

Der Comet-Assay als Methode zur Identifizierung von heterozygoten Mutationsträgern der Fanconi Anämie

Cholpon S. Djuzenova, Andreas Rothfuss, Ulrich Oppitz, Günter Speit, Detlev Schindler, Michael Flentje

Zusammenfassung

Die Fanconi Anämie (FA) ist eine seltene autosomal rezessiv vererbte Krankheit, die durch kongenitale Fehlbildungen, Knochenmarkversagen und Krebsanfälligkeit charakterisiert ist. Während langjährige klinische Beobachtungen auf eine erhöhte Strahlenempfindlichkeit von FA-Patienten hinweisen, haben *in-vitro*-Studien kontroverse Resultate erbracht. In dieser Arbeit wurden periphere Blutlymphozyten von FA-Patienten und FA-Heterozygoten Röntgen-Strahlung ausgesetzt, und die DNA-Schäden und -Reparatur der behandelten Zellen mit Hilfe der Einzelzell-Gelelektrophorese (Comet-assay) untersucht. Die Zellen beider Gruppen zeigten im Vergleich zu Kontrollzellen einen hohen initialen DNA-Schaden. Weiterhin wurden aus den Reparaturkurven der Residualschaden und die Reparatur-Halbwertszeitkonstanten berechnet. Diese beiden Parameter waren in den Zellen von FA-Patienten und FA-Heterozygoten signifikant erhöht. Unsere Daten deuten auf den Verlust der Kernintegrität nach Röntgenbestrahlung in den Zellen von FA-Mutationsträgern hin, die eine bzw. zwei Mutationen in einem der Fanconi-Anämie-Gene aufweisen. Der Comet-assay ermöglicht somit die Erkennung von Strahlen-induzierten DNA- bzw. Chromatin-Schäden bei FA-Patienten. Darüber hinaus erscheint dieser Assay auch für epidemiologische Untersuchungen zur Erfassung von FA-Heterozygoten geeignet.

Schlüsselwörter

Fanconi-Anämie, heterozygote Genträger, Comet-Assay, Strahlenempfindlichkeit, Blutlymphozyten

Summary

Fanconi anemia (FA) is a rare autosomal recessive disorder characterized by bone marrow failure and cancer susceptibility. While there is the long-standing clinical impression of elevated radiosensitivity, *in vitro* studies have yielded conflicting results. In this study peripheral blood mononuclear cells from FA patients and carriers were exposed to X-rays and the DNA damage and repair kinetics were assessed using the alkaline single-cell gel electrophoresis (Comet) assay. The cells of both patients and carriers showed high initial DNA damage compared with the control cells. In addition, the average residual tail moment at 50 min post-irradiation and the repair half-time parameters were significantly elevated. These findings suggest an enhanced loss of nuclear integrity following X-ray exposure in cells that carry one or two mutations in one of the Fanconi anemia genes. The comet assay may be a useful adjunct for heterozygote detection in families with known FA-patients.

Keywords

Fanconi anemia, heterozygotes, Comet assay, X-ray sensitivity, peripheral blood mononuclear cells

