manfred Bauchinger, Albrecht M. Kellerer

Zusammenfassung

Zellen mit erhöhter spontaner Frequenz von chromosomalen Aberrationen werden durch den Phänotyp „genomische Instabilität“ charakterisiert. Behandlung von Zellen mit DNA-schädigenden Agenzien führt über bisher unbekannt Mechanismen ebenfalls zu genomischer Instabilität. Ziel unserer Experimente war: i) die Induktion von genomischer Instabilität auf die Instabilität von Mikrosatelliten zu übertragen, und ii) den Verlauf der Instabilität in den folgenden Zellgenerationen zu bestimmen. Unsere Ergebnisse mit primären Kontrollzellen zeigen eine drastische Erhöhung der Instabilität des Mikrosatelliten im DNA-Reparaturgen XRCC5 unmittelbar nach der Bestrahlung mit 0,5 Gy Röntgenstrahlen, die in den folgenden Passagen weiter ansteigt. In Zelllinien mit defektem ATM Gen finden wir einen hohen Anteil von Zellen mit spontanen Veränderungen im Mikrosatelliten des XRCC5 Gens, der jedoch nach Behandlung mit ionisierenden Strahlen absinkt. Eine mögliche Ursache dieser Abnahme der Instabilität von Mikrosatelliten in Ataxia telangiectatica-Zellen nach Bestrahlung könnte die Apoptose der genomisch instabilsten Zellen sein.

Schlüsselwörter

Ataxia telangiectatica, genomische Instabilität, XRCC5

Summary

Genomic instability of AT cells

Recently, alterations in microsatellite sequences have been employed as a measure for genomic instability. We wanted to determine whether increased genomic instability after DNA damage was mirrored by a rise in microsatellite instability and its course during following cell generations. We found that untreated normal primary human fibroblasts at low passage number exhibited in less than 1% of the cells alterations of the microsatellite in the XRCC5 gene. Exposure of these cells to 0.5 Gy of X-rays increased the proportion of cells with alterations to 3%, which augmented further during cultivation of the cells to 14% and 15% at passage 5 and 10 respectively. Non-irradiated cells also showed an increase of XRCC5 microsatellite instability with time of cultivation (2% and 8% of the cells with sequence alterations at passages 5 and 10 respectively), however, well below the radiation-induced instability. Cells from patients suffering from Ataxia telangiectasia (AT) exhibited increased levels of microsatellite instability. In the SV40 transformed cell line AT5BI-VA, we found 28% of the cells with spontaneous alterations in the XRCC5 microsatellite as compared to 1–2% in various normal SV40 transformed cell lines. Unexpectedly, exposure of AT5BI-VA cells to 0.5 Gy X-rays reduced microsatellite instability to 12%. It is conceivable that this diminution of cells with XRCC5 microsatellite sequence alterations could be due to increased apoptosis of the most unstable cells.

Keywords

Ataxia telangiectasia, genome instability, XRCC5

Das Genom ist die Gesamtheit der DNA einer Zelle und stellt die genetische Information und somit den Bauplan des Organismus dar. In höheren Organismen ist die DNA im Zellkern konzentriert und in Chromosomen organisiert, und ihre Unversehrtheit wird durch vielerlei Mechanismen gesichert. Das fehlerhafte Arbeiten eines dieser Schutzmechanismen in einer Körperzelle führt zu Veränderungen der Sequenz der DNA und somit zu genomischer Instabilität. In seltenen Fällen kann dies der erste Schritt zur malignen Entwicklung einer Zelle sein. Kommt es bereits in den Keimbahnzellen zum Verlust der genetischen Information für einen der DNA-Kontrollmechanismen, dann hat dies schwere Erbkrankheiten und eine drastische Erhöhung des Tumorrisikos zur Folge. In Tabelle 1 sind Beispiele von Instabilitäts-Syndromen aufgeführt. In den Körperzellen der betroffenen Patienten werden vermehrt chromosomale Veränderungen und eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber DNA-schädigenden Agenzien beobachtet (1).

