

# Molekulare Konsequenzen von Mutationen des ATM-Gens

Marion Nicke, Ulrike Hüsing, Regina Bendix, Thilo Dörk

## Zusammenfassung

Das ATM-Gen kodiert für eine ca. 350 kDa große Proteinkinase, der eine Schlüsselfunktion bei der intrazellulären Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen zugeschrieben wird. Die zahlreichen Mutationen, die in Familien mit Louis-Bar-Syndrom nachgewiesen wurden, lassen sich grob in drei Klassen (Terminationsmutationen, Spleißmutationen und Aminosäuresubstitutionen) einteilen. Bei Terminationsmutationen entsteht ein vorzeitiges Stopcodon durch direkte Nukleotidsubstitution, Leserasterdeletion oder Leserasterinsertion. Unsere bisherigen Untersuchungen dieses häufigsten Mutationstyps weisen daraufhin, daß hier eine Instabilität der Boten-RNA bereits auf Transkriptebene die Menge des Genprodukts drastisch reduziert. Bei Spleißmutationen wird im häufigsten Fall durch Verlust eines ganzen Genabschnittes eine verkürzte Boten-RNA erstellt, die zu einer Leserasterverschiebung oder zu einem verkürzten und instabilen ATM-Protein führt. Bei Aminosäuresubstitutionen kann es zu einem instabilen oder funktionsuntüchtigen ATM-Protein kommen; Mutationen dieses Typs sind ohne funktionelle Untersuchungen schwierig zu beurteilen.

Die Kenntnis und richtige Einschätzung der molekularen Konsequenzen von Sequenzänderungen des ATM-Gens ist sowohl für die Diagnostik und Therapie des Louis-Bar-Syndroms als auch für Assoziationsstudien im Zusammenhang mit der AT-Heterozygotie eine wichtige Voraussetzung.

## Schlüsselwörter

Ataxia teleangiectatica, ATM, Transkriptinstabilität, alternatives Spleißen

## Summary

*Molecular consequences of ATM gene mutations*

*The ATM gene codes for a 350kDa protein kinase with a key role in the intracellular repair of DNA double strand breaks. Several different AT mutations have been identified which can be classified into three major groups as termination, splicing or missense mutations. Termination mutations are characterized by a premature stop codon caused by a nonsense substitution, a frameshift deletion or a frameshift insertion. Our preliminary investigations of this major mutation type indicate that nonsense-mediated decay of ATM mRNA severely reduces the amount of transcript generated from alleles harbouring termination mutations. Splicing mutations are heterogeneous but most often result in exon skipping, either leading to a frameshift or giving rise to a shortened or unstable ATM protein. Missense substitutions can also result in an unstable or dysfunctional ATM protein, but mutations of this type have to be characterized further by functional studies prior to regarding them as pathogenic substitutions. The knowledge of the molecular consequences of ATM gene mutations is of fundamental importance for the diagnosis and therapy of AT patients as well as for the current association studies concerning AT heterozygosity.*

## Keywords

*Ataxia telangiectasia, ATM, transcript instability, alternative splicing*

## Einführung

Seit einiger Zeit ist bekannt, daß Mutationen in einem einzigen Gen die vielfältigen Symptome des Louis-Bar-Syndroms auslösen können (1). Im Sommer 1995 wurde dieses Gen von einer israelischen Arbeitsgruppe um Yosef Shiloh isoliert und als ATM-Gen (für „Ataxia telangiectasia, mutated“) benannt. Das ATM-Gen kodiert für ein ungewöhnlich großes Protein mit einem Molekulargewicht von ca. 350 Kiloton. Das ATM-Protein ist in vielen Geweben im Zellkern lokalisiert und durch seine Sequenz als eine Kinase und als Mitglied einer während der Evolution konservierten Proteinfamilie von Zellzyklusregulatoren gekennzeichnet. Bisher weiß man, daß das ATM-Protein eine essentielle Funktion bei der Reparatur von DNA-Schäden hat: Es erkennt das Vorliegen von DNA-Doppelstrangbrüchen und phosphoryliert daraufhin eine Reihe von Effektorsubstraten, darunter das Tumorsuppressorprotein p53 und dessen Inhibitor mdm-2; auf diese Signale hin werden dann ein Zellzyklusarrest und die notwendigen Reparaturprozesse oder ein programmierter Zelltod eingeleitet. Wir haben in den vergangenen beiden Jahren die Rolle von Mutationen des ATM-Gens bei der Entstehung des Louis-Bar-Syndroms näher untersucht. Im Rahmen des deutschen ATM-Konsortiums, d.h. in Zusammenarbeit mit drei weiteren humangenetischen Zentren im deutschsprachigen Raum sowie mit der Arbeitsgruppe von Professor Yosef Shiloh (Tel Aviv), konnten in Deutschland bei über 80 Familien mit Louis-Bar-Syndrom mehr als 60 verschiedene Funktionsstörungen durch Direktsequenzierung genomischer DNA identifiziert werden. Ein Teil dieser Ergebnisse und die zugrundeliegende Methodik sind in einem vorhergehenden Beitrag in diesem Band dargestellt (N. Sandoval et al., S.20–21). Es kommt nun darauf an, die Mutationstypen und krankheitsauslösenden Genveränderungen sowie die mit ihnen verbundenen zellulären und phänotypischen Auswirkungen näher zu charakterisieren.