Zellen von Patienten mit Fanconi Anämie (FA) weisen folgende *in vitro* Besonderheiten auf: eine erhöhte spontane chromosomale Aberrationsrate (Schroeder et al. 1964) sowie die Hypersensibilität gegenüber DNA-quervernetzenden oder bifunktionell alkylierenden Substanzen wie Mitomycin C und Diepoxybutan (Sasaki and Tonomura, 1973). Zusätzlich haben FA-Zellen eine Zellzyklusstörung (Dutrillaux et al. 1982) und eine erhöhte Sauerstoffüberempfindlichkeit (Joenje et al. 1981). Eine weitere und noch umstrittene Eigenschaft der FA-Zellen ist ihre Strahlenempfindlichkeit. Einerseits wurde gezeigt, dass *in vitro* bestrahlte primäre FA-Hautfibroblasten die gleiche Kolonienbildungsfähigkeit zeigen wie Kontrollzellen (Finkelberg et al. 1975; Fornace et al. 1979; Weichselbaum et al. 1980; Duckworth-Rysiecki und Taylor, 1985). Ebenso zeigten periphere FA-Blutlymphozyten nach Röntgen- oder γ -Strahlung ähnliche Häufigkeiten an chromosomalen Abberationen (Sasaki und Tonomura, 1973; Natarajan et al. 1984) wie normale Zellen. Andererseits gibt es mehrere Publikationen, die zeigen, dass FA-Zellen sehr empfindlich gegenüber Röntgen- oder γ -Strahlung sind (Higurashi und Conen, 1971; 1973; Bigelow et al. 1976; Arlett und Harcourt, 1980; Knox et al. 1981; Gluckman et al. 1983; Parshad et al. 1983; Burnet et al. 1994). Erhöhte Sensitivität wurde auch gegenüber dem Radiomimetikum Bleomycin berichtet (Carreau et al. 1999). Nach einigen Berichten zeigen Blutlymphozyten (Higurashi und Conen, 1971) sowie Hautfibroblasten (Bigelow et al. 1979) von FA-Patienten nach einer Röntgen- bzw. γ -Bestrahlung erheblich mehr Chromosomenaberrationen als normale Zellen. Eine erhöhte Pigmentation und Schuppung der bestrahlten Hautareale wurden in der Mehrheit eines FA-Patienten Kollektivs beobachtet (Gluckman und Dutreix, 1983). Eine FA-Patientin, die aufgrund ihrer Krebserkrankung strahlentherapeutisch behandelt wurde, hatte eine extrem hohe klinische Strahlenreaktion gezeigt, obwohl ihre Hautfibroblasten im *in vitro* Kolonientest eine normale Strahlensensibilität suggerierten (Marcou et al. 2001).

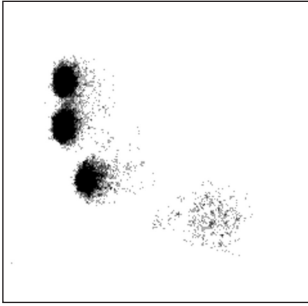


Abb 1 (links)
Mit 3 Gy bestrahlte Blutlymphozyten einer Kontrollperson (oben) und eines FA-Patienten (unten) analysiert mit dem alkalischen Comet-Assay

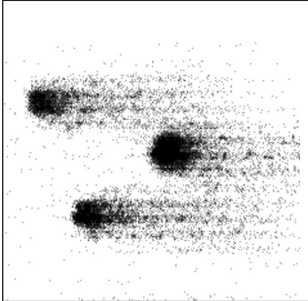
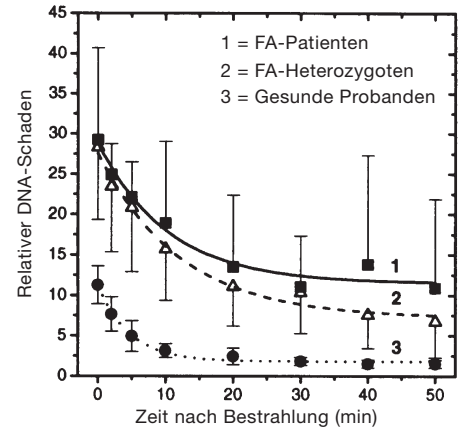


Abb 2 (rechts)
Zeitlicher DNA-Reparaturverlauf gemessen mittels Comet Assays

Kurve 1: gemessen an Blutlymphozyten von FA-Patienten;
Kurve 2: gemessen an FA-Heterozygoten;
Kurve 3: gemessen an gesunden Probanden.

Die Zellen wurden mit 3 Gy-Röntgenstrahlen bestrahlt und anschließend bis zu 50 Minuten bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Reproduziert aus (Djuzenova et al. 2001). Mit freundlicher Genehmigung von Lippincott Williams & Wilkins Verlag.



Um zusätzliche Erkenntnisse über die Strahlenempfindlichkeit von FA-Zellen zu gewinnen, haben wir DNA-Schäden und -Reparatur in bestrahlten peripheren Blutlymphozyten von FA-Patienten und FA-Heterozygoten mit der Einzelzellgelelektrophorese untersucht.

