

12. August 78

SGAE BER. No. 2962

BL-234/78

AUGUST 1978

Berichte der
Österreichischen Studiengesellschaft
für Atomenergie Ges. m. b. H.

Forschungszentrum Seibersdorf

DIE WIRKUNG KLEINER STRAHLENDOSEN AUF DNA-REPARATURVORGÄNGE

HELGA TUSCHL

SGAE Ber.No. 2962

BL-234/78

August 1978

DIE WIRKUNG KLEINER STRAHLENDOSEN AUF DNA-
REPARATURVORGÄNGE

Helga Tuschl

Vortrag gehalten im Atominstitut der
österreichischen Universitäten, 31.

Mai 1978

Österreichische
Studiengesellschaft für Atomenergie
Ges.m.b.H.
Lenaugasse 10 A-1082 Wien

INSTITUT FÜR BIOLOGIE
Forschungszentrum Seibersdorf

DIE WIRKUNG KLEINER STRAHLENDOSEN AUF DNA-REPARATURVORGÄNGE

KURZFASSUNG

Korrekt ablaufende DNA-Reparaturvorgänge stellen die wichtigste Voraussetzung zur Erhaltung der genetischen Information in den Zellen dar. Sie sind dort von besonderer Bedeutung, wo eine therapeutische oder berufliche Strahlenexposition erfolgt. Es wurde daher die Wirkung von Strahlentherapie bzw. erhöhter Umweltradioaktivität auf die unprogrammierte DNA Synthese peripherer Lymphocyten untersucht. In allen Fällen konnte eine Steigerung der DNA Reparaturkapazität in Lymphocyten nachgewiesen werden.

SCHLÜSSELWORTE

DNA-Reparatur, niedere Strahlendosen, Lymphocyten.

THE EFFECT OF LOW RADIATION DOSES ON DNA REPAIR PROCESSES

ABSTRACT

Error free DNA repair processes are an important prerequisite for the maintenance of genetic integrity of cells. They are of special importance for persons therapeutically or occupationally exposed to radiation. Therefore the effect of radiation therapy and elevated natural background radiation on unscheduled DNA synthesis was tested in peripheral lymphocytes of exposed persons. Both, autoradiographic studies of unscheduled DNA synthesis and measurement of ³H-thymidine uptake into double stranded and single-strand containing DNA fractions revealed an increase of capacity for DNA repair.

KEYWORDS

Irradiation, low radiation doses, biological repair, DNA, lymphocytes.

DIE WIRKUNG KLEINER STRAHLENDOSEN AUF DNA-REPARATUR- VORGÄNGE

Die DNA oder Desoxyribonucleinsäure, der Träger der Erbinformation in den Zellen, ist ständig äußeren Einflüssen, vor allem ionisierender und UV-Strahlung, unterworfen. Diese führen zu strukturellen Veränderungen, die, falls sie manifest werden, ihrerseits zu somatischen Mutationen in Körperzellen oder vererbaren Mutationen in Keimzellen führen können. Darüberhinaus arbeiten die Enzyme, die für die identische Replikation der DNA verantwortlich sind, nicht völlig fehlerfrei, sodaß auch Fehler bei der semikonservativen DNA Synthese entstehen. Alle Lebewesen besitzen daher zur Aufrechterhaltung der Erbkonstanz und zur Unterdrückung somatischer Schäden bestimmte Enzymsysteme, die Veränderungen in der DNA erkennen und eliminieren können.

Um auf den Wirkungsmechanismus dieser Systeme näher eingehen zu können, soll kurz die Struktur der DNA und die Formen der DNA Schädigung erklärt werden (Abb. 1). Das DNA Molekül besteht aus 3 Komponenten: Phosphorsäure, Pentose und Purin- bzw. Pyrimidinbasen. Das "Rückgrat" bilden die durch Phosphodiesterbrücken verknüpften Zuckermoleküle, während die N-Basen zweier komplementärer Stränge, die gemeinsam die Doppelhelix der DNA bilden, über Wasserstoffbrücken miteinander verbunden sind. Ionisierende Strahlung erzeugt DNA-Brüche, die meist aber mit Basenabspaltungen verbunden sind, oder Basenveränderungen, die ihrerseits Brüche verursachen können (Abb. 2).

Abb. 1.

