

Mutations- und Expressionsanalyse des ATM-Gens in sporadischen Mammakarzinomen

Rita K. Schmutzler, Andreas Waha, Chris Sturme, Astrid Kessler, Dieter Krebs, Otmar D. Wiestler

Zusammenfassung

Das Ataxia telangiectatica Gen (ATM) ist auf Chromosom 11q22.3 lokalisiert, in einer Region mit häufigen Allelverlusten beim Mammakarzinom. Patienten mit Ataxia telangiectatica haben ein deutlich erhöhtes Risiko für die Entstehung verschiedener maligner Tumoren. Weibliche heterozygote Trägerinnen haben nach epidemiologischen Untersuchungen ein ca. 5–8-fach erhöhtes Risiko für die Entstehung eines Mammakarzinoms. Es konnte gezeigt werden, dass Mutationen im ATM Gen die Expression des ATM Gens unterschiedlich stark inhibieren und dadurch die Schwere des Krankheitsbildes modifizieren können. In dieser Studie untersuchten wir 99 Mammakarzinome mit SSCP und Heteroduplex-Analyse auf Mutationen in der funktionellen Domäne des ATM-Gens, der Phosphatidylinositol-3 (PI-3)-Kinase Region. In 39 Mammakarzinomen, 14 benignen Läsionen und 12 Proben von normalem Mammagewebe wurde außerdem die mRNA mittels kompetitiver RT-PCR analysiert. Dazu wurden deletierte Standardmoleküle für ATM und das „housekeeping“ Gen β 2-Microglobulin (β 2M) durch randständige Mutagenese hergestellt. Während keine Mutationen in der PI-3-Kinase Region des ATM Gens nachweisbar waren, fanden wir signifikant erniedrigte mRNA-Werte im Karzinomgewebe im Vergleich zum Normalgewebe. Die benignen Läsionen zeigten intermediäre Level (F-Test, $p = 0,0013$). Diese Ergebnisse deuten daraufhin, dass dem ATM Gen eine Funktion in der Mammakarzinogenese zukommen könnte.

Schlüsselwörter

Ataxia telangiectatica, Mammakarzinom, Expression

Summary

Mutation and expression analysis of the ATM gene in sporadic mammary tumors

The gene mutated in ataxia telangiectasia patients (ATM) is located on chromosome 11q22.3, a region frequently altered in mammary tumors. Patients homozygous for ATM mutations are prone to develop a variety of different tumors. Female carriers have been reported to have a 5 to 8 fold increased risk for mammary tumors. Most of the alterations described so far in AT patients lead to a functional inactive ATM protein. Moreover, it has been suggested that mutations of the ATM gene in AT patients influence the amount of ATM mRNA and that this may affect the severity of the disease. In this study we analysed 99 breast carcinomas for mutations in the phosphatidylinositol-3 (PI3)-kinase functional domain of the ATM gene by SSCP and heteroduplex analysis. Also, the expression of the ATM gene was investigated in a series of 39 breast carcinomas, 14 benign breast lesions and 12 normal breast tissue samples. RNA levels were measured by semiquantitative competitive RT PCR. Competitor RNA molecules for the ATM gene and the housekeeping gene β -2-microglobuline. We could not detect any mutations in the PI-3-kinase domain indicating that alterations in this region do not contribute to breast carcinogenesis. However, significantly lower levels of the ATM transcript were found in invasive breast carcinomas compared to benign alterations (T-test, $p = 0.0013$). These results suggest that reduced expression of the ATM gene may contribute to the development and/or malignant progression of breast carcinomas.

Keywords

Ataxia telangiectasia, breast cancer, expression

Einleitung

Das Ataxia telangiectatica (AT)-Syndrom ist eine rezessiv erbliche Erkrankung, die durch das Auftreten von Telangiectasien und cerebellärer Ataxie charakterisiert ist. Desweiteren zeigen die Betroffenen eine starke Neigung zur Entstehung verschiedener Tumoren.

