

Sequenzanalyse des ATM-Gens bei Patienten mit AT

Natalia Sandoval, Matthias Platzer, André Rosenthal, Thilo Dörk, Regina Bendix, Britta Skawran, Manfred Stuhmann, Rolf-Dieter Wegner, Karl Sperling, Sharon Banin, Yosef Shiloh, Alessandra Baumer, Ulrike Bernthaler, Helga Sennefelder, Monika Brohm, Bernhard HF Weber, Detlev Schindler*

Zusammenfassung

Das ATM-Gen ist als das für Louis-Bar-Syndrom ursächliche Gen lokalisiert und identifiziert worden. Ziel unserer Studie war die Charakterisierung der Mutationen des ATM-Gens bei den in Deutschland lebenden AT Familien. Hierzu führten wir die genomische Sequenzierung aller 66 Exons dieses Gens bei Proben von 66 Patienten mit Louis-Bar-Syndrom durch. Wir identifizierten 46 verschiedene Mutationen, die über das gesamte Gen verteilt sind. Nur 12 Mutationen sind bereits aus anderen Bevölkerungen bekannt, 34 wurden im Laufe unserer Studie erstmals beobachtet. Keine der Mutationen kam in mehr als vier AT Familien vor. Mit unserer Methodik gelang es, etwa 57% der AT Chromosomen aufzuklären. Unsere Ergebnisse belegen eine hohe Vielfalt und Heterogenität von ATM-Genveränderungen in Deutschland.

Schlüsselwörter

ATM, Mutationen, genomische Sequenzierung

Summary

Sequence analysis of the ATM gene in AT patients

The ATM gene has been localized and identified as the gene causative for ataxia telangiectasia (AT). The goal of our study was to characterize the ATM gene mutations in AT families living in Germany. We applied genomic sequencing of all 66 exons of the ATM gene to samples from 66 AT patients. We identified 46 different AT mutations distributed evenly throughout the gene. While 12 mutations have been reported before in other populations, 34 were described in our study for the first time. None of the mutations occurred in more than four AT families. Approximately 57% of all AT alleles could be detected during the course of our study. Our results indicate a high variety and heterogeneity of ATM gene variations in German families.

Keywords

ATM, mutations, genomic sequencing

Einleitung

Im Sommer 1995 wurde das für Louis-Bar-Syndrom ursächliche Gen von einer israelischen Arbeitsgruppe um Yosef Shiloh isoliert und als ATM-Gen (für „Ataxia telangiectasia, mutated“) benannt. Seit kurzem ist die gesamte genomische Sequenz des ATM-Gens bekannt, so daß die DNA-Analyse bei AT Patienten prinzipiell möglich geworden ist. Ziel der hier vorgestellten Studie war die Charakterisierung von Mutationen des ATM-Gens bei 66 AT Patienten aus Deutschland. Hierzu schlossen sich fünf humangenetische Zentren zu einem Forschungsvorhaben im Rahmen des „Deutschen ATM Konsortiums“ zusammen. Die Ergebnisse sind sowohl von Bedeutung für die Diagnostik von Patienten und Genträgern als auch für das weitere Verständnis der ATM-Fehlfunktion bei AT und anderen Erkrankungen.

Patienten und Methoden

Blutproben von Patienten mit Louis-Bar-Syndrom und ihren Familienmitgliedern wurden mit deren informierendem Einverständnis entweder in der Beratungsstelle eines der humangenetischen Zentren asserviert oder waren von den behandelnden Ärzten zur Molekularanalyse eingeschickt worden. Die Diagnose „AT“ war zuvor auf der Grundlage typischer klinischer Symptome (Ataxie, Teleangiectasien, erhöhter AFP-Wert, verändertes Immunglobulinprofil) erhoben und durch Laboranalysen der zellulären Radiosensibilität bestätigt worden. Nachdem die genomische DNA aus den Leukozyten der Patienten extrahiert worden war, wurden in separaten Reaktionsansätzen alle 66 Exons des ATM-Gens mittels der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) vervielfältigt. Die PCR-Produkte wurden am Institut für Molekulare Biotechnologie in Jena mittels fluoreszenzgestützter automatischer Direktsequenzierung an ABI377-Sequenzierautomaten analysiert, die Daten wurden mit Hilfe des XGAP Programms im Vergleich zu Kontrollsequenzen ausgewertet (Abb 1).

