

Pleiotrope Funktionen von ATM und homologen Hefeproteinen

Eberhard Fritz, Anna A. Friedl, M. Stephen Meyn, Friederike Eckardt-Schupp

Zusammenfassung

Homozygotie für Mutationen im AT Gen äussert sich in pleiotropen klinischen und zellulären Defizienzen der betroffenen Patienten und homologer Mausmodelle. Wir transfizierten und exprimierten das TEL1-Gen aus *S. cerevisiae*, welches innerhalb der Familie homologer PI-3-Kinasen die größte strukturelle Homologie zu ATM aufweist, stabil in menschlichen AT-Zellen. Phänotypische Analysen zeigten, daß das Tel1-Protein die fehlende ATM-Funktion teilweise kompensieren kann. Tel1p unterdrückte in AT-Zellen die Hyperrekombination, die Strahlensensitivität, wie auch die Telomerverkürzung. Die funktionelle Charakterisierung von Tel1p erlaubte daher, strukturelle Homologien zwischen ATM und Tel1p mit gemeinsamen Funktionen der beiden homologen Proteine zu vergleichen.

Schlüsselwörter

ATM, TEL1, Telomere, Rekombination

Summary

Pleiotropic functions of ATM and homologous proteins from yeast

*AT patients and mouse models carrying homozygous mutations in the ATM gene are characterized by pleiotropic clinical and cellular deficiencies. The closest known structural homologs to ATM are TEL1 and MEC1 from *S. cerevisiae*, which impose pleiotropic defects similar to AT when mutated in yeast cells. We stably transfected and expressed the yeast TEL1 gene in human A-T fibroblasts. Cross complementation analyses revealed that the Tel1 protein was able to partly compensate for ATM by suppressing spontaneous recombination rates, radiosensitivity and telomere shortening. Thus, functional characterization of the Tel1 protein from yeast in AT cells allowed us to compare structural homologies between Tel1p and the ATM protein with functional aspects shared between the two highly related PI-3-kinases.*

Keywords

Ataxia telangiectasia, TEL1, telomeres, recombination

Ataxia teleangiectatica (AT) ist gekennzeichnet durch eine Vielfalt unterschiedlicher klinischer Phänotypen, denen ein ebenso pleiotroper zellulärer Phänotyp entspricht (1). Diese Tatsache sowie die Identifikation des ATM-Proteins als Lipid- und/oder Proteinkinase (2) lassen darauf schließen, daß ATM ein multifunktionelles Protein darstellt und als zentraler Bestandteil komplexer Signalketten verschiedene zellbiologische Endpunkte beeinflussen kann (3). Das ATM-Protein ist u.a. beteiligt an der p53-abhängigen Zellzyklusregulation nach Bestrahlung, an der Signaltransduktion, an der Regulation der Telomerlängen sowie an der DNA-Rekombination in somatischen und meiotischen Zellen. Verschiedene Funktionen von ATM könnten durch verschiedene funktionelle Domänen des sehr großen ATM-Proteins (ca. 350 kDa) kodiert sein. In diesem Zusammenhang konnte am extremen Carboxyterminus des ATM-Proteins eine strukturell definierte Lipidkinase-Domäne (Phosphatidylinositol (PI)-3-Kinase) erkannt werden, und im mittleren Teil des Proteins ein Leucin-Zipper, der die Beteiligung des ATM-Proteins an einem funktionellen Multiprotein-Komplex erlauben würde (Abb 1).

Als Substrat für ATM-Kinaseaktivität konnte unter anderem das p53-Protein beschrieben werden, welches direkt durch ATM phosphoryliert und aktiviert wird, worauf es selbst weitere Zielproteine regulieren kann (4, 5). Obwohl das ATM-Protein hauptsächlich im Zellkern vorkommt, konnten kleinere Mengen auch in zytoplasmatischen Vesikeln nachgewiesen werden (6), wo es eventuell Funktionen ausübt, die sich von denen im Zellkern unterscheiden.

Basierend auf der Proteinsequenz von ATM wurden strukturell homologe Proteine aus anderen eukaryotischen Spezies erkannt, die hauptsächlich in der terminalen PI-3-Kinase-Domäne eine sehr starke Homologie zeigen und deren Funktion in DNA-Reparaturprozessen und/oder der Zellzyklusregulation liegt (7). Hierzu gehören insbesondere Tel1p und Mec1p aus *S. cerevisiae* (8, 9), die aufgrund des zellulären Phänotyps entsprechender Hefe-Mutanten auch eine funktionelle Homologie zum ATM-Protein auf-

