

# Mutationsanalyse des ATM-Gens bei Tumorpatienten mit schweren Bestrahlungsnebenwirkungen

Ulrich Oppitz, Ulrike Bernthaler, Detlev Schindler, Holger Höhn, Matthias Platzer, André Rosenthal, Michael Flentje

## Zusammenfassung

Rund 5% aller strahlenbehandelten Malignompatienten zeigen beträchtliche Akut- oder Spätreaktionen des mitbestrahlten Normalgewebes.

Neben exogenen Einflüssen sind es genetische Faktoren, die gesteigerte Strahlensensitivität bedingen. Eine solche genetische Basis findet sich bei Patienten mit Ataxia teleangiectatica (AT), die klinisch und zellulär deutlich erhöhte Strahlensensitivität zeigen. Im Hinblick auf AT Überträger ist eine Assoziation von gesteigerter Strahlensensitivität und Heterozygotenstatus kontrovers. Um einen möglichen Zusammenhang zu prüfen, wurden bei 18 Tumorpatienten mit starken radiogenen Nebenwirkungen retrospektiv alle 66 Exons mit den angrenzenden Intronregionen des ATM-Gens PCR-amplifiziert und mit Hilfe von SSCP-Analysen und direkter automatischer Sequenzierung auf Mutationen hin untersucht. Insgesamt wurden 4 heteroallele Sequenzaberrationen beobachtet, die alle als neutrale Sequenzvarianten anzusehen sind; die erhöhte Strahlensensitivität der untersuchten Patienten läßt sich demnach nicht durch Veränderungen im ATM-Gen erklären. Um die Prävalenz AT Heterozygoter in definierten Untergruppen des radiotherapeutischen Patientengutes mit Strahlennebenreaktionen zu bestimmen, wäre trotz erheblichen Aufwands die prospektive Untersuchung größerer Patientenzahlen wünschenswert.

## Schlüsselwörter

Ataxia teleangiectatica, AT, ATM, Strahlentherapie, Strahlensensitivität

## Summary

*ATM-Sequence-Analysis in cancer patients with elevated clinical radiation-sensitivity*

*About 5% of all patients with malignant disease treated by radiation therapy show severe acute or late, or both, adverse side reactions of simultaneously irradiated surrounding normal tissue. Apart from exogenous influences, genetic factors determine increased radiation sensitivity. Such underlying genetic basis is present in patients with ataxia telangiectasia (AT) where both, clinical and cellular radiation hypersensitivity are manifest. In AT heterozygotes, such association is less well established. In order to investigate any relation of clinically observed radiation hypersensitivity and AT heterozygous status, the ATM gene was screened retrospectively for mutations in 18 tumor patients with severe acute or late, or both, adverse radiation side reactions. All 66 exons of the ATM gene were PCR amplified and analyzed using SSCP assay and exon scanning sequencing. As the result, 4 heteroallelic sequence aberrations were detected, which all represented neutral variants. Thus, increased radiation sensitivity in these patients is not readily explained by heterozygous mutations in the ATM gene. In order to examine the prevalence of AT heterozygotes in defined subsets of all cancer patients showing severe side reactions to radiotherapy, prospective studies of larger cohorts and carefully selected patients would be warranted despite considerable effort.*

## Keywords

*Ataxia telangiectasia, AT, ATM, radiation therapy, radiation sensitivity*

## Einleitung

Während und nach der Strahlenbehandlung von Malignompatienten werden klinisch sehr unterschiedlich starke radiogene Früh- und Spätnebenwirkungen an Normalgeweben im Bestrahlungsfeld beobachtet, selbst wenn Bestrahlungsart, Gesamtdosisapplikation und Fraktionierungsschema identisch sind. Da sich die Bestrahlungsdosis sowohl nach der Tumorkontrolldosis, als auch nach der Normalgewebstoleranz richtet, ist neben der zielgerichteten, sicheren Zerstörung des Tumors die Limitierung der Dosis zur maximalen Schonung der umliegenden Organe auf Werte nötig, die bei den Patienten in der Regel lediglich zu tolerablen Nebenwirkungen an den mitbestrahlten Normalgeweben führen. Die Toleranzdosen sind gemittelte Erfahrungswerte, die nur bei 5% der Patienten zu mäßigen und bei weniger als 1% der Patienten zu starken radiogenen Normalgewebsreaktionen führen.

