

Radiation-induced genomic instability and bystander effects: implications for radiation protection

J.B. Little

Laboratory of Radiobiology, Harvard School of Public Health, Boston MA 02115, USA

Extrait

2. Radiation induced genomic instability

The term radiation-induced genomic instability refers to a phenomenon observed in a number of different cellular systems whereby radiation exposure appears to induce a type of instability in individual cells that is transmitted *to* their progeny, leading to a persistent enhancement in the rate at which genetic changes arise in the descendants of the irradiated cell after many generations of replication. The genetic endpoints studied have included malignant transformation, chromosomal aberrations, specific gene mutations, and cell survival. Typically, this phenomenon has been studied by examining the occurrence of such genetic effects in clonal populations derived from single cells surviving radiation exposure. This phenomenon is illustrated schematically in Figure 1 for the induction of mutations in an irradiated cell population (Little, 2000).

Mutations are generally rare events, occurring with frequency around 10^{-5} . By the standard paradigm, a specific mutation would be induced in a small fraction of the irradiated cells (B); this mutation would be transmitted to all of the progeny of that cell. Most cells in the population, however, would not be mutated at that locus (A). The radiation induced genomic instability phenomenon is shown in C and D; whereas no mutations were induced in the irradiated cells themselves, an increased frequency of mutants arises in the descendants of many of the irradiated cells in the population. Early evidence for the existence of such a phenomenon was derived from an examination of the kinetics of radiation-induced malignant transformation of cells *in vitro* (Kennedy *et al.*, 1980; Kennedy and Little, 1984). These results suggested that transformed foci did not arise from a single, radiation damaged cell. Rather, radiation appeared *to* induce a type of instability in 20-30% of the irradiated cell

Instabilité génomique induite par les radiations et effets de proximité: implications pour la radioprotection

J.B. Little

Laboratory of Radiobiology, Harvard School of Public Health, Boston MA 02115, USA

Extrait

2. Instabilité génomique induite par les rayonnements

Le terme instabilité génomique induite par le rayonnement se réfère à un phénomène observé dans un certain nombre de systèmes cellulaires où l'exposition aux rayonnements semble induire un type d'instabilité dans des cellules individuelles qui sont transmises à leur descendance, conduisant à une augmentation persistante de la vitesse à laquelle les changements génétiques surviennent dans les descendants des cellules irradiées après de nombreuses générations de réplication. Les conséquences génétiques étudiées ont inclus la transformation maligne, les aberrations chromosomiques, les mutations génétiques spécifiques, et la survie des cellules. De façon générale, ce phénomène a été étudié en examinant la survenue de tels effets génétiques dans des populations clonales issues de cellules uniques survivant à l'exposition aux rayonnements. Ce phénomène est illustré schématiquement à la Figure 1 pour l'induction de mutations dans une population de cellules irradiée (Little, 2000).

Les mutations sont des événements rares en général, survenant avec une fréquence autour de 10^{-5} . D'après le paradigme standard de la radiobiologie, une mutation particulière serait induite dans une petite fraction des cellules irradiées (B), cette mutation serait transmise à toute la descendance de cette cellule. Cependant la plupart des cellules dans la population ne serait pas mutée à ce locus (A). Le phénomène d'instabilité génomique induit par la radiation est représenté en C et D, alors qu'aucune mutation n'a été induite dans les cellules irradiées elles-mêmes, une fréquence accrue de mutants survient chez les descendants d'un grand nombre de cellules irradiées dans la population. Les premiers signes de l'existence d'un tel phénomène ont été déduits d'un examen de la cinétique de la transformation maligne radio-induite des cellules *in vitro* (Kennedy *et al.*, 1980; Kennedy et Little, 1984). Ces résultats suggèrent que des foyers transformés ne surviennent pas à partir d'une seule cellule endommagée par rayonnement. Plutôt, le rayonnement semble induire un type d'instabilité dans 20-30% de la population de cellules irradiées;

