

Hochdurchsatzsequenzierung – ein vielseitiges Werkzeug zur Detektion strahlungsinduzierter DNA-Schäden

High-throughput Sequencing – a Versatile Tool for the Detection of Radiation-induced DNA Damage

Simon Wagner^a, Laura Kubitscheck^a, Matthias Port^a, Reinhard Ullmann^a

Zusammenfassung

Soldaten und Zivilpersonen können durch Unfälle, terroristische Anschläge oder den Einsatz von Kernwaffen ionisierender Strahlung ausgesetzt werden. Der aktuelle Krieg in der Ukraine hat verdeutlicht, dass die Bundeswehr auf nukleare Bedrohungsszenarien vorbereitet sein muss und deswegen die entsprechenden Fähigkeiten kontinuierlich ausbauen und weiterentwickeln muss. Das Institut für Radiobiologie der Bundeswehr nutzt modernste Sequenziertechnologien um die Schädigung von Strahlung auf unsere DNA qualitativ und quantitativ zu erfassen. Die im Forschungsbereich des Instituts bereits eingeführte Hochdurchsatzsequenzierung soll nun auch als biodosimetrische Anwendung etabliert werden. Damit könnte die Biodosimetrie vom immensen technologischen Entwicklungspotential der Hochdurchsatzsequenzierung profitieren und auf diese Weise der Durchsatz an Untersuchungen im Rahmen der medizinischen Akutversorgung strahlungsexponierter Personen signifikant erhöht und langfristige Risiken nach Exposition präziser abgeschätzt werden.

Schlüsselworte: Hochdurchsatzsequenzierung, Biodosimetrie, ionisierende Strahlung, Mutationen, Einzelzellsequenzierung

Summary

Soldiers and civilians can be exposed to ionizing radiation through accidents, terrorist attacks or the use of nuclear weapons. The current war in Ukraine has made it clear that the Bundeswehr must be prepared for nuclear threat scenarios and must therefore continuously expand and develop the corresponding capabilities. The Bundeswehr Institute of Radiobiology uses state-of-the-art sequencing technologies to qualitatively and quantitatively determine the damaging effects of radiation on our DNA. The high-throughput sequencing already introduced in the research area of the institute is now to be established as a biodosimetric application. Thus, biodosimetry could benefit from the immense technological development potential of high-throughput sequencing. In this way the throughput of examinations in the context of medical acute care of persons exposed to radiation could be significantly increased and long-

term risks after exposure could be assessed more precisely.

Keywords: high-throughput sequencing, biodosimetry, ionizing radiation, mutations, single cell sequencing

Hintergrund

Die Analyse genetischer Veränderungen nimmt einen immer größer werdenden Stellenwert in vielen Bereichen der Medizin ein. Beispielsweise werden in der Pathologie spezifische Mutationen als diagnostische und prognostische Marker genutzt, um klinisch relevante Subklassifikationen histologisch nicht unterscheidbarer Tumoren zu ermöglichen und therapeutische Entscheidungen unterstützen zu können, insbesondere im Zusammenhang mit personalisierter Krebstherapie. Im Bereich der vererbten Erkrankungen ermöglicht die Identifikation krankheitsspezifischer Mutationen eine frühzeitige Diagnose, oftmals sogar schon vor dem Auftreten spezifischer Symptome, und das Erkennen möglicher prädisponierender Faktoren. Gefördert wurde diese Entwicklung vor allem durch das Aufkommen moderner Hochdurchsatzsequenzierverfahren, welche die genomweite Untersuchung genetischer Veränderungen mit höchster Auflösung erlauben.