Patienten mit Ataxia teleangiectatica (AT) und dem Nijmegen-Breakage-Syndrom (NBS) zeigen in vivo wie auch in vitro deutlich erhöhte Strahlensensitivität (5,6,12). in vitro-Studien zur Strahlensensitivität von AT Heterozygoten führten zu uneinheitlichen Ergebnissen (7,16,17), so daß zelluläre Untersuchungen im Einzelfall nicht als sicherer Indikator für zu erwartende klinische Strahlensensitivität oder AT Heterozygotenstatus angesehen werden können.

Die Isolierung und Charakterisierung des für AT verantwortlichen Gens ATM (11,13) gestattet nun direktes Mutationscreening in solchen Patientengruppen, in denen AT Heterozygotenstatus als Mitursache von Krankheitserscheinungen oder -auswirkungen vermutet wird. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich daher mit der Frage, ob es einen Zusammenhang zwischen Patienten mit klinisch beobachteten starken Bestrahlungsnebenwirkungen am tumorumgebenden Normalgewebe und heterozygot vorkommenden Mutationen im ATM-Gen gibt.

## Patienten und Methoden

Aus der Klinik für Strahlentherapie der Universität Würzburg wurden retro-

spektiv 18 Tumorpatienten in die vorliegende Untersuchung einbezogen, die während oder nach der Bestrahlung von Malignomen ungewöhnlich starke Früh- oder Spätnebenwirkungen, oder beides, entwickelten (RTOG Grad 3 und 4, (8)). Auswahlkriterium war allein die Schwere der radiogenen Nebenreaktionen. Nach schriftlichem Einverständnis wurde genomische DNA aus Blutproben isoliert. Alle Exons und die benachbarten Intronabschnitte des ATM-Gens wurden amplifiziert und die PCR-Produkte PEG-präzipitiert. Nach initialer Agarose-Gelelektrophorese und SSCP-Analyse wurden beide Stränge der PCR-Produkte direkt mittels „Cycle-Sequencing“- und „Dye-Terminator“-Technik auf ABI-377-Geräten (Perkin Elmer) untersucht analog wie in einer Studie von AT Patienten (10). Die Sequenzdaten wurden mit Hilfe des XGAP-Programms editiert (2) und mit der ATM-Referenzsequenz verglichen (11,13).

### Ergebnisse

Bei 2 der 18 untersuchten Patienten fanden wir jeweils 2 unterschiedliche Sequenzaberrationen. Dabei handelte es sich um 2 verschiedene Einzelbasendeletionen, 1 Einzelbasensubstitution und 1 große Insertion. Beide Patientinnen wurden auf Grund eines Mammakarzinoms bestrahlt.

Patientin 7, die durch Früh- und Spätreaktionen dritten Grades im Bereich der mitbestrahlten Haut auffiel, zeigte bei der SSCP-Analyse Bandenshifts des PCR-Produkts von Exon 25 (mit benachbarten Regionen der Introns 24 und 25). Direkte Sequenzierung zeigte die heteroallelische Deletion eines T in Intron 24 an Position 3285-9 der ATM-cDNA. Bei derselben Patientin fielen bereits bei der initialen Agarose-Gelelektrophorese zwei unterschiedlich große PCR-Produkte von Exon 56 (mit benachbarten Regionen der Introns 55 und 56) auf, wobei die aberrante Bande um mindestens 300 bp größer erschien als das normale PCR-Produkt von 253 bp Länge. Direkte Sequenzierung zeigte die Insertion einer Alu-Sequenz von 297 bp plus eines direkten Repeats von 11 bp an deren 5'-Ende in Intron 56 an Position 7927+23 der ATM-cDNA in einem Allel. Um zu prüfen, ob diese Insertion

