

Mutationen des ATM-Gens bei lymphoproliferativen Erkrankungen

Claudia Schaffner, Stephan Stilgenbauer, Hartmut Döhner, Peter Lichter

Zusammenfassung

Konstitutionelle Inaktivierung des ATM-Gens prädisponiert AT-Patienten und Atm-defiziente Mäuse zur Entwicklung von Tumoren, insbesondere von Neoplasien des lymphatischen Systems. Es wurde postuliert, daß ATM auch an der Tumorigenese von sporadischen Tumoren beteiligt sein kann. Wir analysierten eine Serie von T-prolymphozytischen Leukämien (T-PLL) in Nicht-AT-Patienten im Hinblick auf genomische Veränderungen, die mit dieser Erkrankung assoziiert sind. Als eine der häufigsten Aberrationen war die Deletion des langen Arms von Chromosom 11 mit der Konsensus-Deletionsregion 11q22.3-q23.1 zu beobachten. Da dieses kritische Segment das ATM-Gen enthält, wurden Mutationsanalysen des nichtdeletierten Allels in sieben Fällen mit monoallelischen ATM-Deletionen durchgeführt. In allen sieben Fällen wurden Punktmutationen oder intragenische Deletionen gefunden, die zum Verlust des ATM-Transkriptes, zur Veränderung des Proteins oder zu vorzeitigem Translationsabbruch führen. Die somatische Inaktivierung von beiden Allelen entspricht dem „Two-hit“-Modell der Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen, was darauf hindeutet, daß ATM in Tumoren von Nicht-AT-Patienten als Tumorsuppressorgen fungiert. Dieses Konzept wird durch Mutationsanalysen des ATM-Gens in B-Zell-chronisch-lymphatischer Leukämie (B-CLL) gestützt: Erste Ergebnisse dieser Studie deuten eine pathogene Rolle von ATM auch für eine kleine Gruppe von B-CLLs an.

Schlüsselwörter

ATM, Tumorsuppressorgen, T-prolymphozytische Leukämie, B-Zell-chronisch-lymphatische Leukämie

Summary

Mutations of the ATM gene in lymphoproliferative diseases

Constitutional inactivation of the ATM gene predisposes AT patients and Atm-deficient mice to develop malignancies, in particular neoplasms of the lymphoid system. It was postulated that ATM could also be implicated in the tumorigenesis of sporadic tumors. We analyzed a series of T-prolymphocytic leukemia (T-PLL) in non-AT individuals in search of genomic changes that are associated with the development of this disease. Deletion of the long arm of chromosome 11 was identified as recurrent aberration with a consensus deletion region at 11q22.3-q23. Since this critical segment contained ATM, we searched for mutations in the non-deleted allele of the gene in seven cases with monoallelic ATM deletions. In all cases analyzed, point mutations or intragenic deletions were found in the remaining allele resulting in absence of ATM transcript, alteration or truncation of the protein. The somatic inactivation of both alleles is in line with the two-hit model of tumor suppressor gene inactivation, indicating that ATM functions as a tumor suppressor gene in tumors of non-AT individuals. This concept is supported by mutation analysis of ATM in B-cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL): The results of this ongoing study suggest a pathogenic role of ATM also for a small group of B-CLLs.

Keywords

ATM, tumor suppressor gene, T-prolymphocytic leukemia, B-cell chronic lymphocytic leukemia