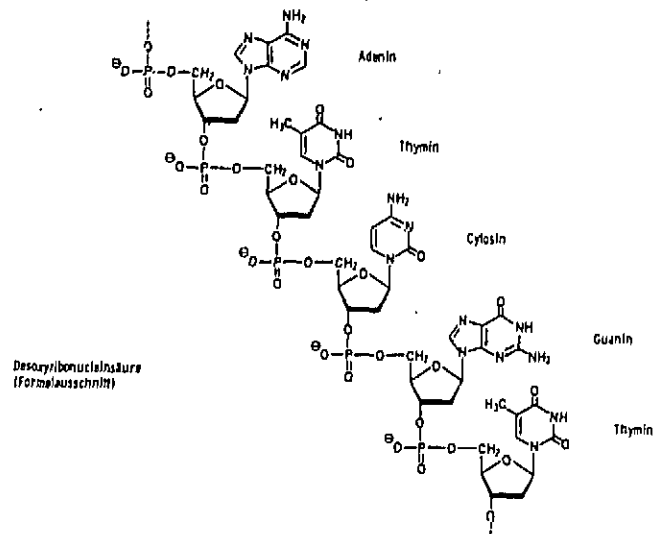
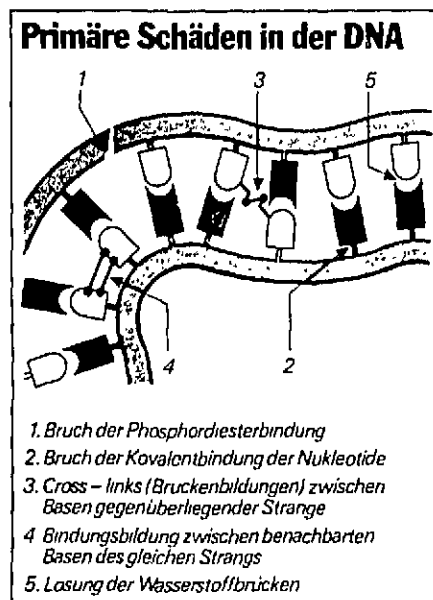


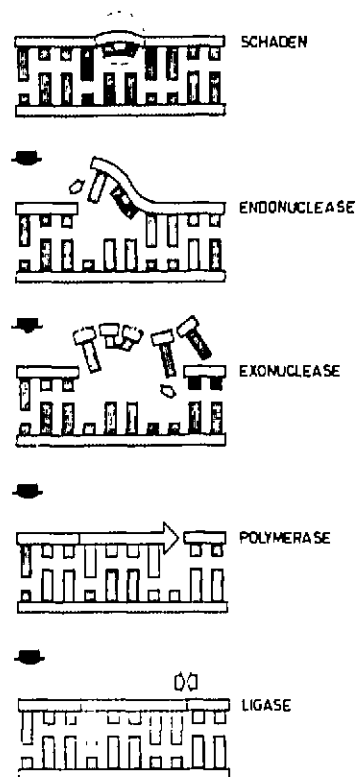
Abb. 2



Je nachdem, ob nur 1 Strang oder beide Stränge betroffen sind, unterscheidet man Ein- oder Doppelstrangbrüche. UV-Strahlung führt hauptsächlich zu einer Dimerisierung zwischen benachbarten Pyrimidinpaaren, in erster Linie zwischen benachbarten Thyminpaaren, wobei das Thyminidimere zu einer strukturellen Verformung der Doppelhelix führt. Chemische Noxen können ebenfalls Veränderungen in der DNA hervorrufen. Monoalkylierende Stoffe führen zur Alkylierung einzelner DNA Basen, bifunktionelle Alkylantien zu einer Quervernetzung der DNA Stränge. Alle ge-

nannten Schäden können durch die Enzyme der sogenannten Exzisionsreparatur entfernt werden (Abb. 3).