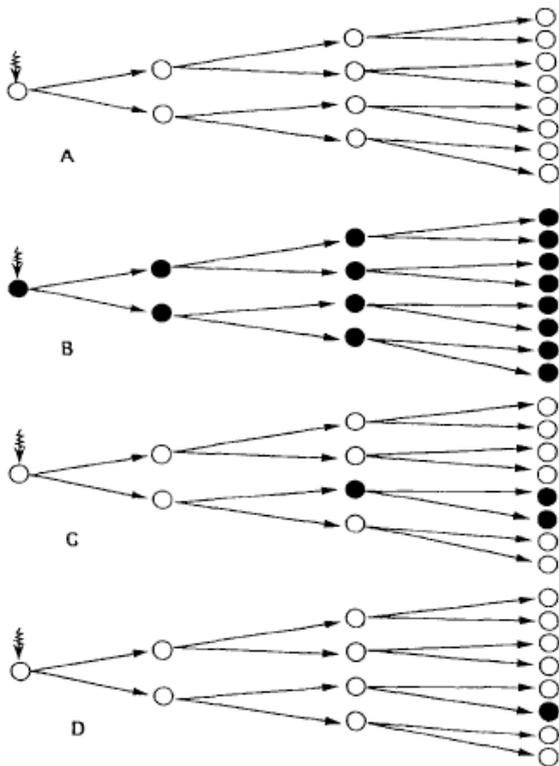


Figure 1 Schematic representation of radiation-induced genomic instability. Open circles represent normal wild-type cells, while closed circles represent mutated cell. (B) Example of a cell directly mutated by radiation exposure; the mutation is transmitted to all of its progeny. However, most of the cells in the irradiated population will retain the wild-type phenotype (A). (C and D) Examples of mutations arising as a result of radiation-induced genomic instability. The irradiated cell and its immediate progeny are wild-type, but the frequency with which mutations arise amongst the more distant descendants of the irradiated cell is elevated (Little, 2000).

population; this instability enhanced the probability of the occurrence of a second, neoplastic-transforming event. This second event was a rare one, occurring with the frequency of approximately 10^{-6} , and involved the actual transformation of one or more of the progeny of the original irradiated cells after many rounds of cell division. This transforming event occurred with the constant frequency per cell per generation, and had the characteristics of a mutagenic event (Kennedy *et al.*, 1984). Thus, neoplastically transformed foci did not appear to arise from the original irradiated cell but rather from one or more of its progeny. These findings were consistent with the hypothesis that radiation induces genetic instability in cells that enhances the rate at which malignant