Die mit Ataxia teleangiectatica (AT) assoziierte Prädisposition zur Entwicklung von Tumoren äußert sich insbesondere in einer hohen Inzidenz von lymphoproliferativen Erkrankungen: AT-Patienten haben ein im Vergleich zur Normalbevölkerung ca. 70fach erhöhtes Risiko, an Leukämie zu erkranken (1). Auch für heterozygote Träger von ATM-Mutationen wurde ein erhöhtes Krebsrisiko, insbesondere für Brustkrebs, postuliert (2). Inzwischen durchgeführte Studien an Brustkrebspatienten konnten allerdings bis jetzt keine erhöhten Mutationsraten im ATM-Gen nachweisen (3–6), so daß die Bedeutung von ATM für die Tumorigenese von Brustkrebs nach wie vor unklar ist. Da die chromosomale Region 11q22-q23, in der das ATM-Gen lokalisiert ist, in verschiedenen Tumoren häufig von Deletionen betroffen ist (7), wird ATM als Kandidat für ein Tumorsuppressorgen mit Bedeutung für verschiedene sporadische Tumoren angesehen. Vor kurzem konnten wir und andere erstmals einen Zusammenhang zwischen der Inaktivierung des ATM-Gens und der Entwicklung eines sporadischen Tumors zeigen: In unabhängigen Studien wurden ATM-Mutationen in malignen Zellen von T-PLL nachgewiesen (8–11), einer aggressiven T-Zell-Leukämie, die auch häufig bei AT-Patienten beobachtet wird.

In der von uns durchgeführten Studie untersuchten wir eine Serie von T-PLLs in Nicht-AT-Patienten auf genomische Veränderungen, die eine pathogene Rolle bei der Entwicklung dieser Erkrankung spielen. Zytogenetische Bänderungsanalysen von zehn T-PLLs ergaben komplexe chromosomale Veränderungen, insbesondere der Chromosomen (6, 8, 11, 14). Als häufigste Aberration (in sieben von zehn Fällen) wurde ein Verlust von chromosomalem Material vom langen Arm des Chromosoms (11) beobachtet, wobei die Region 11q21-q23 in allen Fällen deletiert war. Zur näheren Charakterisierung des deletierten Bereiches wurden im Anschluß Fluoreszenz in situ Hybridisierungen (FISH) an Interphasezellkernen durchgeführt, wozu (18) verschiedene Proben eines YAC-Contigs der chromosomalen Region 11q14.3-q23.3 verwendet wurden. Von 24 auf diese Weise unter-

FOTO nur in Druckversion

Abb 1

Kartierung von Deletionen und Translokationen in der chromosomalen Region 11q14.3-q23.3 in 24 T-PLLs unter Verwendung von Interphase-FISH mit YAC-Proben

Ein Ideogramm des Chromosoms 11, die Bandenbezeichnung, die verwendeten YAC-Clone und ihre entsprechenden DNA-Loci sowie jeweils enthaltene Gene sind angegeben.

- del Deletion (ein FISH-Signal);
- p-d partielle Deletion (ein FISH-Signal normaler Stärke und ein zweites, sehr schwaches Signal);
- di Disomie (zwei FISH-Signale);
- 3 drei FISH-Signale (Translokation in T-PLL 1 und Trisomie in T-PLL 24).

Tab 1

Mutationen im nichtdeletierten Allel des ATM-Gens in T-PLLs mit monoallelischen Deletionen

T-PLL-Nr.	Änderung der Nukleotidsequenz*	Genprodukt
1	Deletion der 5'-Exons	kein ATM-Transkript
21	3873 del 120 (Exon 28)	Del Val 1292-Gln 1331
11	5309 C>G (Exon 37)	Ser 1770 ter
2	8237 del 15 (Exon 58)	Arg 2746 Ser, Del Lys 2747-Thr 2751
13	8174 A>G (Exon 58)	Asp 2725 Gly
15	9016 G>C (Exon 65)	Ala 3006 Pro
3	9022 C>T (Exon 65)	Arg 3008 Cys

* Die Position der Nukleotide ist entsprechend der publizierten Sequenz des ATM-Transkripts (GenBank-Accession-Nr. U33841) angegeben.

suchten T-PLLs wiesen 13 Fälle (T-PLLs 1–13) monoallelische 11q-Deletionen auf. Die in diesen T-PLLs gemeinsam deletierte Region konnte auf ein 1 Mbp großes Segment im Bereich 11q22.3-q23.1 eingegrenzt werden (Abb 1). Da diese kritische Region das ATM-Gen enthält, wurde dieses Gen unter Verwendung von Cosmiden (mit genomischen ATM-Sequenzen) direkt mit FISH auf Deletionen untersucht. Auf diese Weise konnten noch in zwei weiteren Fällen (T-PLLs 15, 21) monoallelische Deletionen im ATM-Genlokus identifiziert werden.