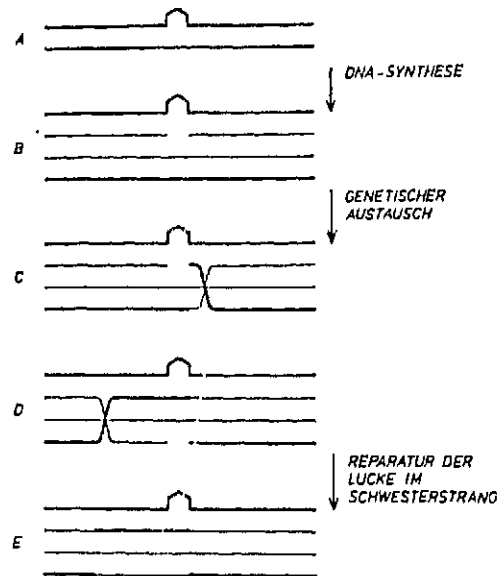
Abb. 3
Schematische Darstellung
der Exzisionsreparatur



Durch Pyrimidindimere oder Alkylierungen hervorgerufene Strukturveränderungen dienen einer sogenannten "Endonuklease" als Erkennungsstelle. Ihre Aufgabe ist es, an der 5'-Seite des Dimers einen Einstrangbruch zu produzieren, um den Beginn der Reparaturreplikation durch die DNA Polymerase und das Herausschneiden des Oligonukleotids durch die Exonuclease zu ermöglichen. Das von der Polymerase am intakten komplementären DNA Strang replizierte DNA Strangstück wird durch eine Polynukleotidligase mit dem bestehenden Strang geknüpft. Durch ionisierende Strahlung hervorgerufene Strangbrüche werden zu einem geringen Teil, wenn es sich um 3'-OH-5'-P-Brüche ohne Basenspaltung handelt, direkt durch die Ligase wiedervereinigt, ansonsten tritt auch hier die Exzisionsreparatur ein. Dieses Reparatursystem arbeitet sehr effizient und mit geringer Fehlerquote.

Tritt die Zelle aber in die S-phase, also jene Phase, in der die semikonservative DNA Synthese stattfindet, bevor alle Schäden durch Exzisionsreparatur entfernt werden konnten, kann die Postreplikationsreparatur erfolgen (Abb. 4).

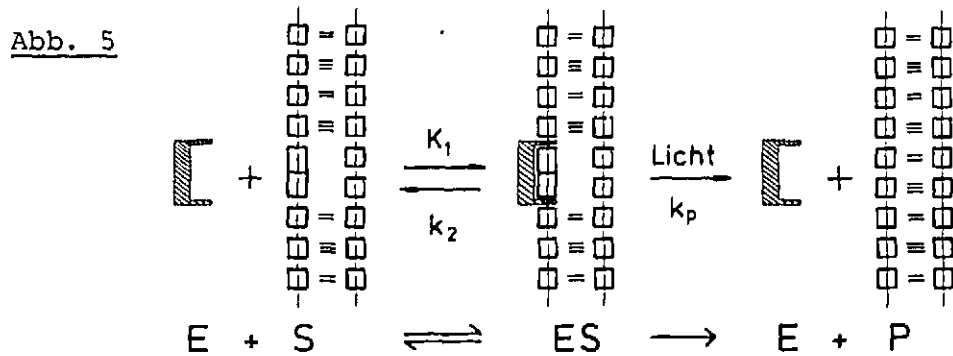
Abb. 4
Postreplikations-
reparatur.



Während der semikonservativen DNA Synthese entsteht dabei gegenüber der Fehlstelle eine Lücke im neusynthetisierten Strang, die durch Rekombinationsvorgänge und nachfolgende Repairsynthese geschlossen wird. Man nimmt an, daß dieser Reparaturmechanismus fehleranfälliger als die Exzisionsreparatur und mit einer höheren Mutationsrate verbunden ist.

Der Vollständigkeit halber sei noch ein drittes Reparatursystem genannt, die sogenannte Photoreparatur oder Photoreaktivierung. Sie wird durch ein einziges Enzym bewerkstelligt, das sogenannte "photoreaktivierende Enzym", das an UV-induzierte Thyminidimere bindet und durch Absorption längerwelliger Strahlung zu einer Spaltung der Dimeren führt (Abb. 5).

PHOTO-REPAIR



Alle diese Reparaturvorgänge laufen in nahezu jeder Zelle ab, jedoch besitzen juvenile Zellen höhere Enzymaktivitäten als ausdifferenzierte Endzellen. Sie sind besonders wichtig in immunkompetenten Zellen, vorallem den Lymphozyten des menschlichen Organismus. Man nimmt heute an, daß Mutationen, die aufgrund fehlerhafter oder unterdrückter DNA Reparatur in den Immunzellen manifest werden, zur Entstehung aberranter Lymphozytenklone führen können, in Antikörper produzierenden Zellen zur Synthese veränderter Immunglobuline, und damit auf jeden Fall zu einer Beeinträchtigung der Immunabwehr des Organismus. Eine der meist diskutierten Hypothesen der Karzinogenese ist die Theorie der somatischen Mutationen, die annimmt, daß die Ursache der Neoplasieentstehung in Mutationen bestimmter Gene oder Gengruppen somatischer Zellen zu sehen ist. Einen der möglichen Wege zur Entstehung von Mutationen stellt die direkte Schädigung der DNA dar, wobei eine Beeinträchtigung der DNA Reparatur eine determinierende Rolle spielen könnte.

