

Detektion von Chromosomenaberrationen durch Drei-Farben-Fluoreszenz in situ Hybridisierung in AT Homozygoten und Heterozygoten

Susann Neubauer, Markus Stumm, Rolf Sauer, Erich Gebhart

Zusammenfassung

Mit einer speziellen Fluoreszenz in situ Hybridisierungs (FISH) Technik, der Drei-Farben-FISH Technik, wurde die spontane und induzierte Chromosomeninstabilität in Ataxia teleangiectatica (AT) Homozygoten und Heterozygoten sowie in unauffälligen Kontrollpersonen untersucht. Lymphozyten der strahlenempfindlichen AT Patienten zeigten dabei die höchste spontane Chromosomeninstabilität und die meisten Chromosomenaberrationen nach in vitro Bestrahlung. Unauffällige Kontrollpersonen zeigten dagegen vergleichsweise geringe Chromosomenaberrationsraten, während die Aberrationsraten von Lymphozyten obligat AT Heterozygoter zwischen jener beider Gruppen lagen. Diese erhöhte Chromosomenbrüchigkeit bei AT Homo- und Heterozygoten zeigte sich aber nicht nur quantitativ, sondern insbesondere auch qualitativ, durch das Auftreten von komplexen Rearrangements. Somit stehen durch die Drei-Farben-FISH Technik, sowohl ein quantitativer (Bruchereignisse pro Mitose) als auch ein qualitativer Parameter (komplexe Aberrationen) zur Erfassung erhöhter Strahlenempfindlichkeit in AT Homozygoten und Heterozygoten zur Verfügung.

Schlüsselwörter

FISH-Technik, „whole chromosome painting“, Ataxia teleangiectatica, komplexe Chromosomenaberrationen, Chromosomeninstabilität

Summary

Molecular cytogenetics in ataxia telangiectasia

Ataxia telangiectasia (AT) patients, AT heterozygotes and healthy control individuals have been analyzed for spontaneous and induced chromosome instability after in vitro irradiation using a special fluorescence in situ hybridization (FISH) technique, a three color FISH approach. Patients with AT are known to be radiosensitive and their lymphocytes presented with the highest cytogenetic reaction in our approach. Healthy control individuals showed only a mild reaction, whereas the reaction of obligate AT heterozygotes was intermediate. The enhanced radiosensitivity of AT homo- and heterozygotes could be detected by two parameters: on the one hand an increased level of breakpoints per mitosis, and on the other hand elevated frequency of complex rearrangements.

Keywords

FISH-technique, „whole chromosome painting“, ataxia telangiectasia, complexe rearrangements, chromosome instability

Charakteristisch für Ataxia teleangiectatica (AT) Patienten ist eine besonders hohe Empfindlichkeit gegenüber ionisierendem Strahlen und ein stark erhöhtes Tumorrisiko (1). Die klinisch unauffälligen AT heterozygoten Genträger sind möglicherweise ebenfalls mit einem erhöhten Krebsrisiko belastet (2,3,4) und zeigen in vitro eine leicht erhöhte Strahlenempfindlichkeit (5,6,7).

Wir haben mit Hilfe der Drei-Farben-Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) die spontane und strahleninduzierte Chromosomeninstabilität in AT Homozygoten und Heterozygoten analysiert, um zu prüfen, ob sich diese Technik zur zytogenetischen Differentialdiagnostik dieser Probanden eignet. Frühere Studien konnten bereits zeigen, daß Chromosomeninstabilität in Tumorpatienten mit Hilfe der Drei-Farben-FISH mit spezifischen Sonden für die Chromosomen #1, #2 und #4 erfaßt werden kann (8,9).

In unserer Studie wurden Lymphozyten und lymphoblastoide Zelllinien (LCLs) von 7 AT Patienten, lymphoblastoide Zelllinien von 5 AT heterozygoten Genträgern sowie 19 Blutproben von 9 unauffälligen Kontrollpersonen untersucht (Tab 1).