Ergebnisse

Für jede der 66 analysierten Patientenproben erhielten wir Sequenzinformationen über etwa 25.000 Nukleotide, von denen etwa 11.000 intron-

ständig waren. Wir identifizierten 46 verschiedene Mutationen, die über das gesamte Gen recht gleichmäßig verteilt waren (Abb 2). Zwölf Mutationen waren bereits aus anderen Bevölkerungen bekannt, doch 34 verschiedene Mutationen wurden von uns erstmals im Rahmen dieses Projekts gefunden. Keine der Mutationen in unserer Untersuchungsgruppe kam in mehr als vier Familien mit Louis-Bar-Syndrom vor, so daß in Deutschland keine häufige Einzelmutation des ATM-Gens gefunden werden konnte. Der vollständige ATM-Mutationsgenotyp konnte bei 24 Patienten aufgeklärt werden. Hiervon waren 17 Patienten homozygot und 7 gemischt heterozygot für AT Mutationen. Bei weiteren 26 Patienten wurde nur eine Mutation identifiziert, und bei 16 Patienten konnte mit unserer Methodik keine AT Mutation entdeckt werden.

Diskussion

Unsere automatisierte Sequenzierung des ATM-Gens sollte im Rahmen dieser Pilotstudie einen Überblick über das Mutationsspektrum der AT Mutationen in Deutschland erbringen. Mit den von uns etablierten Versuchsbedingungen ist prinzipiell die Untersuchung jedes einzelnen Nukleotidbausteins der gesamten kodierenden Region dieses Gens aus Blut oder DNA-Proben möglich. Es stellte sich heraus, daß es innerhalb des untersuchten Patientenkollektivs weder eine häufige Einzelmutation noch einen „Mutationsbrennpunkt“ im ATM-Gen gab. Stattdessen identifizierten wir 46 verschiedene, zum größten Teil bisher unbekannte Mutationen, die über das gesamte Gen verteilt waren. Dies spricht für eine ausgeprägte allelische Heterogenität von AT Mutationen in der deutschen Bevölkerung, die – zusammen mit der Größe des ATM-Gens – eine schnelle genetische Diagnostik des Louis-Bar-Syndroms außerordentlich erschwert. Darüber hinaus konnten in unserer Studie Mutationen nur auf 75 der 132 AT Chromosomen nachgewiesen werden, entsprechend einer Detektionsrate von 57%. Obwohl die von uns gewählte Methodik der automatischen Sequenzierung als höchst sensitiv und zuverlässig gilt, könnten technische Schwierigkeiten bei der Detektion he-

Abbildung nur in Druckversion

Abb 1
Ausschnitt des X-GAP Editors mit ausgewählten Spuren eines AT-Subprojektes mit 18 Patienten



Abb 2
Verteilung der Mutationen über das ATM-Gen in einem Kollektiv von 66 AT-Patienten
Die verschiedenen Mutationstypen sind durch unterschiedliche Symbole gekennzeichnet.

terozygoter Patienten zu der unerwartet niedrigen Detektionsrate beigetragen haben. Ferner können Mutationen außerhalb der untersuchten Genregionen, beispielsweise in intronständigen Bereichen oder in der Promotorregion, ebenso wie große genomische Deletionen oder Inversionen mit unserer PCR-gestützten Sequenzieranalyse bisher nicht erkannt werden. Weitere Untersuchungen sind daher geboten, um die Mutationsdetektion zu erhöhen.

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), Prof. Dr. H.J. Christen (Göttingen/Hannover), PD Dr. J. Freiherst (Hannover), PD Dr. O. Riess (Bochum), Dr. H. Rickers (Osnabrück), Dr. R. Armbrust (Meschede), Dr. Eva Seemanova und Prof. Dr. A. Schinzel (Zürich). Herrn Prof. Dr. Günter Maaß, Herrn Prof. Dr. Jörg Schmidtke und Herrn Prof. Dr. Johann H. Karstens gilt unser besonderer Dank für ihre Unterstützung.

Literatur

Sandoval N, Platzer M, Rosenthal A et al. (1999) Characterization of ATM gene mutations in 66 ataxia-telangiectasia families Human Molecular Genetics 8:69-79.

Anmerkung

* Deutsches ATM Konsortium