Auch das Institut für Radiobiologie der Bundeswehr (InstRadBioBw) nutzt diese neuen Sequenzierverfahren zur Detektion strahlungsinduzierter DNA-Schäden, um radiobiologische Fragestellungen zu adressieren und neue Biodosimetrieverfahren zu entwickeln. Das Vorliegen erhöhter Mutationsraten oder spezifischer Mutationsmuster nach Strahlungsexposition kann auch arbeitschutzrechtlich relevant sein. Das InstRadBioBw konzeptionierte und begleitet die vom deutschen Bundestag beauftragte Studie „Mögliche DNA-Schädigung in Nachkommen von Radartechnikern“. Durch genomweite Hochdurchsatzsequenzierung soll in dieser aktuell noch laufenden Studie geklärt werden, ob die Exposition von Radarsoldaten im Rahmen ihrer dienstlichen Tätigkeit das Risiko einer genetischen Erkrankung in deren Nachkommen erhöht hat. Mit den Ergebnissen dieser Studie ist im ersten Quartal 2023 zu rechnen.

Arten strahlungsinduzierter DNA-Schädigungen

Ionisierende Strahlung kann die DNA auf vielfältige Art schädigen – durch direktes Einwirken der Strahlungs-

^a Institut für Radiobiologie der Bundeswehr, München

energie auf die DNA-Moleküle und indirekt über Interaktion mit verschiedenen radiolytischen Zerfallsprodukten, insbesondere der Wassermoleküle, aus denen der menschliche Körper mehrheitlich besteht. Als Folge können einzelne DNA-Basen verloren gehen oder chemisch modifiziert werden. Die DNA-Doppelhelix kann an einem DNA-Strang (Single Strand break, DNA SSB) oder beidseitig an beiden Strängen brechen (DNA-Doppelstrangbruch, DNA DSB). Der Effekt ionisierender Strahlung beschränkt sich nicht auf die Schädigung der DNA-Moleküle selbst, sondern kann auch die mit der DNA assoziierten Proteine verändern und in weiterer Folge die dreidimensionale Organisation der DNA im Zellkern beeinflussen.

Zellen haben unterschiedliche DNA-Reparaturmechanismen entwickelt, die den Großteil dieser Schäden eliminieren, bevor sie sich im Zuge der nächsten Zellteilung im Genom als Basenveränderung oder strukturelle Chromosomenveränderungen manifestieren können. Das gelingt der Zelle meist, aber nicht immer. Eine besondere Gefahr für die genomische Integrität stellen dabei DNA-Doppelstrangbrüche dar. Im Zuge ihrer Reparatur kann es zum Verlust einiger Basen am Bruchpunkt kommen oder sogar zum fehlerhaften Verknüpfen zweier nicht zusammengehörender Chromosomenstücke. Passiert dies innerhalb eines Chromosoms, kann das zum Verlust oder Gewinn chromosomalen Materials kommen (**Kopienzahlvariante**, CNV), oder es wird ein chromosomales Fragment ohne **DNA-Kopienzahländerung** innerhalb des Chromosoms auf den Kopf gestellt (Inversion). Werden im Zuge der dysfunktionalen DNA-Doppelstrangreparatur zwei unterschiedliche Chromosomen

verknüpft, spricht man von einer **Translokation**. Eine Sonderform der Translokation ist das **dizentrische Chromosom**, bei dem ein derivatives Fusionschromosom mit zwei Zentromeren entsteht. Persistierende DNA-Läsionen können replikativen Stress verursachen, der zum Auftreten neuer DNA-Doppelstrangbrüche selbst Stunden bzw. Tage nach Exposition führen kann.

Die dynamische Entwicklung der Hochdurchsatzsequenzierung

Lange war die klassische Sanger-Sequenzierung weltweit das Standardsequenzierverfahren. Als Ergebnis zahlreicher Optimierungen seit seiner Erstpublikation im Jahre 1977 kann man damit mittlerweile die Basenabfolge von DNA-Fragmenten mit einer Länge von bis zu 800 Basen aufklären. Pro Sequenzreaktion kann mit Sanger-Sequenzierung allerdings immer nur ein einzelnes DNA-Fragment untersucht werden, weshalb das interessierende Fragment zuvor durch Klonierung oder PCR isoliert dargestellt werden muss. Will man einen längeren genomischen Abschnitt entziffern, muss man zahlreiche dieser DNA-Fragmente – einem Puzzle gleich – zusammensetzen. Vor diesem Hintergrund wird nachvollziehbar, welche große wissenschaftliche Leistung die erstmalige Sequenzierung der etwa 3 Milliarden Basen des humanen Genoms unter Anwendung der Sanger Sequenzierung war [4,10].