Die Lymphozytenproben wurden aliquotiert und mit einer Dosis von 0,7 und 2,0 Gy bestrahlt. Ein Aliquot blieb unbestrahlt und diente als Kontrolle. Nach 48 Stunden Kultivierung erfolgte die Chromosomenpräparation und anschließend ein „whole chromosome painting“ (WCP) mit Sonden spezifisch für die Chromosomen #1, #2 und #4. Die Präparate wurden an einem Fluoreszenzmikroskop mit einem Dreifach-Filter (DAPI/FITC/Texas Red) ausgewertet. Nur Metaphasen mit sechs markierten Chromosomen wurden in die Bewertung aufgenommen. Ein Chromosom mit einem Farbwechsel und einem Zentromer wurde als Translokation gewertet. Einfache Translokationen (terminale Translokationen, reziproke Translokationen), sowie dizentrische Chromosomen und Ringchromosomen mit den dazugehörigen azentrischen Fragmenten, wurden als zwei Bruchereignisse gewertet. Azentrische Fragmente wur-

Tab 1
Bruchereignisse in AT Homozygoten, AT Heterozygoten und Kontrollpersonen

Pat. ID.		0 Gy			0,7 Gy			2,0 Gy		
		n	B/M	Bc/M	n	B/M	Bc/M	n	B/M	Bc/M
AT104	Blut	922	0,07	0	401	0,35	0,01	293	1,47	0,41
AT108	Blut	391	0,09	0	-	-	-	51	1,43	0
AT120	Blut	938	0,08	0	409	0,28	0,04	193	1,35	0,24
AT106	LCL	465	0,01	0,01	400	0,48	0,08	200	1,46	0,31
AT14	LCL	445	0,01	0,01	288	0,46	0,01	142	1,85	0,34
ATBer23	LCL	800	0,05	0,01	400	0,75	0,11	200	3,29	1,29
94P574	LCL	568	0,04	0	400	0,68	0,10	200	2,72	0,67
Σ 7 AT		4529	0,063± 0,03	0,004± 0,005	2298	0,50± 0,17	0,05± 0,03	1177	1,92∇ 0,72	0,47∇ 0,38
94P575	LCL	931	0,02	0	419	0,20	0,03	200	1,79	0,63
94P576	LCL	473	0,04	0	401	0,21	0,07	195	1,43	0,38
95P587	LCL	949	0,02	0	400	0,15	0,02	200	1,50	0,33
95P586	LCL	948	0,01	0	400	0,25	0,02	195	1,16	0,26
95P585	LCL	758	0,02	0	385	0,28	0,06	200	0,67	0,16
Σ 5 AT-H		4059	0,02± 0,01	0	2005	0,22± 0,04	0,04± 0,02	990	1,31∇ 0,38	0,35∇ 0,16
Kontroll- personen (19)	Blut	16836	0,009± 0,004	0,002± 0,003	6822	0,09± 0,04	0,01± 0,02	3567	0,46∇ 0,15	0,07∇ 0,05

n = Anzahl der ausgewerteten Mitosen

B/M = Brüche pro Mitose

Bc/M = Brüche aus komplexen Aberrationen pro Mitose

Die bei 0,7 Gy und 2,0 Gy angegebenen Werte verstehen sich als die Bruchraten abzüglich der Spontanrate

den als ein bzw. zwei Bruchereignisse beurteilt, wenn sie markiert waren und/oder einen Farbwechsel aufwiesen. Aberrationen, die durch drei oder mehr Brüche zwischen zwei oder mehr Chromosomen entstanden sind, wurden als komplexe Rearrangements gewertet (10). Als Endpunkte der Untersuchung dienten Brüche pro Mitose (B/M) und komplexe Aberrationen.