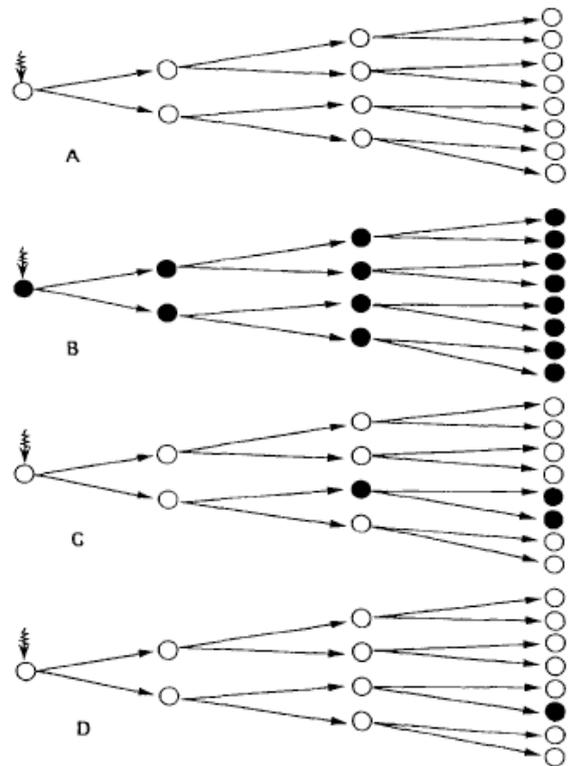


Figure 1 Représentation schématique de l'instabilité génomique radio-induite. Les cercles ouverts représentent les cellules normales de type « sauvage », les cercles pleins représentent les cellules mutées. (B) Exemple d'une cellule mutée directement après irradiation; la mutation est transmise à toute la descendance. Cependant, la plupart des cellules de la population irradiée conservent le phénotype de type « sauvage » (A). Les exemples (C et D) de mutation résultant d'une instabilité génomique radio-induite. La cellule irradiée et sa descendance directe sont de type « sauvage », mais la fréquence à laquelle les mutations surviennent chez les descendants de la cellule irradiée est élevée (Little, 2000).

cette instabilité augmente la probabilité de la survenue d'un second événement de transformation néoplasique. Ce second événement est un événement rare, survenant avec une fréquence d'environ 10^{-6} , et implique dans cette transformation un ou plusieurs des descendants des cellules irradiées d'origine après de nombreuses séries de divisions cellulaires. Cet événement de transformation survient avec une fréquence constante par cellule et par génération, et a les caractéristiques d'un événement mutagène (Kennedy *et al.* 1984). Ainsi, les foyers néoplasiques transformés ne semblent pas provenir de la cellule irradiée à l'origine, mais plutôt d'un ou plusieurs de ses descendants. Ces résultats sont compatibles avec l'hypothèse que le rayonnement induit une instabilité génétique dans les cellules qui augmente la vitesse à laquelle la transformation maligne ou d'autres événements génétiques se produisent chez les

transformation or other genetic events occur in descendants of irradiated cells after many generations of cell replication.

This hypothesis has subsequently been confirmed in a number of experiment systems for various genetic endpoints (Morgan *et al.*, 1996; Little, 1998; Baverstock, 2000; Romney *et al.*, 2001 a). In terms of mutagenesis, approximately 10% of clonal populations derived from single cells surviving radiation exposure showed a significant elevation in the frequency of spontaneously arising mutations as compared with clonal populations derived from non-irradiated cells (Chang and Little, 1992; Little *et al.*, 1997). This increased mutation rate persisted for approximately 30 generations post-irradiation then gradually subsided. Interestingly, the molecular structural spectrum of these late-arising mutants resembles those of spontaneous mutations in that the majority of them are point mutations (Grosovsky *et al.*, 1996; Little *et al.*, 1997), indicating that they arise by a different mechanism from that of direct X-ray-induced mutations which involve primarily deletions. An enhancement of both minisatellite (Li *et al.*, 1992) and microsatellite (Romney *et al.*, 2001b) instability has also been observed in the progeny of irradiated cells selected for mutations at the *thymidine kinase* locus, further evidence that a subpopulation of genetically unstable cells arises in irradiated populations. It is of interest that instability as measured in minisatellite sequences of X-ray-transformed mouse 10T% cells was markedly enhanced when the cells were grown *in vivo* as compared to prolonged cultivation *in vitro* (Paquette and Little, 1994).

An enhanced frequency of non-clonal chromosomal aberrations was first reported in clonal descendants of mouse hematopoietic stem cells examined 12-14 generations after exposure to alpha radiation (Kadhim *et al.*, 1992).

Persistent radiation-induced chromosomal instability has since been demonstrated in a number of other cellular systems (Sabatier *et al.*, 1992; Holmberg *et al.*, 1993; Marder and Morgan, 1993; Kadhim *et al.*, 1995; Little *et al.*, 1997; Ponnaiya *et al.*, 1997). Susceptibility to radiation-induced chromosomal instability differs significantly among cells from different strains of mice (Watson *et al.*, 1996a; Ponnaiya *et al.*, 1997). It is now clear that genomic instability, both chromosomal and mutational instability, can be induced by high or low LET radiation (Little *et al.*, 1997; Belyakov *et al.*, 1999; Limoli *et al.*, 2000; Evans *et al.*, 2001) and in most cell types. It has been shown recently that long-term instability can be induced by irradiation of cells

descendants des cellules irradiées après de nombreuses générations de réplication cellulaire.