Eine der am besten untersuchten Erkrankungen, bei der eine defekte DNA Reparatur mit gleichzeitig hoher Krebsinzidenz beobachtet wird, ist Xeroderma pigmentosum, eine autosomal rezessive Hauterkrankung mit früher Manifestation von Hautkrebs an den lichtexponierten Stellen. Man kennt heute bereits 6 Komplementationsgruppen von X.p. mit defektem Exzisions- bzw. auch Postreplikationsrepair. Das Analogon zu X.p. in bezug auf

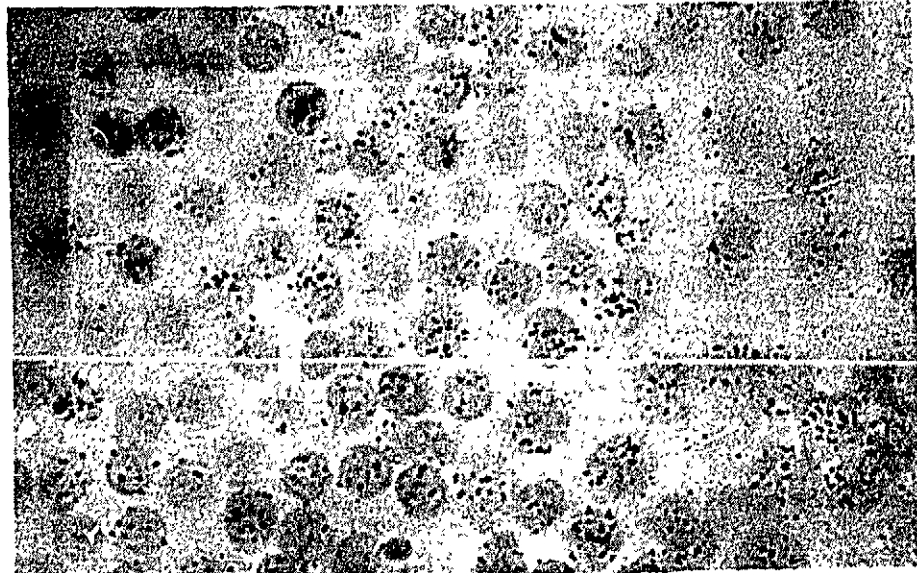
ionisierende Strahlung stellt Ataxia telangiectasia dar - hier liegt eine gesteigerte Empfindlichkeit gegenüber Gamma- und Röntgenstrahlung vor, die auf defekte Exzisionsreparatur zurückzuführen ist. In eigenen Untersuchungen konnten wir wiederholt bei Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises Imbalanzen im Reparatursystem feststellen, die in engem Zusammenhang mit dem pathologischen Immungeschehen bei diesen Erkrankungen stehen könnten.

Kritisch wird eine Beeinträchtigung der Immunreaktion vor allem dort, wo erhöhte Anforderungen an das Immunsystem gestellt werden. Dies trifft insbesondere für Tumorpatienten zu. Durch Immunvorgänge werden nämlich Tumorentstehung, Tumorstadium und die Verbreitung von Metastasen gesteuert. Korrekt ablaufende DNA Reparaturvorgänge sind daher für Krebspatienten von immenser Bedeutung und letztlich wahrscheinlich auch für den Therapieerfolg entscheidend.