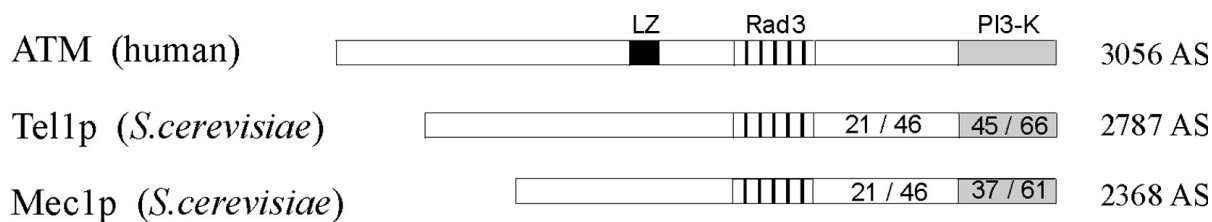


Abb 1

Sequenzhomologie zwischen ATM und Tel1p/Mec1p (*S. cerevisiae*)

Dargestellt ist die Aminosäuresequenz der Proteine, hervorgehoben der Leuzinzipper (LZ, schwarz) und die stark homologen Regionen der Rad3-Domäne (gestreift), sowie der Phosphatidylinositol-3-Kinase-(PI3K)-Domäne (schraffiert). Die Zahlen geben die Homologie bzw. Identität (%) der Aminosäuren im Bereich der PI3K-Domäne sowie in dem Rest der Proteine zu ATM an.

Tab 1

Vergleich der Phänotypen TEL1- und MEC1-defizienter Hefen mit humanen AT-Zellen und AT-Zellen nach Expression des TEL1-Gens

Phänotyp	MEC1-defiziente Hefen	TEL1-defiziente Hefen	Humane AT-Zellen	AT-Zellen mit TEL1-Expression
Spontane Hyperrekombination	ja	ja	ja	stark reduziert
Chromosomenverluste	-	ja	ja	?
Telomerenverkürzung	-	ja	ja	reduziert
Strahleninduzierte Zellzyklusdefekte	ja	-	ja	ja
Strahlenhypersensitivität	ja	-	ja	reduziert

weisen sollten (Abb 1). Tel1p aus der Hefe hat die größte strukturelle Homologie zu ATM innerhalb der Familie homologer PI-3-Kinasen und ist ebenfalls an Rekombinationsprozessen beteiligt (8, 10). Der auffälligste Phänotyp TEL1-defekter Hefen ist die starke Telomerenverkürzung, die auch in AT-Zellen abgeschwächt ersichtlich ist und kontrovers diskutiert wird (11–13). MEC1-defiziente Hefen zeigen ebenso wie AT-Zellen die Hypersensitivität gegenüber DNA-schädigenden Agenzien und eine fehlende Arretierung in der G1-Phase des Zellzyklus. Basierend auf den zellulären Daten wurde postuliert, daß Tel1p und Mec1p in der Hefe kooperativ eine ATM-homologe Funktion ausüben (8, Tab 1).

Funktionelle Analysen durch Komplementation von AT-Zellen

Neueste Untersuchungen haben gezeigt, daß ektopisch exprimiertes Wildtyp-ATM-Protein die charakteristischen zellulären Defekte von AT-Zellen korrigieren kann (14, 15), wodurch eine klare Unterscheidung einzelner, distinkter ATM-Funktionen jedoch noch nicht möglich ist. Hingegen konnten durch Expression partieller cDNA-Fragmente des ATM-Gens einzelne zelluläre AT-Defekte komplementiert, bzw. dominant-negativ in normalen Zellen induziert werden (16,17), was Hinweise auf funktionelle Domänen des ATM-Proteins liefert.

Nach Expression des homologen TEL1-Gens aus der Hefe konnten wir ebenfalls spezifische Defekte in AT-Zellen partiell komplementieren (18). Tel1p konnte in menschlichen Zellen

die hohe spontane intrachromosomale Rekombinationsrate (19, 20) unterdrücken. Gleichzeitig konnten die strahleninduzierte Apoptose der AT-Zellen sowie die Verkürzung der Telomeren supprimiert werden (Tab 1). Der letzte Befund ist besonders interessant, da er erstmals die Korrektur des Phänotyps verkürzter Telomere in AT-Zellen illustriert. Darüberhinaus wurde erstmals gezeigt, daß der strukturellen Homologie des Hefeproteins Tel1p zu ATM eine homologe Funktion entspricht, die auch in menschlichen AT-Zellen wirksam ist.

Diskussion

Der vielfach beobachtete starke Konservierungsgrad von Genen der DNA-Reparatur zeigt sich auch in der Familie ATM-ähnlicher PI-3-Kinasen. Bei Mutation oder Ausfall der homologen MEC1- oder TEL1-Gene aus *S. cerevisiae* entstehen AT-ähnliche Phänotypen der Hefen. Für das Tel1-Protein konnten wir außerdem zeigen, daß es auch in menschlichen AT-Zellen funktionelle Homologie zum ATM-Protein besitzt.