Untersuchungen an obligat heterozygoten Trägern des AT-Syndroms ergaben, dass auch sie ein erhöhtes Entartungsrisiko tragen. Als häufigster Tumor tritt bei weiblichen Heterozygoten das Mammakarzinom mit einem relativen Risiko von ca. 5 auf. Nach epidemiologischen Schätzungen sind 1–8% der Population heterozygote Träger (1). Unter der Annahme einer niedrigen Penetranz des ATM-Gens wurde kalkuliert, dass das ATM-Gen für mindestens 7% aller Brustkrebsfälle verantwortlich ist (2). Damit könnte ihm eine größere Bedeutung bei der Mammakarzinogenese zukommen als den Genen BRCA1 und BRCA2 zusammen. Die gynäkologische Bedeutung eines ATM-Carrier-Status ist zweifach. Es besteht die Möglichkeit einer erhöhten Karzinomrate als auch einer erhöhten Entartungsrate durch Mammographie-Screening.

Es liegen bereits molekulargenetische Untersuchungen des ATM-Gens und des chromosomalen Lokus in Mammakarzinomen vor. Verschiedene Autoren berichten von hohen Allelverlust-Raten des ATM-Lokus auf dem langen Arm von Chromosom 11q22–23. Hohe Verlust-Raten auf einem chromosomalen Lokus einhergehend mit einem aggressiveren Tumorverhalten sind hinweisend auf die Existenz eines Tumorsuppressorgens in dem betroffenen Bereich. Die Häufigkeit der Allelverluste in dieser Region liegt bei allen Untersuchern um 40% und es konnte eine signifikante Korrelation von Allelverlusten auf 11q22–23 mit Tumoraggressivität und reduzierter Überlebensrate nachgewiesen werden (3).

Mit der Sequenzierung und Charakterisierung des ATM-Gens ist eine Analyse an Frauen mit Mammakarzinomen möglich geworden (4). Es handelt sich um ein sehr großes Gen bestehend aus 66 Exons, wobei die car-

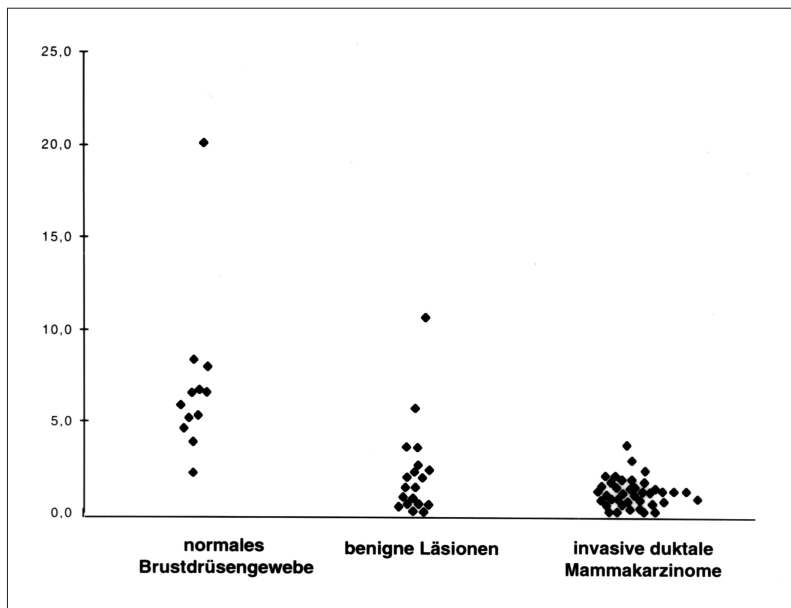


Abb 1
Relative Expression des ATM-Gens in normalem Brustdrüsengewebe, benignen Läsionen und invasiven Mammakarzinomen

Die höchste Expression ist in normalem Gewebe nachweisbar. Benigne Läsionen zeigen intermediäre Werte und invasive Karzinome die niedrigsten Level (F-Test, $p=0.0013$).

boxyterminale Region eine Phosphatidylinositol-3 (PI-3)-Kinase Domäne besitzt. PI-3-Kinasen sind von großer Bedeutung bei der Regulation der Zellproliferation. Es wird vermutet, dass das ATM-Protein in den frühen Stadien der DNA-Reparatur nach Bestrahlung wirksam wird (5). Es gibt außerdem Hinweise darauf, dass ein defektes ATM-Protein die TP53 vermittelte DNA-Reparatur verhindert oder reduziert (6). Eine Schlüsselrolle des ATM-Gens im Zellzyklus könnte die mannigfaltige Wirkung und den heterogenen Symptomenkomplex der AT-Patienten erklären.