Seit der Sequenzierung des ersten humanen Genoms, die von ~1990 bis 2001 dauerte und mehrere Milliarden Dollar kostete, hat sich die Technologie fundamental weiterentwickelt. Durch Miniaturisierung und Parallelisierung

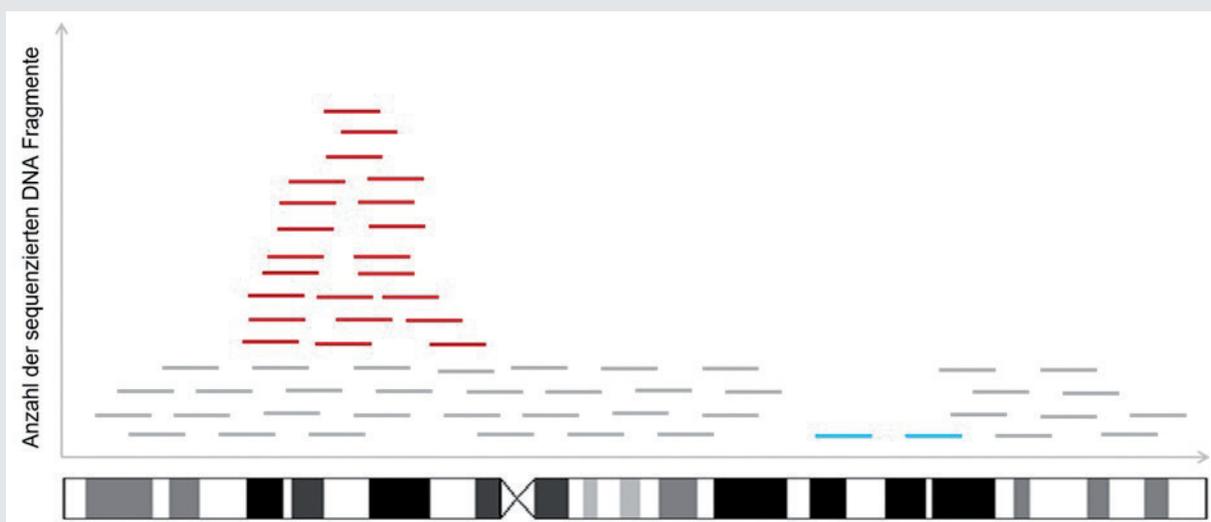


Abb. 1: Schematische Darstellung der Identifikation chromosomaler Gewinne und Verluste durch Hochdurchsatzsequenzierung: Die sequenzierten DNA-Fragmente werden im Genom verortet und ihre Verteilung entlang der Chromosomen quantifiziert. Im Anschluss wird die lokale Anzahl an sequenzierten DNA-Fragmenten mit dem gesamtgenomischen Durchschnitt abgeglichen (graue horizontale Balken). Ein chromosomaler Verlust hat zur Folge, dass für die jeweilige Region weniger DNA-Fragmente relativ zum gesamtgenomischen Durchschnitt vorhanden sind (blaue horizontale Balken). Bei einem chromosomalen Gewinn sind die DNA-Fragmente der korrespondierenden Region überrepräsentiert (rote horizontale Balken).

der Sequenzierreaktionen können mittlerweile viele Millionen DNA-Fragmente gleichzeitig sequenziert werden. Das am InstRadBioBw genutzte Gerät kann bis zu 400 Millionen unterschiedliche DNA-Fragmente in einem Lauf sequenzieren. Andere Geräte können sogar 16–20 Milliarden DNA-Fragmente in einem Durchlauf lesen, was der vollständigen Sequenzierung von ~48 humanen Genomen innerhalb von 44 Stunden entspricht. Die einstmalige Utopie des „1000.- Dollar Genoms“, der vollständigen Sequenzierung eines humanen Genoms für einen Preis unter 1000.- Dollar, ist längst von der Realität unterboten worden [1].