Wir haben daher im Rahmen einer größeren Studie gemeinsam mit der Strahlentherapeutischen Klinik und der Strahlenabteilung des Krankenhauses Lainz die DNA Reparaturvorgänge in den Lymphozyten von Tumorpatienten untersucht. Zur Messung der DNA Reparatur gibt es bereits eine Vielzahl von Methoden. In jedem Fall wird in vitro eine zusätzliche Schädigung der DNA durch UV- oder ionisierende Strahlung vorgenommen, weil die sozusagen "natürliche", d.h. aufgrund fehlerhafter DNA Synthese oder unter dem Einfluß natürlicher physikalischer oder chemischer Einflüsse ablaufende Reparaturrate zu gering ist, um mit herkömmlichen Methoden gemessen zu werden. Nachdem die Lymphozyten aus dem Blut abgetrennt wurden, werden sie in vitro bestrahlt und in Gegenwart einer radioaktiv markierten DNA Vorstufe, meist ³H-Thymidin, inkubiert. Der Einbau dieses Nukleosids kann nun z.B. durch Autoradiographie der Zellen bestimmt werden. Eine autoradiographische Untersuchung der unprogrammierten DNA Synthese (=UDS), wie man die Reparaturreplikation in allen nicht S-Phase-Zellen nennt, zeigt Abbildung 6. Daneben kann die Re-

paraturreplikation auch an Hand einer Chromatographie der DNA an BND-Zellulose und nachfolgender Aktivitätsmessung der doppelstrang- bzw. einstranghaltigen DNA Fraktionen im Flüssigkeitsszintillationszähler dargestellt werden (Abb. 7).

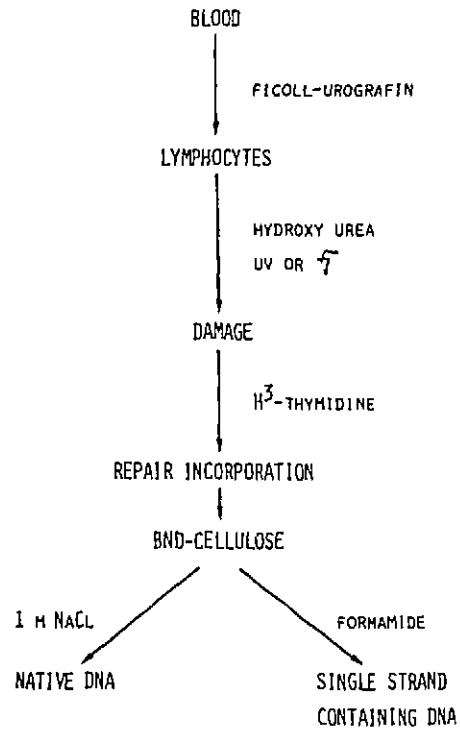
Abb. 6



Lymphozyten nach 200 erg UV/mm^2 Bestrahlung und ^3H -Thymidineinbau.

Abb. 7

BND-Zellulose-Chromatographic.

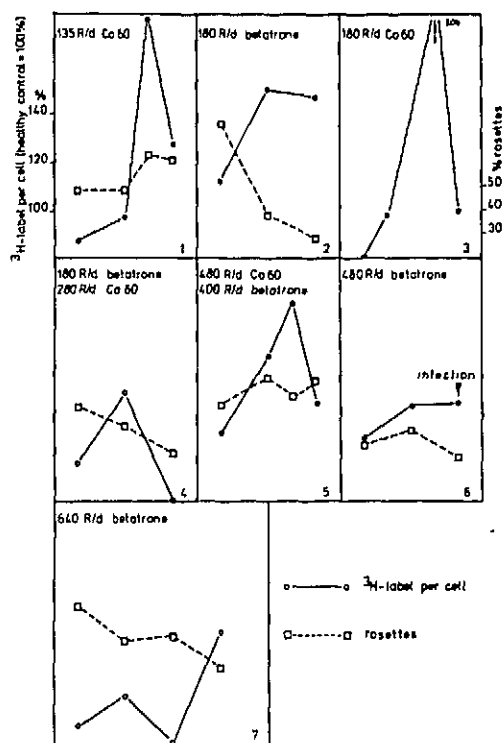


Weitere Methoden können z.B. die Wiedervereinigung von Strangbrüchen durch Gradientenzentrifugation in alkalischer oder neutraler Saccharose darstellen.

Da die DNA Reparatur eine der Voraussetzungen für eine korrekte Immunantwort des Organismus bildet, wollten wir zunächst den Einfluß einer länger dauernden Strahlentherapie auf die DNA-Reparaturvorgänge untersuchen. Dabei kamen wir zu einem überraschenden Ergebnis. Bei allen strahlenbehandelten Patienten kam es im Verlauf der Therapie zu einer deutlichen Steigerung der Reparaturrate in Lymphozyten, gemessen an Hand des Einbaues ^3H -Thymidins in die DNA UV-bestrahlter Lymphozyten (Abb. 8).