Die partielle funktionelle Komplementation defekter AT-Phänotypen durch Tel1p gibt Hinweise auf verschiedene ATM-abhängige Mechanismen, die unterschiedliche zelluläre Funktionen kontrollieren. Somit ermöglicht der methodische Ansatz der phänotypischen Komplementation von AT-Zellen durch Hefegene, einzelne Funktionen des ATM-Proteins und seiner assoziierten Proteine zu charakterisieren. Umgekehrt sollte, basierend auf der starken Konservierung ATM-ähnlicher

PI-3-Kinasen, die Komplementation von defizienten Hefeklonen durch ATM die weitere funktionelle Analyse dieses Proteins erlauben.

Literatur

1. Meyn SM (1995) Chromosome Instability Syndromes: Lessons for Carcinogenesis. In: MB Kastan (Ed) Current Topics in Microbiology and Immunology: Genetic Instability and Tumorigenesis. Springer, Vol 221: 72-148.
2. Savitsky K et al (1995) A single ataxia telangiectasia gene with a product similar to PI3-kinase. Science 268:1749-1753.
3. Meyn MS (1995) Ataxia-Telangiectasia and Cellular Responses to DNA damage. Cancer Res 55:5991-6001.
4. Canman CE, Lim DS, Cimprich KA, Taya Y, Tama K, Sakaguchi K, Appella E, Kastan MB, Siliciano JD (1998) Activation of the ATM kinase by ionizing radiation and phosphorylation of p53. Science 281:1677-1679.
5. Banin S, Moyal L, Shieh S, Taya Y, Anderson CW, Chessa L, Smorodinsky NI, Prives C, Reiss Y, Shiloh Y, Ziv Y (1998) Enhanced phosphorylation of p53 by ATM in response to DNA damage. Science 281:1674-1677.
6. Watters D, et al (1997) Cellular localisation of the ataxia-telangiectasia gene product and discrimination between mutated and normal forms. Oncogene 14:1911-1921.
7. Savitsky K, Sfez S, Tagle DA, Ziv Y, Sartiell A, Collins FS, Shiloh Y, Rotman G (1995) The complete sequence of the coding region of the ATM gene reveals similarity to cell cycle regulators in different species. Hum Mol Genet 4:2025-2032.
8. Morrow DM, Tagle DA, Shiloh Y, Collins FS, Hieter P (1995) TEL1, an *S. cerevisiae* homolog of the human gene mutated in ataxia telangiectasia, is functionally related to the yeast checkpoint gene MEC1. Cell 82:831-840.
9. Paulovich AG, Hartwell LH (1995) A checkpoint regulates the rate of progression through S phase in *S. cerevisiae* in response to DNA damage. Cell 82:841-847.
10. Greenwell PW, Kronmal SL, Porter SE, Gas-

senhuber J, Petes TD (1995) TEL1, a gene involved in telomere length in *S. cerevisiae*, is homologous to the human ataxia telangiectasia gene. *Cell* 82:823-829.

11. Xia SJ, Shamma MA, Shmookler-Reis RJ (1996) Reduced telomere length in ataxia-telangiectasia fibroblasts. *Mutat Res* 364:1-11.

12. Smilenov LB, Morgan SE, Mellado W, Sawant SG, Kastan MB, Pandita TK (1997) Influence of ATM function on telomere metabolism. *Oncogene* 15:2659-2665.

13. Sprung CN, Bryan TM, Reddel RR, Murnane JP (1997) Normal telomere maintenance in immortal ataxia telangiectasia cell lines. *Mutat Res* 379:177-184.

14. Zhang N, Chen P, Khanna KK, Scott S, Gattei M, Kozlov S, Watters D, Spring K, Yen T, Lavin MF (1997) Isolation of full-length ATM cDNA and correction of the ataxia-telangiectasia cellular phenotype. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:8021-8026.

15. Ziv Y, Bar-Shira A, Pecker I, Russel P, Jorgensen TJ, Tsarfati I, Shiloh Y (1997) Recombinant ATM protein complements the cellular AT phenotype. *Oncogene* 15:159-167.

16. Morgan SE, Lovly C, Pandita TK, Shiloh Y, Kastan MB (1997) Fragments of ATM which have dominant-negative or complementing activity. *Mol Cell Biol* 17:2020-2029.

17. Uhrhammer N, Fritz E, Boyden L, Meyn MS (1996) An ATM antisense vector that confers an ataxia-telangiectasia phenotype on normal cells. *Am J Hum Genet* 59 (Supplement):A4.

18. Fritz E, Zwacka R, Friedl AA, Eckardt-Schupp F, Meyn SM: TEL1 partially complements various phenotypic defects of Ataxia telangiectasia cells. (Manuskript in Vorbereitung)

19. Meyn MS (1993) High spontaneous intrachromosomal recombination rates in Ataxia-telangiectasia. *Science* 269:1327-1330.

20. Luo C-M, Tang W, Mekeel KM, DeFrank JS, Anne PR, Powell SN (1996) High frequency and error-prone DNA recombination in Ataxia-telangiectasia cell lines. *J Biol Chem* 271:4497-4503.