Analyse chromosomaler Veränderungen mittels Hochdurchsatzsequenzierung

Anders als bei der klassischen Sanger-Sequenzierung beschränkt sich das Anwendungsspektrum der Hochdurchsatzsequenzierung nicht auf das Lesen der Sequenz und das Auffinden einzelner Basenveränderungen. Vielmehr repräsentiert die Hochdurchsatzsequenzierung eine vielseitige Analyseplattform, die für die genomweite Detektion unterschiedlichster genetischer und epigenetischer Veränderungen genutzt werden kann. Im Folgenden werden zwei Anwendungen beschrieben, wie sie am Institut für Radiobiologie etabliert sind. Gemein-

sam ist den hier beschriebenen Methoden, dass sie eine DNA-Sequenzinformation nur nutzen, um das jeweilige DNA-Fragment im Genom zu verorten. Das wesentliche Ergebnis dieser Analysen beruht auf der Quantifizierung der verorteten DNA-Fragmente, d. h. der Feststellung, wieviele DNA-Fragmente einem bestimmten chromosomalen Abschnitt zugeordnet werden können.

Eine auf diesem Prinzip beruhende Anwendung auf RNA-Ebene hatten wir bereits 2021 in der Wehrmedizinischen Monatsschrift beschrieben, nämlich unsere Untersuchungen zu den Auswirkungen von CT-Untersuchungen auf die Genregulation [2]. Analog dazu kann man die Quantifizierung der DNA-Fragmente für die Detektion chromosomaler Gewinne und Verluste nutzen. Wie in Abbildung 1 schematisch dargestellt, werden alle Sequenzfragmente im Genom verortet. DNA-Kopienzahlunterschiede zeigen sich dann als statistisch signifikante Unterschiede in der Verteilung der Fragmente in einer chromosomalen Region relativ zum restlichen Genom [7]. Die Untersuchung chromosomaler Gewinne und Verluste kann Hinweise auf für die Entwicklung strahlungsinduzierter Tumore wichtige Onkogene und Tumorsuppressorgene geben.

In Kooperation mit dem Bundesamt für Strahlenschutz nutzen wir aktuell diese Strategie, um chromosomale