Abb. 8

Unprogrammierte DNA-Synthese in Lymphozyten von Tumorpatienten im Verlaufe der Strahlentherapie.



Die angewandten Strahlendosen lagen durchwegs sehr hoch, was auch Verschiebungen innerhalb der Lymphozytenpopulation auslösen könnte. Wir waren daher interessiert, die Wirkung kleiner Strahlendosen zu untersuchen. Geeignete Testpersonen fanden wir

in Badgastein. Der Raum von Badgastein unterscheidet sich von Orten mit normaler Umweltradioaktivität vorallem durch einen erhöhten Rn 222-Gehalt der Luft. In Badgastein stammt der Großteil des Rn 222 aus dem Thermalwasser, im Heilstollen Bökkstein kommt das Radon aus dem Berginneren. Eine zwei-stündige Stolleneinfahrt bewirkt eine α -Blutdosis von 1 bis 4 mrad. Stollenpersonal ist einer durchschnittlichen Blutdosis - berechnet aus der α - und der externen γ -Dosis - zwischen 10 und 200 mrad pro Monat ausgesetzt. Untersucht man nun die DNA Reparatur in den Lymphozyten dieser exponierten Gruppe, so findet sich gegenüber Kontrollpersonen aus Wien eine deutlich gesteigerte Reparatursynthese (Abb. 9).

90 MIN REPAIR INCORPORATION IN DNA OF LYMPHOCYTES OF

MINERS IN BADGASTEIN

Abb. 9

90 min Reparatur- inkorporation in Lymphozyten von Stollenarbeitern und Kontrollen.	NUMBER OF CASES	DOUBLE STRANDED DNA	SINGLE STRAND CONTAINING DNA
RADON EXPOSED PERSONS	14	288 (77)	329 (108)
CONTROLS	7	97 (19)	117 (56)
ERROR PROBABILITY		0.002%	0.01%

VALUES GIVEN AS SPECIFIC ^3H -ACTIVITY OF DNA
(STANDARD DEVIATION IN BRACKETS)

Auch autoradiographische Untersuchungen zeigen eine deutliche Steigerung der UDS in Lymphozyten von Stollenarbeitern (Tab. 1). Weniger deutlich ist dagegen die Reparatursteigerung in Lymphozyten des Badepersonals (Abb. 10). Während das Badepersonal einer kontinuierlichen Strahlung ausgesetzt ist, wird die Dosis der Stollenarbeiter fraktioniert, da sie sich nicht ständig im Stollen aufhalten, sondern täglich etwa 2 Stunden. Diese Fraktionierung dürfte für die beobachteten Effekte verantwortlich sein. Es ist bekannt, daß die Strahlenresistenz von Versuchstieren mit einer Fraktionierung niedriger Dosisraten über mehrere Tage ansteigt.

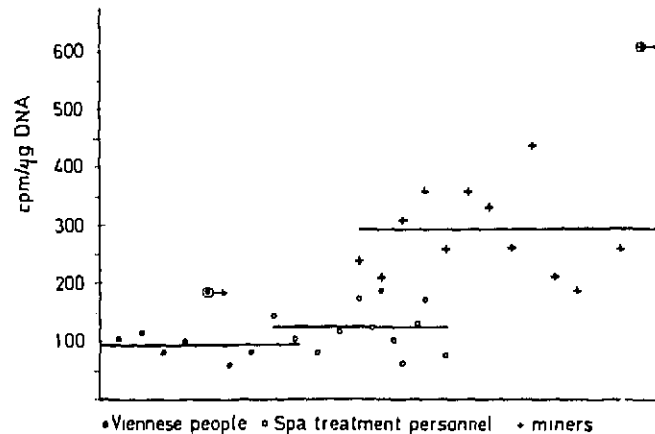
Tabelle 1: Unprogrammierte DNA Synthese in Lymphozyten von Stollenarbeitern und Kontrollen nach 200 erg/mm² UV-Bestrahlung.