Cette hypothèse a ensuite été confirmée dans un certain nombre de systèmes expérimentaux pour des paramètres génétiques variés (Morgan *et al.*, 1996; Little, 1998; Baverstock, 2000; Romney *et al.*, 2001 a). En termes de mutagenèse, environ 10% des populations clonales issues de cellules uniques survivant à l'exposition aux rayonnements ont montré une élévation significative de la fréquence des mutations survenant spontanément par rapport aux populations clonales issues de cellules non irradiées (Chang et Little, 1992; Little *et al.*, 1997).. Ce taux de mutation plus élevé a persisté pendant environ 30 générations après l'irradiation, puis a peu à peu disparu. Fait intéressant, le spectre structural moléculaire de ces mutants tardifs ressemble à celui de mutations spontanées en cela que la majorité d'entre eux sont des mutations ponctuelles (Grosovsky *et al.*, 1996; Little *et al.*, 1997), ce qui indique qu'ils relèvent d'un mécanisme différent de celui des mutations directes aux rayons X qui impliquent principalement des délétions. Une augmentation de l'instabilité des minisatellites (Li *et al.*, 1992) et des microsatellites (Romney *et al.*, 2001b) a également été observée dans la descendance des cellules irradiées sélectionnées par les mutations au niveau du locus de la thymidine kinase, une preuve supplémentaire que la sous-population de cellules génétiquement instables survient dans les populations irradiées. Il est intéressant de noter que l'instabilité telle que mesurée dans des séquences de minisatellite de cellules de souris transformées par les rayons X 10% ont été nettement améliorées lorsque les cellules ont été cultivées *in vivo* par rapport à une culture prolongée *in vitro* (Paquette et Little, 1994).

Une fréquence accrue des aberrations chromosomiques non-clonales a été signalée dans la descendance clonale de cellules souches hématopoïétiques de souris examinées 12-14 générations après l'exposition à des rayonnements alpha (Kadhim *et al.*, 1992).

Une instabilité chromosomique radio-induite persistante a depuis été démontrée dans un certain nombre d'autres systèmes cellulaires (Sabatier *et al.*, 1992; Holmberg *et al.*, 1993; Marder et Morgan, 1993; Kadhim *et al.*, 1995; Little *et al.*, 1997; Ponnaiya *et al.*, 1997). La sensibilité à l'instabilité chromosomique radio-induite diffère de façon significative entre les cellules de différentes souches de souris (Watson *et al.*, 1996a; Ponnaiya *et al.*, 1997.). Il est maintenant clair que l'instabilité génomique, à la fois chromosomique et de mutation, peut être induite par les rayonnements à TLE élevé ou faible (Little *et al.*, 1997; Belyakov *et al.*, 1999; Limoli *et al.*, 2000; Evans *et al.*, 2001) et dans la plupart des types cellulaires. Il a été montré récemment que l'instabilité à long terme peut être induite par l'irradiation des cellules

with single alpha particles from a focused microbeam (Kadhim *et al.*, 2001), supporting earlier observations that the instability phenotype can be activated by low radiation doses, becoming saturated at higher doses (Kadhim *et al.*, 1995; Grosovsky *et al.*, 1996; Little *et al.*, 1997).

Finally, a persistently increased rate of cell death has been shown to occur in cell populations many generations after irradiation (Seymour *et al.*, 1986; Chang and Little, 1992; Belyakov *et al.*, 1999). This phenomenon has been variously referred to as occurring as a result of “lethal mutations” or “delayed reproductive failure”, but has been measured as a reduction in the ability of cells to attach and form macroscopic colonies in a classic clonogenic survival assay. In some cellular systems, an increased rate of apoptotic cell death has been shown to accompany this phenomenon (Jamali and Trott, 1996; Limoli *et al.*, 1998; Belyakov *et al.*, 1999). Persistent reproductive failure has been linked to chromosomal instability (Limoli *et al.*, 1998) and malignant transformation (Lewis *et al.*, 2001; Redpath and Gutierrez, 2001), and evidence presented to suggest that DNA is at least one of the critical targets in the initiation of this phenomenon (Limoli *et al.*, 1999).