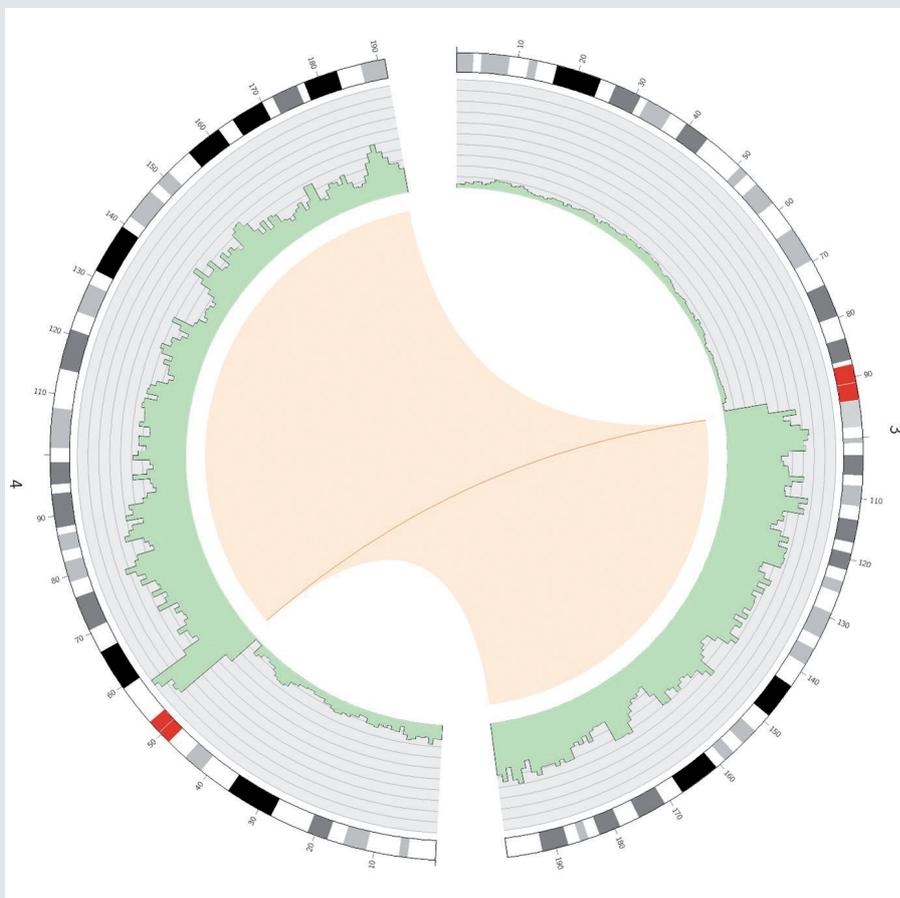


Abb. 2: Detektion chromosomaler Translokationen durch Hochdurchsatzsequenzierung: In diesem sogenannten Circos-Plot sind die Ideogramme des Chromosoms 4 (außen links) und Chromosoms 3 (außen rechts) als Halbkreise dargestellt. In den dazu benachbarten Histogrammen wird in Grün die durch Hochdurchsatzsequenzierung ermittelte Wahrscheinlichkeit der räumlichen Nähe von Chromosom 3 und 4 im Zellkern angezeigt. Durch eine Translokation zwischen den beiden Chromosomen ändert sich deren Positionierung im Zellkern. Der abrupte Anstieg der Wahrscheinlichkeit für eine benachbarte Lage der involvierten Chromosomensegmente im Zellkern weist auf die Lokalisation der beiden DNA Doppelstrangbrüche hin, deren dysfunktionale Reparaturen zur Translokation geführt haben. Im Inneren des Kreises verbindet die braune Linie die beiden chromosomalen Bruchpunkte. Das hellbraune Band zeigt die fusionierten Chromosomenfragmente.

Veränderungen in Lungentumoren ehemaliger Uranbergbauarbeiter der früheren Wismut AG zu identifizieren. Die Arbeiter waren besonders in der frühen Phase des Uranabbaus erhöhten Belastungen durch Feinstaub, Silikaten und vor allem dem alpha-Strahler Radon ausgesetzt, was die Untersuchung dieser Tumoren radiobiologisch außerordentlich interessant macht [3]. Bei der Suche nach radonspezifischen chromosomalen Veränderungen in diesen Tumorproben muss natürlich bedacht werden, dass viele der Uranbergbauarbeiter auch Raucher waren und die Muster der chromosomalen Veränderungen in den Lungentumoren dieser Gruppe das additive Zusammenwirken verschiedener mutagener Prozesse widerspiegeln. Es wurden deshalb besondere statistische Verfahren aus dem Bereich des „machine learnings“ angewandt, um die unterschiedlichen Mutationssignaturen bestmöglich zu trennen. Die Relevanz der durch diese Untersuchungen identifizierten Kandidatengene wird derzeit mittels funktioneller Studien überprüft.