Die Einzelzellgelelektrophorese, auch Comet Assay genannt, wurde ursprünglich zum Nachweis von DNA-Strangbrüchen entwickelt. Weite Anwendung findet der Comet Assay heutzutage in der von Sing et al. 1988 vorgestellten alkalischen Version zum sensitiven Nachweis der Induktion und der Reparatur von DNA-Strangbrüchen. Bei der Implementierung dieser Methode werden vereinzelte Zellen (ca. 10^4) auf einem Objektträger in Agarosegel eingebettet, mit einer Detergenz unter hohen Salzkonzentrationen lysiert und unter neutralen oder alkalischen Bedingungen der Elektrophorese unterworfen. Die DNA trägt aufgrund der Phosphatbrücken ihrer Basensequenz eine negative Ladung. Dabei wandert die negativ geladene DNA beim Anlegen eines elektrischen Feldes zum Pluspol (Anode). Hierbei können kleine DNA-Bruchstücke schneller als große DNA-Fragmente durch das Gel wandern. Es erfolgt also eine Auftrennung der DNA nach der Größe ihrer Bruchstücke. Die Menge der migrierten DNA ist dabei proportional zum Ausmaß der DNA-Schädigung. Nach spezifischer Färbung der DNA bilden Zellkerne mit geschädigter DNA daher einen sogenannten „Kometen“. Dabei entspricht der Kometen-„Kopf“ dem ursprüngli-

chen Zellkern, während der „Schweif“ aus der im elektrischen Feld gewanderten DNA besteht. Der Anteil an DNA, der dabei in Form eines Kometenschweifes mehr oder weniger weit aus dem Zellkern austritt, ist ein Maß für den DNA-Schaden. Unbeschädigte Zellkerne haben hingegen nur einen geringfügig ausgeprägten „Kometenschweif“.

Der Comet Assay wurde bei drei verschiedenen Personengruppen durchgeführt: 1) FA-Patienten (n=8); 2) FA-Heterozygoten (n=34); 3) klinisch gesunden Personen (n=10). Die Lymphozyten wurden aus dem peripheren Blut gewonnen, mit 3 Gy *in vitro* bestrahlt, danach bei 37°C im Brutschrank inkubiert und anschließend mit dem alkalischen Comet Assay analysiert. Mit 3 Gy bestrahlte Zellen wurden auf drei Parameter hin untersucht: (1) initialer und (2) residueller DNA-Schaden und (3) die Kinetik der Reparatur des DNA-Schadens.

Abbildung 1 zeigt, dass die initialen DNA-Schäden bei bestrahlten Blutlymphozyten von FA-Patienten viel höher waren als bei Kontrollperson. Solche Einzelzell-Elektropherogramme werden dann mit Hilfe eines Bildverarbeitungssystems (Kinetic Imaging Ltd. London, UK) quantifiziert.

Die Vermessungen der Einzelzell-Elektropherogramme mit dem Bildverarbeitungssystem zeigten, dass der durchschnittliche initiale DNA-Schaden in Zellen der FA-Patienten bzw. -Heterozygoten fast dreimal so hoch war wie derjenige in Kontrollzel-

len. Zusätzlich waren die residualen DNA-Schäden um Faktor 4 bzw. 5 so hoch wie derjenige bei normaler Personen. Gleichzeitig war die Geschwindigkeit der DNA-Reparatur um Faktor 2 langsamer als bei Kontrollpersonen. Die Ergebnisse dieser Auswertungen sind in Abbildung 2 dargestellt.

Die quantitativen Werte für die Zellen von allen untersuchten Probanden sind in der Tabelle 1 zusammengefasst. Obwohl die deutlichen Unterschiede zwischen der FA-Heterozygoten und Kontrollzellen für eine hohe Empfindlichkeit des Comet Assays sprechen, wurden bei der Untersuchung der FA-Patienten zwei falsch positive Befunde erhoben (Patienten FA-12 und FA-30). Anhand der Daten von Chromosomenaberrationen und Zellenzyklusanalyse (Seyschab et al. 1995), wurde die klinische Diagnose einer FA in sechs der acht Patienten bestätigt. Ein Patient (FA-12) hatte eine normale Empfindlichkeit gegenüber Mitomycin C in den Blutzellen und Fibroblasten, sowie eine normale Zellzyklusverteilung, so dass die Diagnose FA sehr unwahrscheinlich ist. Bei einer anderen Person (FA-30), deren Zellen auch sehr hohe DNA-Schäden im Comet Assay gezeigt hatten, wiesen Blutlymphozyten dennoch eine normale Mitomycin C Empfindlichkeit auf. Die Zellzyklusverteilung dieser Zellen mit hohen G0/G1- und normalen G2-Phase Werten entsprach eher dem Bild einer erworbenen aplastischen Anämie als einer FA. Unsere Studie hat gezeigt, dass die induzierte DNA-Schaden in bestrahl-

Tab 1 DNA-Schäden in bestrahlten (3 Gy) Blutlymphozyten von gesunden Probanden, FA-Patienten sowie FA-Heterozygoten gemessen mit alkalischem Comet Assay

Jeder angegebene Parameter ist ein durch curve fitting (siehe Abb.2) berechneter Mittelwert. Die Signifikanz-Testung zwischen der FA-Gruppe und den offensichtlich gesunden Personen erfolgte mit Student's t-Test. Die unterstrichenen Werte zeigen Parameterwerte die mit der Kontrollgruppe überlappen.