Mutationsanalysen des nichtdeletierten ATM-Allels in sieben T-PLLs mit monoallelischen Deletionen sollten Aufschluß darüber geben, ob in diesen Fällen beide Allele des ATM-Gens in den Tumorzellen inaktiviert sind. Die Mutationsanalysen konzentrierten sich weitgehend auf die 9,2 kb große kodierende Region des ATM-Transkripts, die in Form von acht überlappen-

den RT-PCR-Produkten amplifiziert wurde. Diese RT-PCR-Fragmente wurden mit verschiedenen Restriktionsenzymen verdaut und anschließend einer SSCP-Analyse unterzogen. Darüberhinaus wurden die Promotorregion und definierte genomische Bereiche des Gens (Exons 1a-3, 29-30, 56-57) mit PCR analysiert. In den Tumorzellen von T-PLL1 war kein ATM-Transkript nachweisbar. Dies wird offensichtlich durch eine biallelische Deletion des 5'-Bereiches des Gens und eine Translokation verursacht (Tab 1). In einem weiteren Fall führte eine 120 bp-Deletion zum Verlust von 40 Aminosäuren in der Nähe der c-Abl-Bindungsdomäne (Tab 1). Mutationen in den anderen fünf T-PLLs betrafen direkt die funktionell wichtige Phosphatidylinositol-3-Kinase-Domäne (Tab 1): eine Nonsense-Mutation resultierte im Verlust der gesamten Kinase-Domäne (T-PLL11), eine 15 bp-Deletion bewirkte die Substitution von einer sowie die Deletion

von fünf Aminosäuren der Domäne (T-PLL2), und drei Missense-Mutationen führten zum Austausch konservierter Aminosäuren (T-PLL3, 13, 15). Da von dieser Patientengruppe keine nicht-malignen Zellen zur Verfügung standen, konnte der Keimbahnstatus nicht bestimmt werden. Deshalb war es im Rahmen dieser Studie noch nicht möglich, die Frage nach einer von ATM ausgehenden genetischen Prädisposition für T-PLL zu beantworten.

Die nachgewiesene biallelische Inaktivierung des ATM-Gens in T-PLL-Zellen entspricht dem klassischen Schema der Tumorsuppressorgen-Inaktivierung: Deletion eines Allels und Punktmutation im zweiten. Diese Daten deuten darauf hin, daß das ATM-Gen eine Rolle als Tumorsuppressorgen in dieser aggressiven T-Zell-Leukämie spielt.

Gegenwärtig untersuchen wir eine mögliche Assoziation des ATM-Gens

FOTO nur in Druckversion

Abb 2

FISH-Kartierung von Deletionen und Translokationen in der chromosomalen Region 11q14.3-q23.3 in 56 B-CLLs und drei Mantelzell-Lymphomen (Tumor-Nr. 2, 3 und 23)

Die chromosomalen Banden, die verwendeten YAC-Clone und ihre entsprechenden DNA-Loci sowie jeweils enthaltene Gene sind angegeben. Die Ausdehnungen der Deletionen sind hellgrau, Translokationsbruchpunkte dunkelgrau eingezeichnet.

mit der Tumorigenese von B-CLL. FISH-Analysen einer großen Serie von mehr als 200 B-CLLs hatten gezeigt, daß Deletionen der chromosomalen Region 11q22-q23 als zweithäufigste chromosomale Aberration in dieser B-Zell-Leukämie auftraten¹². Unter Verwendung des o.g. YAC-Contigs konnte eine 2-3 Mbp große minimal deletierte Region im Bereich 11q22.3-q23.1 definiert werden, die u.a. wiederum das ATM-Gen enthält (Abb 2) (12). Der Verlust dieser chromosomalen Region charakterisiert eine B-CLL-Untergruppe, die durch einen aggressiven Krankheitsverlauf mit deutlich kürzeren Überlebenszeiten sowie eine extensive Lymphknotenbeeinflussung gekennzeichnet ist (13). Auf der Suche nach dem Tumorsuppressorgen in dieser kritischen Region führen wir derzeit Mutationsanalysen von ATM in B-CLL durch. Erste Ergebnisse deuten an, daß ATM-Mutationen auch in Tumorzellen von B-CLLs zu beobachten sind, was auf eine pathogene Rolle des Gens für eine kleine Gruppe von B-CLLs hinweist.