Auch chromosomale Translokationen können mittels Hochdurchsatzsequenzierung identifiziert werden. Der Vorteil im Vergleich zu klassischen zytogenetischen und molekular-zytogenetischen Verfahren ist, dass es keine teilungsfähigen Zellen braucht und die chromosomalen Bruchpunkte auf die Base genau bestimmt werden können. Anders als bei zytogenetischen Verfahren mit einem Auflösungsvermögen von ca. 10 Millionen Basen, können Fusionsgene und chromosomale Regionen mit erhöhter Vulnerabilität präzise bestimmt werden. Am InstRadBioBw charakterisieren wir Translokationen mit Hi-C [8, 9], einer auf Hochdurchsatzsequenzierung basierenden Methode, die ursprünglich für die Analyse der dreidimensionalen Organisation der DNA im Zellkern entwickelt wurde [5, 6]. Chromosomale Translokationen verändern die räumliche Organisation des Zellkerns und die Position der Chromosomen zueinander, was mittels Hi-C außerordentlich verlässlich und robust angezeigt wird (Abbildung 2).



Abb. 3: Hochdurchsatzsequenziergerät:
Der am Institut für Radiobiologie eingesetzte NextSeq500 der Firma Illumina ermöglicht die gleichzeitige Sequenzierung von bis zu 400 Millionen DNA Fragmenten. Im Vordergrund sieht man die sogenannte Flowcell, in der die eigentliche Sequenzierreaktion passiert.

Entwicklung neuer Verfahren für die Biodosimetrie – ein Ausblick

Kommt es zu einer Strahlenexposition durch Unfall, terroristische Aktivität oder den Einsatz von Nuklearwaffen, ist es für den effizienten und adäquaten Einsatz sanitätsdienstlicher Ressourcen essenziell, möglichst schon vor Eintreten klinischer Symptome exponierte Personen mit Therapiebedarf von nicht oder nur gering exponierten Personen unterscheiden zu können. Der kriegerische Konflikt in der Ukraine hat wieder einmal deutlich gemacht, dass sich die Bundeswehr auf solche Bedrohungsszenarien vorbereiten und ihre entsprechenden diagnostischen Fähigkeiten kontinuierlich weiterentwickeln muss.

Ein wesentliches Instrument für die retrospektive Dosisabschätzung ist die **Biodosimetrie**. Grundprinzip der Biodosimetrie ist, dass das Ausmaß strahleninduzierter biologischer Schäden mit der ursächlichen Strahlendosis korreliert. Biodosimetrische Methoden machen sich diese Korrelation zunutze, indem sie über quantitative Bestimmung der DNA-Schäden Rückschlüsse auf die Strahlendosis ermöglichen.

Es gibt verschiedene biodosimetrische Verfahren. Die Etabliertesten basieren auf der mikroskopischen Quantifizierung struktureller Chromosomenveränderungen, insbesondere der Häufigkeit dizentrischer Chromosomen, die die retrospektive Dosisabschätzung mit beeindruckender Präzision ermöglicht (Abbildung 3). Da diese chromosomalen Veränderungen allerdings nur in bestimmten Zellzyklusphasen mikroskopisch sichtbar sind, benötigen diese Verfahren lebende Zellen als Ausgangsmaterial, welche in Kultur genommen und zur Zellteilung stimuliert werden müssen. Das kostet wertvolle Zeit und wirkt sich negativ auf den Probendurchsatz aus. Vor dem Hintergrund der erfolgreichen Analyse verschiedener struktureller Chromosomenveränderung durch Hochdurchsatzsequenzierung am InstRadBioBw wollen wir in einem laufenden Sonderforschungsvorhaben überprüfen, ob diese Analyseplattform auch für die Biodosimetrie genutzt werden kann. Der methodische Ansatz ist anspruchsvoll, da durch ionisierende Strahlung in jeder exponierten Zelle ein individuelles Set chromosomaler Veränderungen erzeugt wird, welches bei Analyse einer Zellpopulation durch die jeweils anderen Zellen maskiert wird. Erst durch die Sequenzierung einzelner Zellen werden diese individuellen Mutationen detektierbar.