Proband ^{a)}	Alter	Geschlecht	Status zur FA	Totale initiale DNA-Schäden	Residuelle DNA-Schäden	Repartitions-halbwertzeit $\tau_{1/2}$ min
Bona fide						
gesunde Probanden						
N-1	39	M	Normal	13.4	2.1	2.5
N-2	20	M	Normal	13.0	1.8	1.5
N-3	44	W	Normal	10.5	2.1	4.0
N-4	57	W	Normal	8.2	2.2	9.3
N-5	26	M	Normal	13.3	1.0	4.3
N-6	23	W	Normal	14.3	1.0	4.6
N-7	31	W	Normal	10.3	1.3	1.5
N-8	49	M	Normal	12.4	1.9	2.5
N-9	26	M	Normal	7.2	1.8	4.6
N-10	28	M	Normal	9.2	1.2	6.2
Mittelwert	34			11.1	1.6	4.1
± SD	12			2.4	0.5	2.4
FA-Patienten						
FA-5	9	W	Patient	54.6	27.8	<u>0.4</u>
FA-8	4	W	Patient	24.7	4.0	12.8
FA-11	7	M	Patient	32.7	25.0	10.2
FA-12	22	W	Patient	24.0	8.0	30.0
FA-29	19	W	Patient	26.9	5.9	4.3
FA-30	8	W	Patient	30.2	4.0	5.9
FA-33	4	M	Patient	27.1	3.5	11.6
FA-34	6	W	Patient	22.3	9.0	36.3
Mittelwert	10			30.7	10.2	10.4
± SD	7			10.1	10.1	8.9
				p<0.001	p<0.05	p<0.05
FA-Träger						
FA-1	46	M	Träger	23.5	6.3	15.4
FA-2	54	M	Träger	23.4	17.0	28.3
FA-3	50	W	Träger	21.0	13.0	<u>5.0</u>
FA-4	32	W	Träger	14.9	10.5	<u>0.7</u>
FA-6	36	M	Träger	56.2	12.7	1.9
FA-7	30	W	Träger	29.3	9.0	0.5
FA-9	40	M	Träger	37.3	20.0	<u>5.7</u>
FA-10	32	W	Träger	37.7	9.7	<u>5.7</u>
FA-13	45	M	Träger	29.2	<u>1.9</u>	15.5
FA-14	39	W	Träger	16.9	3.0	8.2
FA-15	42	M	Träger	23.3	3.0	17.7
FA-16	38	W	Träger	21.5	2.5	<u>6.0</u>
FA-17	36	M	Träger	35.2	8.8	<u>4.3</u>
FA-18	35	W	Träger	24.3	4.8	9.5
FA-19	70	W	Träger	18.3	3.9	<u>3.7</u>
FA-20	42	M	Träger	35.3	7.0	<u>3.7</u>
FA-21	36	W	Träger	34.0	2.5	9.9
FA-22	36	M	Träger	26.6	9.9	<u>3.8</u>
FA-23	36	W	Träger	24.1	7.2	<u>4.0</u>
FA-24	46	W	Träger	20.2	9.4	<u>3.7</u>
FA-25	41	M	Träger	23.5	2.5	14.2
FA-26	44	W	Träger	42.1	4.2	9.8
FA-27	31	M	Träger	23.3	3.4	12.2
FA-28	27	W	Träger	27.2	6.0	<u>8.5</u>
FA-31	34	M	Träger	21.8	5.3	12.0
FA-32	35	W	Träger	23.5	4.0	<u>5.6</u>
FA-35	27	M	Träger	29.0	2.8	<u>6.2</u>
FA-36	30	W	Träger	33.5	2.0	12.4
FA-37	43	M	Träger	26.0	7.5	<u>3.9</u>
FA-38	30	W	Träger	14.5	3.0	33.9
FA-39	29	M	Träger	43.5	10.6	<u>6.9</u>
FA-40	27	W	Träger	50.3	10.0	12.0
FA-41	30	M	Träger	27.3	6.2	<u>6.1</u>
FA-42	30	W	Träger	28.8	5.0	<u>4.3</u>
Mittelwert	38			28.5	6.8	9.8
± SD	9			9.5	4.3	7.4
				p<0.001	p<0.005	p<0.05

a) Aktennummer;
M = männlich; W = weiblich; N = gesunder Proband; FA = Fanconi Anämie