Bisher befindet sich die Charakterisierung der in diesen Syndromen fehlenden Genprodukte noch in den Anfängen. Auch für AT, das am besten untersuchte Syndrom, sind noch viele Fragen der Funktion des ATM-Proteins ungeklärt. Wir wissen jedoch, daß dem ATM-Molekül eine Schlüsselrolle in der Regulation der Signalketten zwischen einem DNA-Schaden und der Steuerung des Zellzyklus, der DNA-Reparatur und der Apoptose zukommt. Der Ausfall des ATM-Moleküls führt zur ungenügenden Aktivierung von DNA-Reparatur, zur Stimulierung der DNA-Rekombination, zur Mißachtung von Kontrollpunkten im Zellzyklus und der Deregulierung der Apoptose. Auf der zellulären Ebene ist das Ergebnis eine erhöhte Frequenz chromosomaler Aberrationen und eine verminderte Resistenz gegenüber ionisierenden Strahlen (2; 3).

Als Indikatoren für die Instabilität des Genoms wurden bisher entweder Chromosomenaberrationen oder HPRT- Genmutationen benutzt. Wir wollten diesen Methoden die Genomanalyse mit Hilfe von Mikrosatelliten zur Seite stellen. Mikrosatelliten

Tab 1

Beispiele von Syndromen mit genomischer Instabilität

| Syndrom | Gen | Genprodukt | Zellulärer Phänotyp |
|---------------------------|----------|-------------------|------------------------|
| Ataxia teleangiectacia | ATM | PI3 verw., Kinase | X-sens., Rekomb. ↑ |
| Bloom's Syndrom | BLM | RecQ Helikase | SCA α, frühe Seneszenz |
| Cockaynes Syndrom | CSA,-B | Helikase? | UV-sens., kein TCR |
| Fanconis Anämie | FA-A,C,G | Signalprotein? | MMC-sens., Rekomb. ↑ |
| Nijmegen Breakage Syndrom | NBS1 | meiot. Rekomb. | X-sens., Rekomb. ↑ |
| Xeroderma pigmentosum | XP(A-H) | NER Cofaktor | UV-sens., SCA ↑ |
| Werner Syndrom | WRN | RecQ Helikase | Progeria, Chrom.Aberr. |

Abkürzungen

PI3 rel = PI3 verwandte Proteine; X-sens. = röntgenstrahlen-empfindlich;

Rekomb = Rekombination; SCE = Schwesterchromatid-Austausch; UV-sens = UV-empfindlich;

TCR = Transcription Coupled Repair; MMC sens = Mitomycin C-empfindlich;

Chrom.Aberr. = Chromosomen-Aberrationen; NER = Nucleotide Excision Repair

Tab 2

Instabilität des Mikrosatelliten im XRCC5 DNA-Reparaturgen in AT5BI-VA und atxbc Subklonen

Nach Bestrahlung mit 0,5 Gy Röntgenstrahlen (zwei unabhängige Experimente)

| Zellen | | XRCC5 (exp 1) | XRCC5 (exp 2) |
|----------|-----------|---------------|---------------|
| AT5BI-VA | Kontrolle | 32% | 24% |
| AT5BI-VA | 0,5 Gy | 14% | 10% |
| atxbc | Kontrolle | 22% | nd |
| atxbc | 0,5 Gy | 16% | nd |

sind Wiederholungen kurzer DNA-Sequenzen von 1 bis 5 Nukleotiden, die mit großer Häufigkeit im menschlichen Genom zu finden sind. Sequenzanalysen zeigten, daß die Anzahl der Kopien der Wiederholungssequenz variieren kann. Nur ganz wenige Mikrosatelliten sind in kodierenden Sequenzen gefunden worden und als molekulare Ursache von Erbkrankheiten identifiziert worden. Die überwältigende Mehrheit der Mikrosatelliten befinden sich in nicht-kodierenden Sequenzen und ihre Veränderungen treten nicht als Phänotyp in Erscheinung. Solche Polymorphismen sind in Mikrosatelliten sehr häufig und aus diesem Grund sind auch meistens beide Allele eines Mikrosatelliten-Lokus unterscheidbar.