Schlussfolgerung

Die Hochdurchsatzsequenzierung ist eine vielseitige Analyseplattform, die der Radiobiologie neue Perspektiven eröffnet. Ein besonders spannender Aspekt dabei ist die Sequenzierung von Einzelzellen, die das Potenzial hat, den Durchsatz der Biodosimetrie beachtlich zu erhöhen, die benötigte Analysezeit zu verringern und dabei

nicht von der Verfügbarkeit teilungsfähiger Zellen abhängig ist.

Literatur

1. Check Hayden E: Technology: The \$1,000 genome. *Nature* 2014; 507(7492): 294–295.
2. Kaatsch HL: Radiobiologische Effekte der modernen Computertomografie – Einblicke in die Genexpression, Epigenetik und DNA-Schädigung peripherer Blutzellen nach CT-Bestrahlung (Vortrags-Abstract). *WMM* 2021; 65(11): S8-S10.
3. Kreuzer M, Fenske N, Schnelzer M, Walsh L: Lung cancer risk at low radon exposure rates in German uranium miners. *Br J Canc* 2015; 113(9): 1367–1369.
4. Lander ES, Linton LM, Birren B et al.: Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 2001; 409(6822): 860–921.
5. Lieberman-Aiden E, van Berkum NL, Williams L et al.: Comprehensive mapping of long-range interactions reveals folding principles of the human genome. *Science* 2009; 326(5950): 289–293.
6. Rao SS, Huntley MH, Durand HC et al.: A 3D map of the human genome at kilobase resolution reveals principles of chromatin looping. *Cell* 2014; 159(7): 1665–1680.
7. Scheinin I, Sie S, Bengtsson H et al.: DNA copy number analysis of fresh and formalin-fixed specimens by shallow whole-genome sequencing with identification and exclusion of problematic regions in the genome assembly. *Genome Res* 2014; 24(12): 2022–2032.
8. Steininger A, Ebert G, Becker BV et al.: Genome-Wide Analysis of Interchromosomal Interaction Probabilities Reveals Chained Translocations and Overrepresentation of Translocation Breakpoints in Genes in a Cutaneous T-Cell Lymphoma Cell Line. *Front Oncol* 2018; 8: 183.
9. Ullmann R, Becker BV, Rothmiller S et al.: Genomic Adaption and Mutational Patterns in a HaCaT Subline Resistant to Alkylating Agents and Ionizing Radiation. *Int J Mol Sci* 2021; 22(3).
10. Venter JC, Adams MD, Myers EW et al.: The Sequence of the Human Genome. *Science* 2001; 291(5507): 1304–1351.

Manuskriptdaten

Zitierweise

Wagner S, Kubitscheck L, Port M, Ullmann R: Hochdurchsatzsequenzierung – ein vielseitiges Werkzeug zur Detektion strahlungsinduzierter DNA-Schäden. *WMM* 2023; 67 (3): 60-64.

DOI: <https://doi.org/10.48701/opus4-106>

Für die Verfasser

Regierungsdirektor Priv.-Doz. Mag. Dr. Reinhard Ullmann
 Institut für Radiobiologie der Bundeswehr
 Neuherbergstrasse 11, 80937 München
 E-Mail: reinhard1ullmann@bundeswehr.org

Manuscript Data

Citation

Wagner S, Kubitscheck L, Port M, Ullmann R: High-throughput sequencing - a versatile tool for the detection of radiation-induced DNA damage. *WMM* 2023; 67 (3): 60-64.

DOI: <https://doi.org/10.48701/opus4-106>

For the authors

Regierungsdirektor Priv.-Doz. Mag. Dr. Reinhard Ullmann
 Institute für Radiobiology, German Armed Forces
 Neuherbergstrasse 11, 80937 München
 E-Mail: reinhard1ullmann@bundeswehr.org