Mit den so erhobenen Daten konnten deutliche Unterschiede zwischen AT Homozygoten und gesunden Kontrollpersonen ermittelt werden. Lymphozyten von AT Patienten wiesen die höchste spontane Chromosomeninstabilität auf. Verglichen mit den Spontanraten in Lymphozyten gesunder Kontrollpersonen ereigneten sich in Lymphozyten von AT Patienten 7 mal häufiger spontane Aberrationen. Auch bei 4 AT Heterozygoten konnte eine erhöhte Spontanbruchrate gefunden werden (Tab 1).

Nach in vitro Bestrahlung zeigten die AT Patienten die stärkste zytogenetische Reaktion (Abb 1). Doch auch die Lymphozyten von AT heterozygoten Genträgern wiesen nach in vitro Bestrahlung eine erhöhte Anzahl von Aberrationen auf. Die induzierten Bruchereignisse lagen deutlich höher als die unauffälliger Kontrollpersonen (Abb 1). In den Lymphozyten von AT Homozygoten fanden sich nach in vitro Bestrahlung aber nicht nur die höchste Anzahl an Brüchen pro Mitosen sondern auch die höchste Zahl an komplexen Rearrangements. Auch bei

den AT Heterozygoten zeigte sich eine erhöhte Strahlenempfindlichkeit unter Berücksichtigung beider Parameter (Abb 2).

Durch die Lokalisation (11) und die Isolierung des ATM Gens (12), stehen zur Diagnose von AT Patienten molekulargenetische Methoden zur Verfügung. Nach wie vor sind aber zytogenetische Untersuchungen ein wichtiger Parameter in der Differentialdiagnostik der AT. Die zytogenetische Analyse von AT Patienten ist jedoch schwierig, da sich die T-Lymphozyten in vielen Fällen nur schwer stimulieren lassen (11). Alternativ dazu können Epstein-Barr-Virus (EBV) transformierte B-Lymphozyten untersucht werden. Bislang wurden beide Zelltypen in der zytogenetischen Differentialdiagnostik der AT zur Auswertung von Bruchereignissen an konventionell gefärbten Präparaten erfolgreich und zuverlässig eingesetzt (13). Mit der Drei-Farben-FISH (#1, #2, #4) Technik kann eine erhöhte Chromosomeninstabilität und eine erhöhte Strahlenempfindlichkeit ebenfalls sicher erfaßt werden (14,15). In den Zellen von AT Homozygoten konnte mit dieser Methode eine 7-fach erhöhte spontane Chromosomenbrüchigkeit festgestellt werden, während eine 3- bis 4-fach erhöhte Spontanrate von anderen Autoren mit nur einem gefärbten Chromosom gefunden wurde (16).

Da aber nicht in allen AT Patienten eine erhöhte spontane Chromosomenbrüchigkeit nachweisbar ist, wurde zu-

sätzlich ein in vitro Radiosensibilitätstest eingesetzt. Die deutlichsten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen fanden wir nach Bestrahlung mit 0,7 Gy. Hier zeigten die Lymphozyten von AT Patienten eine 6-fach erhöhte Anzahl an B/M im Vergleich zu unauffälligen Kontrollen. Auch die Lymphozyten von AT Heterozygoten wiesen mehr als doppelt so viele Bruchereignisse im Vergleich zu Kontrollpersonen auf. Die eindeutige Erfassung AT Heterozygoter ist von großem Interesse, da es zur Zeit noch keinen zuverlässigen zytogenetischen Standardtest zur Identifizierung von Heterozygoten gibt. Einige Arbeitsgruppen konnten zwar mit dem sogenannten G2-Phase Assay eindeutig AT-heterozygote Genträger erfassen (7,17), andere dagegen erzielten mit demselben Test eine große Überlappung der bei Heterozygoten und der Kontrollgruppe beobachteten Aberrationsraten (18).

Bewertet man bei der Analyse zusätzlich einfache und komplexe Chromosomenaberrationen, ist eine weiterführende Differenzierung der unterschiedlichen Probandengruppen möglich.