Experimentell lassen sich Veränderungen in der Mikrosatellitensequenz durch die Amplifikation des Sequenzbereiches mittels einer Polymerase-Ketten-Reaktion, gefolgt von einer Gel-Elektrophorese nachweisen. Unser experimenteller Aufbau ist dabei folgendermaßen: Die Hälfte einer Population von Zellen wird mit 0,5 Gy Röntgenstrahlen behandelt, die andere Hälfte dient als Kontrolle. Nach der Behandlung werden beide Zellpopulationen in 96-well Kulturschalen subkloniert, und nach 10 bis 14 Tagen wird die DNA von Einzelzellklonen isoliert. Um einen zeitlichen Verlauf der Instabilität von Mikrosatelliten in der bestrahlten Population zu erhalten, werden die nicht zur Subklonierung verwendeten Zellen weiter kultiviert und nach jeweils 5 Passagen subkloniert.

In einem ersten Experiment haben wir die Instabilität von Mikrosatelliten in primären, normalen menschlichen Fibroblasten (SAM) untersucht. Dazu wurden primäre SAM Zellen mit 0,5 Gy Röntgenstrahlen behandelt und während der 1., 5., 10. und 15. Passage subkloniert. Die DNA der Zellklone wurde extrahiert und die Sequenz des Mikrosatelliten im XRCC5 Gen untersucht (4). Unbestrahlte SAM Zellen dienten als Kontrolle.

Zu Beginn des Experiments war in der unbestrahlten Kontrolle eine Veränderung der Sequenz des Mikrosatelliten im XRCC5 DNA-Reparaturgen in weniger als 1% der Subklone nachweisbar (offene Symbole). Mit der Kultivierung der Zellen stieg auch die Instabilität dieses Mikrosatelliten auf 9% bei Passage 10. Danach beobachteten wir ein Absinken der Instabilität. Im Gegensatz zur Kontrolle waren in den bestrahlten SAM Zellen in 3% der Subklone Veränderungen im Mikrosatelliten des XRCC5 Gens sofort nach der Bestrahlung nachweisbar (ausgefüllte Symbole). Dieser Wert stieg weiter auf 15% und 16% in den Passagen 5 und 10. Analog zu den Kontrollen fällt auch in den bestrahlten Zellen der Anteil der veränderten Mikrosatelliten wieder ab.

Für die Untersuchung der Instabilität von Mikrosatelliten in AT-Zellen standen uns die SV40 immortalisierte Zelllinie AT5BI-VA zur Verfügung. Als Kontrollzelllinie diente die von AT5BI-VA abgeleitete, strahlenresistente Revertante atxbc, die jedoch über kein in-

taktes ATM Gen verfügt (5). Wegen der Immortalisierung der Zellen war eine Bestimmung des zeitlichen Ablaufes der Instabilität nach Bestrahlung nicht möglich. Die generell hohen Werte der Instabilität von Mikrosatelliten in Subklonen der unbestrahlten AT5BI-VA und atxbc Zellen führen wir auf das Fehlen des ATM Gens zurück. Auffällig ist jedoch, daß nach Bestrahlung sowohl die AT5BI-VA, als auch die atxbc Subklone geringere Instabilität zeigen. Dieses überraschende Ergebnis könnte durch die Induktion der Apoptose in AT-Zellen nach Bestrahlung erklärt werden (6, 7). Wir gehen davon aus, daß ionisierende Strahlung zur Induktion genomischer Instabilität führt, die ihrerseits ein Signal zur Einleitung der Apoptose darstellen könnte. Der „programmierte Zelltod“ würde präferentiell in Zellen mit hoher Instabilität des Genoms induziert werden, die dann nicht mehr der Subklonierung zur Verfügung stehen würden. Dies würde in unserem Experiment den Anteil von Subklonen mit Veränderungen in der Mikrosatellitensequenz reduzieren. Unsere Experimente zeigen, daß eine kleine Dosis ionisierender Strahlung in primären Kontrollzellen eine Instabilität von Mikrosatelliten auslöst. In Zelllinien mit defektem ATM Gen finden wir einen hohen Anteil von Zellen mit spontanen Veränderungen im Mikrosatelliten des XRCC5 Gens, der nach Behandlung mit ionisierenden Strahlen absinkt. Zukünftige Experimente werden zeigen, ob diese Verminderung des Anteils veränderter Mikrosatelliten auf der Induktion der Apoptose beruht.

