

Benjamin Gauter

**DNA-Doppelstrangbruchmessung mithilfe der
Pulsfeldgelelektrophorese: Analyse von Fragmentverteilungen nach
Reparaturinkubation bestrahlter Säugetierzellen**

Geboren am: 13.12.1971 in Berlin

Reifeprüfung am 13.06 1971 in Berlin

Studiengang der Fachrichtung Medizin vom SS 1992 bis WS 1999

Physikum am 12.04.1994 an der Freien Universität Berlin

Klinisches Studium in Heidelberg

Praktisches Jahr in Zug/Schweiz; Indianapolis/USA; Heidelberg

Staatsexamen am 3.11.1999 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Humanmedizin

Doktorvater: Priv.-Doz. Dr. rer. nat. K.J. Weber

Die Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE) ist die zur Zeit am meisten verwendete Methode zur Messung von Induktion und Reparatur (Rejoining) von DNA-Doppelstrangbrüchen (DNA-DSB) in zellulärer DNA. Die DSB-Induktion kann dabei durch die Analyse der DNA-Fragmentverteilungen oder durch Bestimmung des elektrophoretisch mobilen DNA-Anteils („fraction released“ oder FR-Wert) entsprechend dem Formalismus für zufallsverteilte Brüche („random breakage model“ - RBM) quantifiziert werden. Rejoining Messungen werden meist unter Verwendung der FR-Werte durchgeführt und die Fraktion nicht-rejoinder, residualer DSB wird als Dosisäquivalent (FR-Wert ohne Reparatur aus Induktionsdosis) relativ zur Induktionsdosis angegeben. Diese Art der Analyse impliziert, daß die residualen Brüche ebenfalls zufallsverteilt sind. Desweiteren sollten bei Gültigkeit dieser Annahme die erstellten Rejoining-Kinetiken vom gewählten Fragmentlängenbereich unabhängig sein. Diese Hypothesen sollten hier überprüft werden.

V79- und MeWo- (humanes Melanom) Zellen wurden nach Erreichen der Konfluenz in eine low-melt Agarose Matrix eingebettet oder im Monolayer belassen und mit verschiedenen Dosen bis 100 Gy (auf Eis) bestrahlt oder nach Exposition mit 90 Gy (auf Eis) für verschiedene Zeiten unter Kulturbedingungen inkubiert. Unmittelbar nach Bestrahlung bzw. Reparaturinkubation wurden die Zellen in den Agaroseplugs lysiert und danach in ein 1%-iges Agarose PFGE-Gel eingegossen. Die PFGE erfolgte bei 14°C in 0,5×TBE-Lösung und 1,5 V/cm mit Pulszeitenvon 50 – 5000 sec über 72 Stunden. Nach Färbung mit Ethidiumbromid über Nacht (0,5 µg/ml, mindestens für 12 Stunden) wurde die Fluoreszenz durch Anregung mit einem 303 nm Transilluminator und einer gekühlten CCD-Kamera gemessen. Die Quantifizierung erfolgte mithilfe digitaler Bildverarbeitung.

Die DNA Fragmentprofile nach 90 Gy und nach Reparaturinkubation und für beide untersuchten Zelllinien weisen signifikante Abweichungen von den Profilen auf, die mit einer geringeren Dosis ohne Reparatur bei gleichem FR-Wert erhalten wurden. Insbesondere wird für alle untersuchten Reparaturzeiten (bis 4 Stunden) eine Persistenz von kleineren Fragmenten in den entsprechenden Verteilungen festgestellt (im analysierten Bereich von ca. 8 Mbp bis 1 Mbp). Eine mögliche artefizielle Degradation der DNA während der Reparaturinkubation wurde durch Bestimmung der Gesamtmasse von DNA entsprechender Proben im Gel (nach Elektrophorese) überprüft. Bis zu 8 Stunden Reparaturinkubation (nach 90 Gy) trat kein inkubationsabhängiger DNA-Verlust auf, der mit einem progressiven DNA-Abbau verbunden sein sollte.

Die Induktionskurven wurden mithilfe des „random breakage“-Modells analysiert und ergaben bezüglich DNA-Fragmenten < 4,6 Mbp (Saccharomyces pombe-Marker) gute Übereinstimmung mit dem Verlauf des RBM. Für die gesamte elektrophoretisch mobile Fraktion (DNA-Fragmente < 10 Mbp) war die Übereinstimmung weniger gut, da in dem Bereich > 4,6 Mbp unter den gewählten Laufbedingungen Inversionsphänomene beobachtet wurden, und die Daten wurden deshalb für das Gesamtintervall nicht gefittet. Beide Kurvenpaare (V79 und MeWo) dienten aber zur Bestimmung des Dosisäquivalentes für FR-Werte nach Reparaturinkubation.

Die Fraktion residualer Brüche (Dosisäquivalente relativ zur Induktionsdosis) zeigt eine klare Abhängigkeit von der Wahl des analysierten Fragmentlängenintervalls - im Gegensatz zu einer Situation zufallsverteilter residualer Brüche. Die Überrepräsentation kleinerer Fragmente nach Reparaturinkubation indizieren einen Positionseffekt auf die Rate des DSB-Rejoinings.

Definitive Gründe für eine nicht-zufällige Prozessierung der DSB (in diesem Größenbereich) sind nicht bekannt.

Qualitativ finden sich die hier gemachten Beobachtungen in Übereinstimmung mit Daten von Johnston et al. [69,70]. Diese Autoren folgerten aus dem ausschließlich langsamen Rejoining von Fragmenten, welche bei limitierter Zelllyse mit Erhalt der nuklearen Matrix freigesetzt werden, eine Abhängigkeit der Rejoiningrate von der Chromatinorganisation. Insbesondere würden danach Fragmente von > 2 DSB innerhalb großer Chromatinschleifen (Mbp) nur langsam rejoin.

Direkte Konsequenzen aus den hier repräsentierten Resultaten und den hier gemachten Interpretationen sind (1) eine Abhängigkeit der langsam rejoinen DSB von der respektiven Bestrahlungsdosis, (2) eine Abhängigkeit der Rejoiningkinetiken, wenn mit FR-Methoden gemessen, von dem analysierten Fragmentlängenintervall, (3) eine Überschätzung der initialen Rate der DSB-Reparatur, wenn zur Bestimmung Dosisäquivalente aus FR-Werten gebildet werden und (4) damit die Schlußfolgerung, daß bei der Analyse von DSB-Rejoining mit der FR-Methode und der Angabe eines Dosisäquivalents die Rate der residualen DSB unterschätzt wird.