Reproduziert aus (Djuzenova et al. 2001)
Mit freundlicher Genehmigung von Lippincott Williams & Wilkins Verlag.

ten peripheren Blutlymphozyten von FA Patienten sowie obligaten FA-Heterozygoten höher sind als in Kontrollzellen. Unterschiede bezüglich des Grads an Chromatinkompaktierung können die Resultate des Comet Assay beeinflussen (Noz et al. 1996). Außerdem, können die DNA-Schäden, welche mittels des Comet Assays gemessen wurden, durch eine Anzahl von Faktoren beeinflusst zu werden, welche die DNA-Freisetzung aus der Kernproteinmatrix ändern (Speit und Hartmann, 1999). Es ist daher anzunehmen, dass Änderungen der Chromatinstruktur das Ausmaß der DNA-Migration im Comet Assay beeinflussen (Chiu et al. 1992; Woudstra et al. 1996). Die abnormale Reaktion der Zellen der FA-Homozygoten und -Heterozygoten könnte daher auch darauf hinweisen, dass die Stabilität des Chromatins bei FA verändert ist. Diese Hypothese würde mit der Annahme einer „Chromatinkrankheit“ übereinstimmen, bei der ein defekter FA-Proteinkomplex seine Rolle im Chromatinremodelling während der zellulären Stressantwort nicht ausreichend erfüllen kann (Hoatlin et al. 1999; Qiao et al. 2001).

Die kombinierte Betrachtung der drei Parameter ermöglichte eine korrekte Identifikation aller getesteten FA-Heterozygoten. Der Vorteil dieser Methode gegenüber früheren Studien besteht darin, dass primäre, periphere Blutlymphozyten zur Untersuchung benutzt werden und darum keine Zellkulturen erforderlich sind. Diese Ergebnisse können daher als schneller Zusatztest zur Heterozygotenidentifizierung bei der epidemiologischen Untersuchung in Familien mit einem FA Betroffenen sowie bei der Optimierung der Strahlendosis bei der Vorbehandlung zur Knochenmarktransplantation berücksichtigt werden.

Zukünftige Arbeiten in diesem Gebiet werden sich auf die möglichen Ursachen der hohen DNA-Schäden in bestrahlten FA-Zellen konzentrieren. Zu diesen Ursachen gehören z.B. mögliche Defekte in der DNA-Reparatur, Defekte in der Chromatinstruktur, Defekte in der Assoziation der DNA mit den basischen Histonproteinen, die

Sauerstoffüberempfindlichkeit der FA-Zellen, d.h. solche Faktoren, die einen erheblichen Einfluss auf die Induktion und Reparatur von DNA-Einzel- und Doppelstrangbrüchen haben.

Literatur

Bigelow SB, Rary JM, Bender MA. (1979). G2 chromosomal radiosensitivity in Fanconi's anemia. *Mutation Res* 63:189-199.

Carreau M, Alon N, Bosnoyan-Collins L, Joenje H, Buchwald M. (1999). Drug sensitivity spectra in Fanconi anemia lymphoblastoid cell lines of defined complementation groups. *Mutation Res* 435:103-109.

Djuzenova CS, Rothfuss A., Oppitz U, Speit G, Schindler D, Hoehn H, and Flentje M. (2001). Response to X-irradiation of Fanconi anemia homozygous and heterozygous cells assessed by the single-cell gel electrophoresis (Comet) assay. *Lab Invest* 81:185-192.

Duckworth-Rysiecki G, Taylor AMR. (1985). Effects of ionizing radiation on cells from Fanconi's anemia patients. *Cancer Res* 45:416-420.

Dutrillaux B, Aurias A, Dutrillaux A-M, Buriot D, Prieur M. (1982). The cell cycle of lymphocytes in Fanconi anemia. *Hum Genet* 62:327-332.