Bei einer Gruppe von Tumorpatienten konnten wir bereits zeigen, daß eine erhöhte Rate an komplexen Aberrationen mit einer erhöhten Strahlenempfindlichkeit einher geht (15). In Zellen von AT Patienten traten komplexe Aberrationen bereits spontan mit einer 2- bis 3-fach erhöhten Frequenz im Vergleich mit Kontrollen oder AT Heterozygoten auf. Komplexe Umbauten

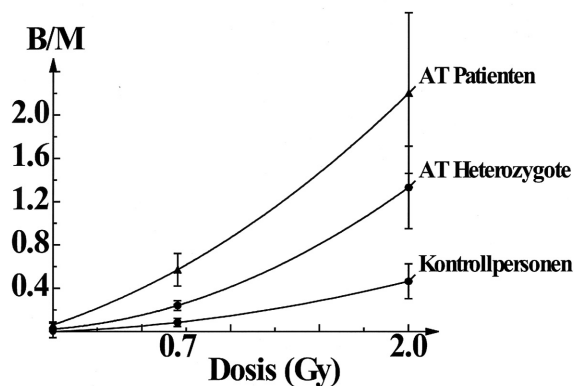


Abb 1
Chromosomale Reaktion nach in vitro Bestrahlung
 Der Kurvenverlauf wurde entsprechend der Gleichung $B/M = \gamma + \alpha D + \beta D^2$ angepaßt.

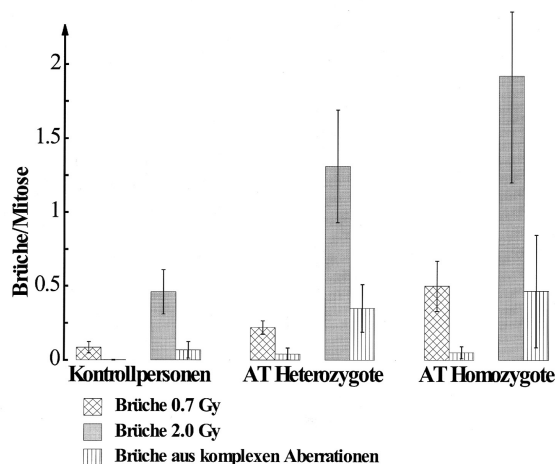


Abb 2
Chromosomenbruchfrequenzen aus allen Chromosomenbrüchen sowie aus komplexen Aberrationen

fanden sich aber am häufigsten nach Bestrahlung mit 2,0 Gy. In den Blutproben unauffälliger Kontrollpersonen fanden sich nach Bestrahlung mit 2,0 Gy nur 19 komplexe Rearrangements/1000 Mitosen, in Zellen von AT Heterozygoten lagen durchschnittlich 94 und bei AT Patienten 258 komplexe Rearrangements/1000 Mitosen vor (Daten nicht gezeigt). Die Drei-Farben-FISH Technik eignet sich damit zur Detektion von Chromosomeninstabilität in AT Homozygoten und AT Heterozygoten.

Die Untersuchung wurde gefördert von der Wilhelm-Sander Stiftung.

Literatur

- Rotman G, Shiloh Y (1998) ATM: from gene to function. *Hum Mol Genet* 7 (10) 1555-1563
- Swift A, Morrell D, Massey RB, Chase CL (1991) Incidence of cancer in 161 families affected by ataxia-telangiectasia. *N Engl J Med* 325: 1831-1836
- Swift M, Chase CL, Morrell D (1990) Cancer predisposition of ataxia-telangiectasia heterozygotes. *Cancer Genet Cytogenet* 46: 21-27
- Athma P, Pappaport R, Swift M (1996) Molecular genotyping shows that ataxia-telangiectasia heterozygotes are predisposed to breast cancer. *Cancer Genet Cytogenet* 92: 130-134
- Weeks DE., Paterson, MC, Lange K, Andrais B, Davis RC, Yoder F, Gatti RA (1991) Assessment of chronic gamma radiosensitivity as an in vitro assay for heterozygote identification of ataxia-telangiectasia. *Radiat Res* 128: 90-99
- West CML, Elyan SAG, Berry P, Cowan R, Scott D (1995) A comparison of the radiosensitivity of lymphocytes from normal donors, cancer patients, individuals with ataxia-telangiectasia (AT) and AT heterozygotes. *Int J Radiat Biol* 68: 127-2033
- Tchirkov A, Bay Jacques-Olivier, Pernin D, Bignon Y-J, Rio P, Grancho M, Kwiatkowski F, Giollant M, Malet P, Verelle P (1997) Detection of