	Zahl der untersuchten Personen	rel. Reflexion der Photokörner/Zelle	% markierte Zellen
Stollenarbeiter	11	35,8 (±6,5)	76,5 (±8,0)
Kontrollen	6	21,8 (±2,4)	57,3 (±2,2)
Irrtumswahrscheinlichkeit		<0,1%	<0,1%

90 min DNA repair incorporation in native DNA of lymphocytes after UV damage

Abb. 10

90 min Reparaturinkorporation in Lymphozyten von Wiener Kontrollen (●), Badepersonal in Gastein (○) und Stollenarbeitern (+).

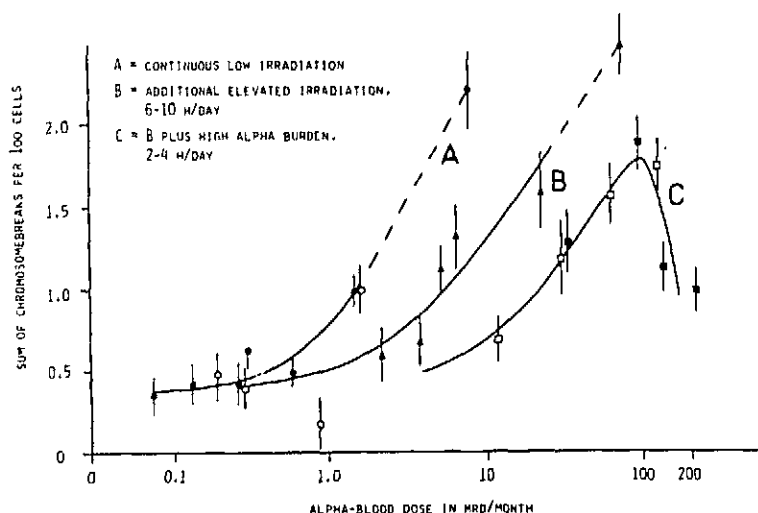


Die Reparatursteigerung durch wiederholte Exposition ließe sich mit einer Induktion von Reparaturenzymen erklären. Eine solche Induktion wurde bisher hauptsächlich bei Mikroorganismen als sogenannter SOS-Repair nachgewiesen (1). Dieser induzierbare Reparaturvorgang ist in seinem Mechanismus noch nicht völlig bekannt, gewiß ist aber, daß er mit einer höheren Mutationsrate verbunden ist, was darauf hinweist, daß er nicht so präzise wie die Exzisionsreparatur arbeitet. Ein induzier-

barer Reparaturvorgang wurde vor kurzer Zeit in Affenzellen beschrieben (2). Wieweit die Steigerung der Reparatursynthese durch niedere Strahlendosen nun auf echte Enzyminduktion zurückzuführen ist und ob der induzierte Reparaturvorgang fehlerfrei oder fehlerhaft arbeitet, läßt sich an Hand unserer bisherigen Untersuchungen nicht aussagen. Interessant ist allerdings, daß Untersuchungen über Chromosomenaberrationen in denselben Populationsgruppen von Badgastein ebenfalls eine Abnahme der Anomalien bei Stollenarbeitern mit regelmäßiger Einfahrt in den radioaktiven Stollen zeigen (Abb. 11).

Abb. 11

Summe der Chromosomenbrüche.
A= Bevölkerung in Gastein,
B= Badepersonal,
C= Stollenarbeiter.



Dies spricht eher für eine korrekte DNA Reparatur, da zwischen der Manifestation von DNA Schäden und dem Auftreten von Chromosomenaberrationen sicherlich Zusammenhänge bestehen.

LITERATUR

1. BRIDGES, B.A.: Molec.gen.Genet. 151 (1977) 115-120.
2. SARASIN, A.R. und P.C. HANAWALT: Proc.Natl.Acad.Sci.USA 75 (1978) 346.
3. POHL-RÜHLING, J., FISCHER, P. und H. ALTMANN: Correlation between chromosome aberrations and DNA repair capacity in the peripheral blood lymphocytes of persons due to inhalation of radon and daughters. Vortrag gehalten beim Ann.Meeting "DNA-Repair and Late Effects", Tel Aviv 1.-5. Mai 1978.

SGAE-Berichte

Eigentümer, Herausgeber, Verleger und Druck:

Österreichische Studiengesellschaft für Atomenergie Ges.m.b.H.

Nach dem Pressegesetz verantwortlich: Prof. Dr. Hans GRÜMM,
alle Lenaugasse 10, 1082 Wien, Tel. (0222) 42 75 11, Telex 7-5400.

Für diesen Bericht behalten wir uns alle Rechte vor.