## Ergebnisse

In Deutschland gibt es keine häufige Einzelmutation des ATM-Gens, so daß bei den meisten Patienten die gesamt-

Tab 1

## Verteilung und Konsequenzen verschiedener Mutationstypen des ATM-Gens

	<b>Terminationsmutationen</b> (Stopmutationen, Leserasterdeletionen und -insertionen)	<b>Spleißmutationen</b>	<b>Aminosäuresubstitutionen</b>
<b>Häufigkeit bei AT</b>	ca. 60%	ca. 24%	ca. 16%
<b>Funktionelle Konsequenzen</b>	instabiles Transkript, instabiles Protein	Exonverlust oder Einschub von Sequenzen, instabiles Protein	Proteinfehlfunktion, instabiles Protein

## Abbildung nur in Druck- version

### Abb 1 Transkriptreduktion als Folge einer Leserasterdeletion des ATM-Gens

Die abgebildete DNA-Sequenz einer obligaten Mutationsträgerin zeigt Heterozygotie für die häufige Stopmutation E1978X in Exon 42 des ATM-Gens (Codon GAA→TAA, oben). Dagegen erscheint das Allel mit der Stopmutation auf Transkriptebene deutlich verringert im Vergleich zum Wildtyp-Allel (cDNA-Sequenz, unten).

te kodierende Genregion (62 Exons) untersucht werden muß. Es stellte sich jedoch heraus, daß es einen besonders häufigen Mutationstyp gibt (Tab 1): Die meisten aller bisher identifizierten Mutationen führen zu vorzeitigem Stopcodons und verhindern dadurch die Synthese eines vollständigen Proteins („Terminationsmutationen“). Im Western-Blot war bei Zellen von Patienten, die zwei Stop- oder Leserastermutationen tragen, überhaupt kein ATM-Protein mehr nachweisbar. Wir konnten in mehreren Fällen zeigen, daß die Expressionsstörung bereits auf der Ebene der ATM-mRNA besteht, denn in lymphoblastoiden Zelllinien einiger Patienten ist selektiv das Allel mit vorzeitigem Stopcodon im reifen Transkript nicht mehr nachweisbar. Dies fällt insbesondere dann auf, wenn Personen nur auf einem Chromosom eine Terminationsmutation tragen: In der reifen mRNA wird durch Sequenzierung dann vorrangig die Wildtypsequenz nachgewiesen (Abb 1). Weitere Experimente müssen nun zeigen, ob es sich hierbei um einen generellen Pathogenesemechanismus handelt und

wie diesem bei Therapieansätzen begegnet werden könnte.

Etwa jede vierte Mutation in Familien mit Louis-Bar-Syndrom wirkt nicht oder nicht nur auf die Menge, sondern vor allem auf die Zusammensetzung des reifen ATM-Transkripts („Spleißmutationen“). Bei gesunden Probanden fanden wir nur in geringer Menge alternative Spleißprodukte, die keine vollständige Funktion mehr vermitteln können. Beim Louis-Bar-Syndrom können dagegen aberrante Transkripte, die normalerweise nur zu etwa 5% vorhanden sind, durch eine Einzelbasensubstitution in den Spleißstellen des ATM-Gens zu über 90% gebildet werden. So fanden wir beispielsweise, daß das Exon 11 des ATM-Gens bei fast allen untersuchten Geweben und Zelllinien in einem untergeordneten Anteil zwischen 2–15% der mRNA-Moleküle nicht vorhanden ist. Bei einem homozygoten Patienten mit Louis-Bar-Syndrom wiesen jedoch etwa 93% der Transkripte kein Exon 11 auf, als Folge der in Deutschland sehr häufigen AT-Mutation 1066-6T→G im Polypy-

rimidintrakt des Introns 10 (Abb 2). An weiteren Zelllinien homozygoter Patienten mit Spleißmutationen versuchen wir derzeit herauszufinden, wie groß der Restanteil vollständiger ATM-Boten-RNA sein muß, um die Erkrankung zu mildern oder sogar zu vermeiden.

In relativ seltenen Fällen wird das Louis-Bar-Syndrom durch Aminosäuresubstitutionen („Missense-Mutationen“) hervorgerufen, von denen insbesondere die konservierte Kinase-region des ATM-Proteins betroffen zu sein scheint. Auch bei Patienten mit Aminosäureänderungen war im Western-Blot das ATM-Protein in den meisten Fällen nur in geringer Menge nachweisbar, vermutlich aufgrund einer Instabilität des veränderten Proteins. Einige Fallbeispiele sind in einer kürzlich veröffentlichten Studie des deutschen ATM-Konsortiums abgebildet (2). Der Beweis dafür, daß eine Aminosäuresubstitution tatsächlich die krankheitsverursachende Mutation darstellt, ist im Hinblick auf die Vielzahl seltener Proteinvarianten recht schwierig und muß für jeden Einzelfall

a) **Homozygotie für die Spleißmutation 1066-6T→G**



b) **Alternatives Spleißen von Exon 11**



a) Mutation: ...gatttattttattgtacag/GTT...  
 b) Normalsequenz: ...gatttattttatttacag/GTT...