möglicherweise mit dem normalen „Splicing“ interferiert, wurde RNA aus einer lymphoblastoiden Zelllinie der Patientin in cDNA übersrieben und ein PCR-Produkt, das die Nukleotidpositionen 7846 bis 8929 der ATM-cDNA umfaßte, in einer gekoppelten in vitro-Transkriptions- und Translationsstudie untersucht. Dabei fand sich lediglich normales Protein einer Größe von erwarteten 42 kDa wie bei anderen strahlensensitiven Patienten und einer normalen Kontrollperson.

Patientin 10, die nach Thoraxwandbestrahlung bei Mammakarzinom eine Bestrahlungspneumonitis dritten Grades im Sinne einer kombinierten Früh- und Spätnebenwirkung entwickelte, erwies sich bei der Sequenzierung des PCR-Produkts von Exon 24 als heterozygot für einen Basenaustausch von C nach G an Position 3161 der ATM-cDNA, aus dem sich die Aminosäuresubstitution von Prolin durch Arginin an Position 1054 im ATM-Proteins ableiten läßt. Weiterhin fanden wir bei derselben Patientin bei der Sequenzierung des PCR-Produkts von Exon 26 mit angrenzenden Regionen der Introns 25 und 26 an Position 3403-15 der ATM-cDNA die heteroallelische Deletion eines A in Intron 25.

### Diskussion

Appleby et al. (1) errechneten an Hand theoretischer Annahmen, daß 80% der Patientinnen mit Mammakarzinom, die schwere radiogene Nebenreaktionen nach therapeutischer Bestrahlung zeigen, Träger von Mutationen im ATM-Gen sein könnten. Wir gingen daher davon aus, unter 18 Tumorpatienten, darunter 11 mit Mammakarzinom, die während oder nach Abschluß einer Strahlentherapie durch starke Nebenwirkungen auffielen, signifikante ATM-Genveränderungen zu finden. Entgegen dieser Erwartung fanden wir in unserem Patientenkollektiv keine funktionelle ATM-Mutation. Dagegen wurden in einer Studie, die gleichzeitig und in methodisch sehr ähnlicher Art und Weise durchgeführt wurde, bei 66 unverwandten AT Patienten 46 verschiedene Mutationen im ATM-Gen identifiziert. Die beiden Basendeletionen 3285-9delT und 3403-15delA in der vorliegenden Arbeit betreffen keine Regionen, die am normalen „Splicing“

beteiligt sind, und führen keine neuen „Splice“-Konsensussequenzen ein. Man kann sie deshalb vernünftigerweise als neutrale Sequenzvarianten betrachten. Sie wurden außerdem bereits von Sandoval et al. (10) bei der Untersuchung von 100 Kontrollchromosomen anonymen Spender mit Allelraten von 0,18 beziehungsweise 0,37 beobachtet und als Polymorphismen klassifiziert. Auch die Basensubstitution 3161C<sup>3</sup>G in der vorliegenden Arbeit, welche die nicht-konservative Aminosäuren-substitution P1054R bedingt, wurde von Vorechovsky et al. (14) mit einer Allelfrequenz von 2,3% bei europäischen Kaukasiern gefunden und kam in einer anderen Studie von Vorechovsky et al. (15) mit etwa gleichen Häufigkeiten in 4 von 126 Chromosomen (3,2%) weiblicher Kontrollpersonen und in 4 von 176 Chromosomen (2,3%) von Patientinnen mit familiärem Brustkrebs vor. Schließlich fand sich diese Veränderung in 7% von 100 Kontrollchromosomen in der Studie von Sandoval et al. (10) und wurde wie andernorts als Polymorphismus eingestuft. Die heterozygote Alu-Insertion in Intron 56 in der vorliegenden Arbeit war bereits einmal unter 125 Brustkrebspatientinnen beobachtet worden (Prof. Dr. B. H. F. Weber, persönliche Mitteilung); von dieser Insertion konnten wir hier zeigen, daß sie zu keiner Änderung normalen „Splicings“ führt.