Instability was attenuated by treating the irradiated cells with free radical scavengers or allowing potentially lethal damage to be repaired by confluent holding prior to analyzing the subsequent development of chromosomal instability (Limoli *et al.*, 2001). It has been proposed that oxidative stress perhaps consequent to enhanced, p53-independent apoptosis may contribute to the perpetuation of the instability phenotype in these populations (Limoli *et al.*, 1998; Redpath and Gutierrez, 2001).

Of importance in terms of radioprotection is whether this phenomenon occurs *in vivo* and thus may be related to the induction of cancer. The transmission of chromosomal instability *in vivo* has indeed been demonstrated in several distinct experimental models (Pampfer and Streffer, 1989; Watson *et al.*, 1996b; Ullrich and Davis, 1999), and evidence presented to suggest that instability induced in X-irradiated mouse hematopoietic stem cells may be related to the occurrence of the non-specific genetic damage found in radiation-induced leukemias in these mice (MacDonald *et al.*, 2001).

Another interesting model involves the induction of mouse mammary tumors by radiation. Sensitivity to tumor induction was found to be strain specific and to correlate with the induction of chromosomal instability

avec des particules alpha à partir d'un unique microfaisceau concentré (Kadhim *et al.*, 2001), confirmant des observations antérieures qui affirment que l'instabilité phénotypique peut être activée par des faibles doses de rayonnement, et saturée à des doses plus élevées (Kadhim *et al.*, 1995;. Grosovsky *et al.*, 1996;. Little *et al.*, 1997.). Enfin, la persistance d'un taux accru de décès cellulaire a été mis en évidence dans des populations cellulaires de nombreuses générations après irradiation (Seymour *et al.*, 1986;. Chang *et al.*, 1992; Belyakov *et al.*, 1999). Ce phénomène a été diversement interprété comme survenant à la suite de « mutations létales » ou « échec retardé de la reproduction », mais a été mesuré comme une réduction de la capacité des cellules à se fixer et à former des colonies macroscopiques dans un test de survie clonogénique* classique. Dans certains systèmes cellulaires, une augmentation du taux de mort cellulaire par apoptose a accompagné ce phénomène (Jamali *et al.*, 1996; Limoli *et al.*, 1998;. Belyakov *et al.*, 1999). Un échec persistant de la reproduction a été lié à une instabilité chromosomique (Limoli *et al.*, 1998.) et à la transformation maligne (Lewis *et al.*, 2001;. Redpath *et al.*, 2001), et des preuves pour suggérer que l'ADN est au moins une des cibles essentielle dans l'initiation de ce phénomène (Limoli *et al.*, 1999).

L'instabilité a été atténuée par le traitement des cellules irradiées par les capteurs de radicaux libres ou permettant la réparation de dommages potentiellement mortels par une prise en charge avant le développement de l'instabilité chromosomique (Limoli *et al.*, 2001). Il a été proposé que par l'intermédiaire de l'augmentation du stress oxydatif, l'apoptose p53-indépendante peut contribuer à la perpétuation de l'instabilité phénotypique dans ces populations (Limoli *et al.*, 1998;. Redpath *et al.*, 2001).

En termes de radioprotection il est important de savoir si ce phénomène se produit *in vivo* et peut donc être lié à l'induction du cancer. La transmission de l'instabilité chromosomique *in vivo* a en effet été démontrée dans plusieurs modèles expérimentaux distincts (Pampfer *et al.*, 1989; Watson *et al.*, 1996b;. Ullrich *et al.*, 1999), et la preuve présentée pour suggérer que l'instabilité induite dans les cellules souches hématopoïétiques de la souris X-irradiée peut être liée à l'apparition de dommages non spécifiques trouvés dans les leucémies radio-induites chez ces souris (MacDonald *et al.*, 2001).