Finkelberg R, Thompson M, Siminovitich L. (1975). Survival after treatment with EMS, γ -rays, and mitomycin C of skin fibroblasts from patients with Fanconi's anaemia. *Am J Hum Genet* 26:A30.

Fornace AJ, Little JB, Weichselbaum RR. (1979). DNA repair in Fanconi's anaemia fibroblast cell strain. *Biochim Biophys Acta* 561:99-109.

Gluckman E, Devergie A, Dutreix J. (1983). Radiosensitivity in Fanconi anaemia: application to the conditioning regimen for bone marrow transplantation. *Br J Haematol* 54:431-440.

Higurashi M, Conen PE. (1971). In vitro chromosomal radiosensitivity in Fanconi's anemia. *Blood* 38:336-342.

Hoatlin ME, Zhi Y, Ball H, Silvey K, Melnick A, Stone S, Arai S, Hawe N, Owen G, Zelent A, and Licht JD. (1999). A novel BTB/POZ transcriptional repressor protein interacts with the Fanconi anemia group C protein and PLZF. *Blood* 94:3737-3747.

Joenje H, Arwert F, Eriksson AW, de Koning H, and Oostra AB. (1981). Oxygen-dependence of chromosomal aberrations in Fanconi's anaemia. *Nature* 290:142-143.

Knox SJ, Wilson FD, Greenberg BR, Shifrine M, Rosenblatt LS, Reeves JD, Misra H. (1981). Increased radiosensitivity of a subpopulation of T-lymphocyte progenitors from patients with Fanconi's anemia. *Blood* 57:1043-1048.

Marcou Y, D'Andrea A, Jeggo PA, Plowman PN. (2001). Normal cellular radiosensitivity in an adult Fanconi anaemia patient with marked clinical radiosensitivity. *Radiother Oncol* 60:75-79.

Natarajan AT, Vossen JMJJ, van Rijn JLS. (1984). Cytogenetic response of Fanconi's anaemia lym-

phocytes to mitomycin C, X-rays and DNA repair inhibitors. *Clin Genet* 25:210.

Noz KC, Bauwens M, van Buul PP, Vrolijk H, Schothorst AA, Pavel S, Tanke HJ, and Vermeer BJ. (1996). Comet assay demonstrates a higher ultraviolet B sensitivity to DNA damage in dysplastic nevus cells than in common melanocytic nevus cells and foreskin melanocytes. *J Invest Dermatol* 106:1198-1202.

Parshad R, Sanford KK, Jones GM. (1983). Chromatid damage after G2 phase x-irradiation of cells from cancer-prone individuals implicates deficiency in DNA repair. *Proc Natl Acad Sci USA* 80: 5612-5616.

Qiao F, Moss A, Kupfer GM. (2001). Fanconi anemia proteins localize to chromatin and the nuclear matrix in a DNA damage and cell cycle-regulated manner. *J Biol Chem* 276:23391-23396.

Sasaki MS, Tonomura A. (1973). A high susceptibility of Fanconi's anemia to chromosome breakage by DNA cross-linking agents. *Cancer Res* 33:829-1836.

Schroeder TM, Anschutz F, Knopp A. (1964). Spontane Chromosomenaberrationen bei familiarer Panmyelopathie. *Humangenetik* 1:196.

Seyschab H, Friedl R, Sun Y, Schindler D, Hoehn H, Hentze S, Schroeder-Kurth T. (1995). Comparative evaluation of diepoxybutane sensitivity and cell cycle blockage in the diagnosis of Fanconi anemia. *Blood* 8:2233-2237.

Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider E. (1988). A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* 175:184-191.

Speit G and Hartmann A. (1999). The Comet Assay (Single-Cell Gel Test). In: Henderson DS, editor. *Methods in Molecular Biology*. Vol. 113: DNA Repair Protocols: Eukaryotic Systems. Totowa, NJ: Humana Press Inc., 203-212.

Weichselbaum RR, Nove J, Little JB. (1980). X-ray sensitivity of fifty-three human diploid fibroblast cell strains from patients with characterized genetic disorders. *Cancer Res* 40:920-925.

Woudstra EC, Roesink JM, Rosemann M, Brunsting JF, Driessen C, Orta T, Konings AW, Peacock JH, Kampinga HH. (1996). Chromatin structure and cellular radiosensitivity: a comparison of two human tumour cell lines. *Int J Radiat Biol* 70:693-703.