Literatur

1. Morrell D, Cromartie E, Swift M (1986) Mortality and cancer incidence in 263 patients with ataxia telangiectasia. *J Natl Cancer Inst* 77: 89-92
2. Athma P, Rappaport R, Swift M (1996) Molecular genotyping shows that ataxia-telangiectasia heterozygotes are predisposed to breast cancer. *Cancer Genet Cytogenet* 92: 130-134
3. Vorechovsky I, Rasio D, Luo L, Monaco C, Hammarström L, Webster ADB, Zaloudik J, Barbanti-Brodano G, James M, Russo G, Croce CM, Negrini M (1996) The ATM gene and susceptibility to breast cancer: Combined mutation analysis of 38 consecutive breast tumors reveals no evidence for somatic mutations and constitutional AT heterozygosity. *Cancer Res* 56: 2726-2732

4. FitzGerald MG, Bean JM, Hegde SR, Unsal H, MacDonald DJ, Harkin DP, Finkelstein DM, Isselbacher KJ, Haber DA (1997) Heterozygous ATM mutations do not contribute to early onset of breast cancer. *Nature Genet* 15: 307-310

5. Bay JO, Grancho M, Pernin D, Presneau N, Rio P, Tchirkov A, Uhrhammer N, Verrelle P, Gatti RA, Bignon YJ (1998) No evidence for constitutional ATM mutation in breast/gastric cancer families. *Int J Oncol* 12: 1385-1390

6. Chen J, Birkholtz GG, Lindblom P, Rubio C, Lindblom A (1998) The role of ataxia-telangiectasia heterozygotes in familial breast cancer. *Cancer Res* 58: 1376-1379

7. Kerangueven F, Eisinger F, Noguchi T, Allione F, Wargniez V, Eng C, Padberg G, Theillet C, Jacquemier J, Longy M, Sobol H, Birnbaum D (1997) Loss of heterozygosity in human breast carcinomas in the ataxia telangiectasia, Cowden disease and BRCA1 gene regions. *Oncogene* 14: 339-347

8. Stilgenbauer S, Schaffner C, Litterst A, Liebisch P, Gilad S, Bar-Shira A, James MR, Lichter P, Döhner H (1997) Biallelic mutations in the ATM gene in T-prolymphocytic leukemia. *Nature Med* 3: 1155-1159

9. Vorechovsky I, Luo L, Dyer MJS, Catovsky D, Amlot PL, Yaxley JC, Foroni L, Hammarström L, Webster ADB, Yuille MAR (1997) Clustering of missense mutations in the ataxia-telangiectasia gene in a sporadic T-cell leukemia. *Nature Genet* 17: 96-99

10. Stoppa-Lyonnet D, Soulier J, Lauge A, Dastot H, Garand R, Sigaux F, Stern M-H (1998) Inactivation of the ATM gene in T-cell prolymphocytic leukemias. *Blood* 91: 3920-3926

11. Yuille MAR, Coignet LJA, Abraham SM, Yaqub F, Luo L, Matutes E, Brito-Babapulle, Vorechovsky I, Dyer MJS, Catovsky D (1998) ATM is usually rearranged in T-cell prolymphocytic leukemia. *Oncogene* 16: 789-796

12. Stilgenbauer S, Liebisch P, James MR, Schröder M, Schlegelberger B, Fischer K, Bentz M, Lichter P, Döhner H (1996) Molecular cytogenetic delineation of a novel critical genomic region in chromosome bands 11q22.3-q23.1 in lymphoproliferative disorders. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 11837-11841

13. Döhner H, Stilgenbauer S, James MR, Bentz M, Weillguni T, Bentz M, Fischer K, Hunstein W, Lichter P (1997) 11q deletions identify a new subset of B-cell chronic lymphocytic leukemia characterized by extensive nodal involvement and inferior prognosis. *Blood* 89: 2516-2522