Un autre modèle intéressant implique l'induction de tumeurs mammaires de souris par les rayonnements. La sensibilité à l'induction des tumeurs a été jugée spécifique de la souche et en corrélation avec l'induction de l'instabilité chromosomique dans les cellules épithéliales mammaires irradiées *in vivo* (Ullrich *et al.*, 1999). L'induction d'une

in mammary epithelial cells irradiated *in vivo* (Ullrich and Davis, 1999). The induction of such instability was dose dependent. It was subsequently shown that the sensitive, cancer-prone mouse strain (BALBk) was characterized by reduced expression of the DNA repair enzyme DNA-PKcs, leading to inefficient end rejoining of DNA double strand breaks induced by radiation (Okayasu *et al.*, 2000). This finding is of interest in relation to the recent evidence for the involvement of chromosome telomeres in radiation sensitivity and genomic instability (Bouffler *et al.*, 2001).

DNA-PKcs has been shown to play an essential role in telomere function and capping (Gilley *et al.*, 2001 ; Bailey *et al.*, 2001). A high frequency of telomere fusions occur in DNA-PKcs deficient cells (Gilley *et al.*, 2001); the loss of telomeres has been associated with the development of chromosomal instability in cancer cells (Fouladi *et al.*, 2000). Transmissible instability might thus be a consequence of successive bridge-breakage-fusion cycles resulting from telomere loss.

In sum, it appears well established that ionizing radiation can induce a type of transmissible instability in cells that enhances the probability of the occurrence of multiple genetic effects in the descendants of the surviving cells, sometimes after many generations of replication. Two questions remain to be clarified: what is the event(s) that initiates the process; and how is the signal transmitted over many generations of replication? Current studies are focused on identifying the mechanism for the phenomenon, including the role of oxidative stress, and its importance in terms of the effects of radiation *in vivo*.

telle instabilité était dose-dépendante. Il a ensuite été montré que la souche de souris (BALBk) sensible, prédisposée au cancer était caractérisée par une expression réduite de l'enzyme de réparation de l'ADN, l'ADN-PKcs finalement inefficace, rejoignant les cassures doubles de l'ADN induites par les rayonnements (Okayasu *et al.*, 2000). Cette constatation est d'intérêt en ce qui concerne les données récentes relatives à l'implication des télomères du chromosome dans la sensibilité aux rayonnements et de l'instabilité génomique (Bouffler *et al.*, 2001).

On a montré que la DNA-PKcs joue un rôle essentiel dans la fonction des télomères (Gilley *et al.*, 2001; Bailey *et al.*, 2001). Une fréquence élevée des fusions télomériques se produisent dans les cellules déficientes en ADN-PKcs (Gilley *et al.*, 2001.), la perte de télomères a été associée au développement d'une instabilité chromosomique dans les cellules cancéreuses (Fouladi *et al.*, 2000). L'instabilité transmissible pourrait donc être la conséquence de cycles pont-cassure-fusion successives résultant de la perte de télomères.

En somme, il semble bien établi que les rayonnements ionisants peuvent induire un type d'instabilité transmissible dans les cellules qui accroît la probabilité de la survenue de multiples effets génétiques dans les descendants des cellules survivantes, parfois après de nombreuses générations de réplication. Deux questions restent à éclaircir: quelle est l'événement (s) qui déclenche le processus, et quelle est la nature du signal transmis sur de nombreuses générations de réplication? Les études actuelles se concentrent sur l'identification des mécanismes de ce phénomène, notamment le rôle du stress oxydatif, et son importance en termes des effets des rayonnements *in vivo*.

* Test fondé sur la capacité d'une cellule viable isolée à se multiplier et à former une colonie d'au moins 50 cellules. Il permet d'évaluer la cytotoxicité de xénobiotiques en fonction de la capacité des cellules à s'attacher à leur support et à se diviser. Ce test est notamment la méthode de choix en recherche oncologique, car il permet de mettre en évidence des défauts apparaissant lors de la multiplication cellulaire, tels que des dommages chromosomiques ou l'apparition de mort cellulaire par apoptose.