Analysen an sporadischen lymphatischen Tumoren zeigen, dass sich bis zu 40% der Mutationen in der PI-3-Kinase Region häufen (siehe Beitrag von Schaffner und (7)). Es liegen mittlerweile auch Untersuchungen des ATM-Gens in Mammakarzinomen vor (8-11). Diese zeigen, dass die Prävalenz von ATM-Mutationen bei Frauen mit frühem Erkrankungsalter niedrig ist. Bei heterozygoten Trägerinnen aus AT-Familien konnte aber tatsächlich ein erhöhtes relatives Risiko für das Mammakarzinom gefunden werden. Zusammenfassend lassen diese limitierten Untersuchungen noch keine endgültige Beurteilung der Bedeutung des ATM-Gens für die Mammakarzinogenese zu.

Material und Methode

Wir untersuchten 99 sporadische Mammakarzinome auf Mutationen in der PI-3-Kinase Region des ATM-Gens mittels SSCP und Heteroduplexanalyse. Dazu wurde die PI-3-

Kinase Region des ATM-Gens von bp 4322-5177 (GDB Accession number U26455) in 5 Fragmente mit den Längen 207 bp, 289 bp, 256 bp, 260 bp und 225 bp unterteilt.

Von 39 Mammakarzinomen, 14 benignen Läsionen und 12 Proben von normalem Mammagewebe wurde mRNA mittels kompetitiver RT-PCR quantifiziert. Als „housekeeping“ Gen verwendeten wir b2-Microglobulin (b2-M). Von beiden Genen wurden mutierte, deletierte Standards durch randständige Mutagenese hergestellt (12, 13).

Von 21 Mammakarzinomen lag ausserdem Leukozyten-DNA vor. Diese wurden mit den Mikrosatellitenmarkern D11S976, D11S1300, D11S1818 und D11S2003 auf Allelverlust in der Region 11q22-24 analysiert.

Ergebnisse

In keinem der 99 Mammakarzinome konnten aberrante Banden in der SSCP- und Heteroduplex-Analyse nachgewiesen werden. Es ergaben sich somit keine Hinweise auf Mutationen in dieser hochkonservierten funktionellen Region.

Die Expressionsanalyse des ATM-Gens zeigte deutliche Unterschiede zwischen den untersuchten Kollektiven. Die Expression lag in den invasiven Mammakarzinomen am niedrigsten. In den benignen Läsionen zeigten sich mittlere Expressionslevel und in den normalen Gewebeproben hohe Werte (Abb 1). Diese Unterschiede waren statistisch hochsignifikant (F-Test, $p=0.0013$) (12). Es konnte keine

Korrelation zwischen der ATM-Expression und der klinischen und histopathologischen Klassifikation nachgewiesen werden. Die Expressionswerte schwankten am stärksten in der Gruppe der benignen Läsionen. Von den 14 Proben zeigten 6 deutlich erniedrigte Expressionswerte. Hierunter befand sich eine proliferative Mastopathie Grad III, ein rezidivierender phylloider Tumor und ein Fibroadenom, welches neben einem invasiven Tumor gelegen war. Allelverluste wurden ausschließlich in den malignen Läsionen nachgewiesen, wobei 7 der 18 (38%) informativen Karzinome LOH11q22-24 aufwiesen.

Diskussion

Die Analyse der PI-3-Kinase-Region des ATM-Gens in 99 Mammakarzinomen ergab keinen Anhalt für das Vorliegen von Mutationen in dieser Region. Damit kommt zumindest dieser Genregion keine besondere Bedeutung beim sporadischen Mammakarzinom zu.

Es liegen weitere Arbeiten vor, welche diese Ergebnisse bestätigen. In einer Untersuchung wurden 38 primäre Mammakarzinome von Frauen ohne familiäre Belastung analysiert, und es konnten lediglich seltene konstitutionelle Polymorphismen gefunden werden (11). Die gleiche Arbeitsgruppe untersuchte anschließend 88 Mammakarzinome aus Karzinom-Familien mit unterschiedlichen sonstigen Tumoren. Es konnten 3 Keimbahn-Mutationen in Familien mit mehreren Tumorerkrankten nachgewiesen werden (10). Eine weitere Arbeit an AT-Famili-

en bestätigt ebenfalls ein erhöhtes relatives Risiko von 3,8 für AT-Heterozygote (8). In der bisher umfangreichsten Untersuchung von 402 Mammakarzinom-Erkrankten mit einem Erkrankungsalter vor dem 40. Lebensjahr und einer gesunden Kontroll-Gruppe von 202 Frauen konnten lediglich 2 AT-Heterozygote sowohl in der Karzinom-Gruppe als auch in der Kontroll-Gruppe gefunden werden (9). Die bisher vorliegenden Untersuchungen erlauben daher folgende Schlussfolgerungen:

a) Das relative Risiko von AT-Heterozygoten an einem Mammakarzinom zu erkranken ist erhöht. b) Die Bestimmung der tatsächlichen Heterozygotenfrequenz und damit die Beurteilung der epidemiologischen Bedeutung dieses Befundes steht noch aus. c) AT-Heterozygote sind nicht gehäuft in der Gruppe der früh erkrankten Frauen zu finden (14). Dies stimmt mit der Hypothese überein, dass es sich um niedrig penetrante Mutationen mit später Manifestation des Mammakarzinoms handeln könnte.

Unsere Untersuchungen auf Allelverluste in der ATM-Region zeigen signifikante Verlustraten, wobei der dem ATM-Gen am nächsten gelegene Marker am häufigsten betroffen war. Dies spricht weiterhin für ein putatives TSG in der ATM-Region und stimmt mit den Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen überein (3).

Die hier dargestellten Ergebnisse der Expressionanalyse des ATM-Gen in benignen und malignen Tumoren zeigen deutliche Unterschiede zwischen benignen und malignen Läsionen. Reduzierte ATM-Transkripte wurden sowohl in Tumoren mit als auch ohne Allelverluste in der ATM-Region nachgewiesen. Dies deutet darauf hin, dass andere, zum Beispiel epigenetische Mechanismen zu einer erniedrigten Expression führen können. Für BRCA1 konnte gezeigt werden, dass Mutationen in sporadischen Mammakarzinomen nicht nachweisbar sind, jedoch eine erniedrigte Expression welche mit einer Hypermethylierung einher geht (15). Neuere Untersuchungen zeigen, dass die BRCA-Gene ebenso wie ATM eine bedeutende

Rolle bei der DNA-Reparatur spielen und eine erniedrigte Expression über diese Mechanismen an der Mammakarzinogenese beteiligt sein könnten.

Literatur

1. Swift, M et al (1991) Incidence of cancer in 161 families affected by ataxia-telangiectasia (see comments). *N Engl J Med* 325(26):1831-6.
2. Easton, D, Ford F, Peto J (1993) Inherited susceptibility to breast cancer. *Cancer Surv* 18(95): 95-113.
3. Winqvist R et al (1995) Loss of heterozygosity for chromosome 11 in primary human breast tumors is associated with poor survival after metastasis. *Cancer Res*, 1995. 55(12) p. 2660-4.
4. Savitsky K et al (1995) A single ataxia telangiectasia gene with a product similar to PI-3 kinase (see comments). *Science* 268(5218) 1749-53.
5. Thacker J (1994) Cellular radiosensitivity in ataxia-telangiectasia. *Int J Radiat Biol*.
6. Lavin MF et al (1994) Defect in radiation signal transduction in ataxia-telangiectasia. *Int J Radiat Biol*.
7. Vorechovsky I et al (1997) Clustering of missense mutations in the ataxia-telangiectasia gene in a sporadic T-cell leukaemia. *Nature Genetics* 17: 96-99.
8. Athma P, Rappaport R, Swift M (1996) Molecular genotyping shows that ataxia-telangiectasia heterozygotes are predisposed to breast cancer. *Cancer Genet Cytogenet* 92(2):130-4.
9. FitzGerald MG et al (1997) Heterozygous ATM mutations do not contribute to early onset of breast cancer. *Nature Genetics* 15:307-310.
10. Vorechovsky I et al (1996) ATM mutations in cancer families. *Cancer Res* 56(18):4130-3.
11. Vorechovsky I et al (1996) The ATM gene and susceptibility to breast cancer: analysis of 38 breast tumors reveals no evidence for mutation. *Cancer Res* 56(12):2726-32.
12. Waha A et al (1998) Expression of the ATM gene is significantly reduced in sporadic breast carcinomas. *Int J Cancer* 78:306-309.
13. Watzka M et al (1997) An optimized protocol for mRNA quantification using nested competitive RT-PCR. *Biochem Biophys Res Commun*, 231(3):813-7.
14. Bishop DT, Hopper J (1997) AT-tributable risks? *Nat Genet* 15:226.
15. Magdiner F et al (1998) Down-regulation of BRCA1 in human sporadic breast cancer; analysis of DNA methylation patterns of the putative promoter region. *Oncogene* 17(24):3169-3176.