**Abb 2**  
**Lokalisation und funktioneller Effekt der Spleißmutation 1066-6T→G im Intron 10 des ATM-Gens**

Quantitative RT-PCR-Analysen weisen differenziell gespleißte Anteile der ATM-mRNA mit oder ohne das Exon 11 nach. Bei Homozygotie für die Mutation 1066-6T→G fehlt das Exon 11 in ca. 93% der Transkripte (a), wogegen im Normalfall nur etwa 12% der Transkripte diese verkürzte alternative Spleißform aufweisen (b).

durch aufwendige Expressions- und Funktionsstudien in Zellkultur geführt werden. Es ist vorhersehbar, daß solche ergänzenden Analysen zukünftig einen wichtigen Beitrag in der Diagnostik des Louis-Bar-Syndroms leisten werden.

**Ausblick**

Molekulargenetische Untersuchungen des ATM-Gens sind weit über das seltene Louis-Bar-Syndrom hinaus von Bedeutung. Aufgrund der Schlüssel-funktion des ATM-Proteins bei der Erkennung und Reparatur von Chromosomenschäden wird ihm eine Rolle als „caretaker“ im Zellkern beigemessen, dessen Funktionsstörung zur Entstehung von Tumoren prädisponiert. Bei Leukämien, insbesondere des Typs T-PLL und B-CLL, wurden von verschiedenen Forschergruppen bereits gehäuft ATM-Genmutationen nachgewiesen. In diesen Fällen, die in einem anderen Beitrag dieses Bandes ausführlicher diskutiert werden (Schaffner et al., S. 25–27), kann spontan auch das gesamte ATM-Gen auf dem Chromosom 11 deletiert werden. Epidemiologische Studien in Familien mit Louis-Bar-Syndrom haben ferner Anhaltspunkte für ein etwa fünffach erhöhtes Brustkrebsrisiko unter Blutsverwandten von AT-Patienten ergeben (3). In einer Pilotstudie untersuchen wir daher derzeit, ob sich unter Patientinnen mit sporadischem Mammakarzinom eine gegenüber dem Bevölkerungsdurchschnitt erhöhte Zahl an Mutationen des ATM-Gens finden läßt. Diese im Laufe dieses Hefts noch ausführlicher darge-

stellte Studie (Bremer et al., S. 57–59; Bendix et al., S. 64–66) wird Aufschluß darüber geben, in welchem Ausmaß das ATM-Gen auch an der Ätiologie und Pathogenese des Mammakarzinoms beteiligt ist. Die Kenntnis und richtige Einschätzung der molekularen Konsequenzen von Sequenzänderungen des ATM-Gens ist auch für solche Fragestellungen eine wichtige Voraussetzung.

**Danksagung**

Wir danken sehr herzlich den von Louis-Bar-Syndrom betroffenen Familien für ihre Mitarbeit und Kooperationsbereitschaft. Stellvertretend für zahlreiche Kolleginnen und Kollegen aus den betreuenden klinischen Zentren danken wir für ihre Mitwirkung und Bereitstellung von Blutproben ihrer Patienten: Dr. I. Bühring und Prof. Dr. S. Zielen (Frankfurt/Bonn), Dr. M. Rossa und Prof. Dr. F. Aksu (Datteln), Prof. Dr. H.J. Christen (Göttingen/Hannover), PD Dr. J. Freiherst (Hannover), Dr. M. Schmitt (Berlin), Prof. Dr. H.-G. Lenard und Prof. Dr. G. Groß-Selbeck (Düsseldorf), PD Dr. O. Riess (Bochum), Dr. H. Rickes (Osnabrück), Dr. R. Armbrust (Meschede), Dr. M. Guitart (Sabadell) und Prof. Dr. A. Schinzel (Zürich). Den Mitgliedern des deutschen ATM-Konsortiums und den Institutsleitern Herrn Prof. Dr. J. Schmidtke und Herrn Prof. Dr. J.-H. Karstens gilt unser besonderer Dank für Mitarbeit und Unterstützung.

**Literatur**

1. Rotman, G, Shiloh, Y (1998) ATM: from gene to function. *Hum Mol Genet* 7:1555-1563.
2. Sandoval N, Platzer M, Rosenthal A, Dörk T, Bendix R, Skawran B, Stuhmann M, Wegner R-D, Sperling K, Banin S, Shiloh Y, Baumer A, Bernthaler U, Sennfelder H, Brohm M, Weber BHF, Schindler D (1999) Characterization of ATM gene mutations in 66 ataxia-telangiectasia families. *Hum Mol Genet* 8:69-79.
3. Swift, M, Morrell, D, Massey, RB, Chase, CL (1991) Incidence of cancer in 161 families affected by ataxia-telangiectasia. *New Eng J of Med* 325:1831-1836.