heterozygous carriers of the ataxia-telangiectasia (ATM) gene by G2 phase chromosomal radiosensitivity of peripheral blood lymphocytes. *Hum Genet* 101: 312-316

8. Gebhart E, Neubauer S, Schmitt G, Birkenhake S, Dunst J (1996) Use of a three-color chromosome in situ suppression technique for the detection of past radiation exposure. *Radiat Res* 145: 47-52

9. Neubauer S, Gebhart E, Schmitt G, Birkenhake S, Dunst J (1996) Is chromosome in situ suppression (CISS) hybridization suited as a predictive test for intrinsic radiosensitivity in cancer patients? *Int J Oncol* 8: 707-712

10. Savage JRK and Simpson P (1994a) On the scoring of FISH „Painted“ chromosome-type exchange aberrations. *Mutation Res* 307: 345-353

11. Gatti RA, Berkel I, Boder E, Braedt G, Charmley P, Concannon P, Ersoy F, Foroud T, Jaspers NGJ, Lange K, Lathrop GM, Leppert M, Nakamura Y, O'Connell P, Paterson M, Saiser W, Sanal O, Silver J, Sparkes RS, Susi E, Weeks DE, Wei S, White R and Yoder F (1988) Localization of an ataxia-telangiectasia gene to chromosome 11q22-23. *Nature* 336: 577-580

12. Savitsky K, Bar-Shira A, Gitad S, Rotmann G, Ziv Y, Vanagaite L, Tagle DA, Smith S, Uziel T, Sfez S, Ashkenazi M, Pecker I, Frydman M, Harnik R, Patanjali SR, Simmons A, Clines GA, Sartiel A, Gatti RA, Chessa L, Sanal O, Lavin MF, Jaspers NGJ, Taylor AMR, Arlett CF, Miki T, Weissman SM, Lovett M, Collins FS and Shiloh Y (1995a) A single ataxia-telangiectasia gene with a product similar to PI-3 kinase. *Science* 268: 1749-1753

13. Waghray M, Gascon GG, Al-Sedairy S, Hannan MA (1991) Cytogenetic investigations in three cell types of a Saudi family with ataxia telangiectasia. *Hum Genet* 87:285-289

14. Dunst J, Neubauer S, Becker A, Gebhart E (1998) Chromosomal in vitro radiosensitivity of lymphocytes in radiotherapy patients and AT-homozygoten. *Strahlenther Onkol* 174 (10) 510-516

15. Neubauer S, Dunst J, Gebhart E (1997) The impact of complex chromosomal rearrangements on the detection of radiosensitivity in cancer patients. *Radiother Oncol* 43: 189-195

16. Pandita TK, Pathak S, Geard CR (1995) Chromosome end associations, telomeres and telomerase activity in ataxia telangiectasia cells. *Cytogenet Cell Genet* 71: 86-93

17. Sandford KK, Parshad R, Price FM, Jones GM, Tarone RE, Eiermann L, Hale P, Waldman TA (1990) Enhanced chromatid damage in blood lymphocytes after G2 phase X-irradiation, a marker of the ataxia-telangiectasia gene. *J Natl Cancer Inst* 82: 1050-1054

18. Jones LA, Scott D, Cowan R, Roberts SA (1995) Abnormal radiosensitivity of lymphocytes from breast cancer patients with excessive normal tissue damage after radiotherapy: chromosome aberrations after low dose-rate irradiation. *Int J Radiat Biol* 67 (5) 519-528