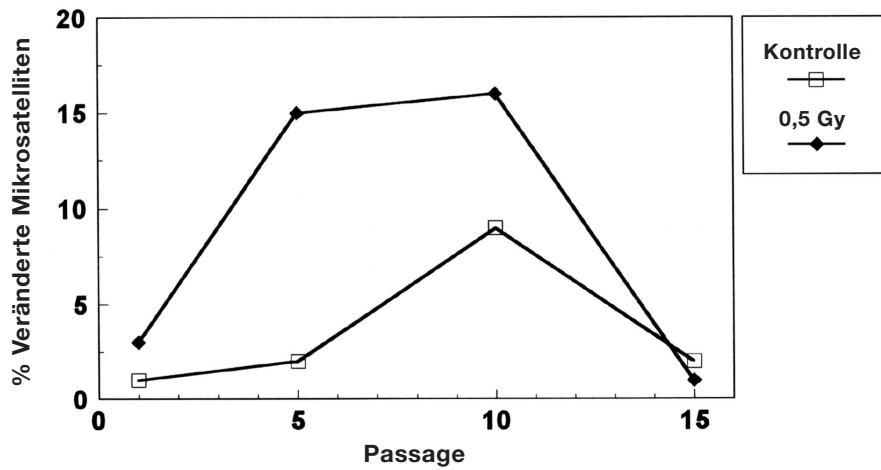


Abb 1
Instabilität des Mikrosatelliten im XRCC5 DNA-Reparaturgen von primären SAM-Fibroblasten
 Nach Bestrahlung mit 0,5 Gy Röntgenstrahlen

Danksagung

Sara Bourne, Ludwig Hieber, Penny Jeggo, Thomas Jung, Penny Lagen, Bob Liddell, Stephen Mitchell und Kay Wilson haben auf verschiedene Weise zum Gelingen unserer Experimente beigetragen. Für die Bereitstellung finanzieller Mittel bedanken wir uns bei der Ataxia Society, dem Gray Laboratory Cancer Research Trust und dem Bundesamt für Strahlenschutz.

Literatur

1. Digweed M (1993) Human genetic instability syndromes: Single gene defects with increased risk of cancer. *Toxicology Letters* 67: 259-281.
2. Shiloh Y (1997) Ataxia telangiectasia and the Nijmegen Breakage syndrome: Related disorders but genes apart. *Annu Rev Genet* 31: 635-662.
3. Lohrer HD (1996) Regulation of the cell cycle following DNA damage in normal and Ataxia telangiectasia cells. *Experientia* 52: 316-328.
4. Taccioli GE, Gottlieb TM, Blunt T, Priestley A, Demengeot J, Mizuta R, Lehmann AR, Alt FW, Jackson SP, Jeggo PA (1994) Ku80: product of the XRCC5 gene and its role in DNA repair and V(D)J recombination. *Science* 265: 1442-1445.
5. Lohrer HD, Tangen U, Anderson RF, Arrand JE (1994) Characterization of a hybrid Hamster-human cell line complemented for the Ataxia telangiectasia DNA repair defects. *Pathobiology* 62: 140-148.
6. Herzog KH, Chong MJ, Kapsetaki M, Morgan JI, McKinnon PJ (1998) Requirement for ATM in ionizing radiation-induced cell death in the developing central nervous system. *Science* 280:1089-1091.
7. Meyn MS, Strasfeld L, Allen C (1994) Testing the role of p53 in the expression of genetic instability and apoptosis in ataxia-telangiectasia. *Int J Radiat Biol* 66:141-151.