Unsere Ergebnisse entsprechen den Resultaten zweier anderer Arbeitsgruppen; Appleby et al. (1) und Ramsey et al. (9) konnten ebensowenig wie wir funktionelle Mutationen im ATM-Gen unter den von ihnen untersuchten strahlensensitiven Patienten feststellen. FitzGerald et al. (3) beschrieben 2 Brustkrebspatientinnen mit Strahlennebenwirkungen, die schwer genug waren, um die Therapie abzubrechen; keine von beiden wies eine ATM-Mutation auf. Lediglich Hall et al. (4) nehmen für sich in Anspruch, unter 17 Prostatakarzinompatienten 3 AT Heterozygote (17,6%) gefunden zu haben. Es ist jedoch überraschend, daß es sich bei den beschriebenen Sequenzaberrationen ausschließlich um Missense-Mutationen handelt, obwohl die Mehrzahl aller beschriebenen ATM-Mutationen trunkierend ist. Da Hall et

al. (4) die Nukleotidpositionen ihrer Veränderungen nicht angeben, kann auch nicht beurteilt werden, ob der beschriebene Basenaustausch von G nach A in Exon 39, der die Aminosäuresubstitution von Asparaginsäure durch Asparagin bei Patient 5 der Studie bedingt, einer von Appleby et al. (1) bei 8 von 23 Brustkrebspatientinnen und von Sandoval et al. (10) in 18% von 100 Kontrollchromosomen beobachteten, als funktionell neutral angesehenen Sequenzvariante entspricht. Schließlich haben Hall et al. (4) das Vorkommen der von ihnen gefundenen Veränderungen nicht bei einer Standardanzahl von Kontrollen an entsprechenden Positionen im ATM-Gen ausgeschlossen, was zur Interpretation der Sequenzvarianten im Sinne von Mutationen wünschenswert wäre.

Auch die umgekehrte Annäherung an die Frage einer Assoziation zwischen klinisch gesteigerter Strahlensensitivität und AT Heterozygotie belegt, daß heterozygote ATM-Mutationen nicht unabdingbar für Strahlennebenwirkungen prädisponieren. Ramsey et al. (9) berichteten von einer nachgewiesenen AT Überträgerin mit bilateralem Brustkrebs, die unter Strahlentherapie lediglich eine milde Hautreaktion und minimale Späteffekte zeigte. FitzGerald et al. (3) beobachteten zwei Trägerinnen von ATM-Mutationen, denen Strahlentherapie ohne klinische Nebenwirkungen verabreicht wurde, obwohl aus in vitro-Untersuchungen auf eine erhöhte zelluläre Strahlensensitivität geschlossen wurde. Wenn nicht alle AT Heterozygoten klinisch vermehrt strahlensensitiv sind, liegt die Schlußfolgerung nahe, daß dann wegen der relativ kleinen untersuchten Patientenkollektive in den wenigen bislang durchgeführten Untersuchungen entweder zufällig oder aus Gründen der Patientenauswahl keine Träger von ATM-Mutationen erfaßt wurden.

Auch wenn die Patientenzahlen bisher noch klein sind, so darf man doch wohl schon jetzt feststellen, daß AT Heterozygote keine Mehrzahl unter den Patienten mit klinisch erhöhter Strahlensensitivität bilden. Allerdings kann die Frage, ob Strahlennebenwirkungen mit genetischer Basis nicht in Untergruppen dieser Patienten auftre-

ten, noch nicht als geklärt angesehen. Wenn es eine solche Untergruppe strahlensensitiver Patienten gäbe und diese Patienten als Träger von ATM-Mutationen erkennbar wären, dann könnte bei ihnen die verabreichte Strahlendosis wahrscheinlich ohne schlechtere Tumorbeherrschung reduziert werden, was einen großen Teil von Beschwerden und Leiden verhindern würde. Wenn zu erwartende Strahlennebenwirkungen in einer solchen Untergruppe strahlensensitiver Patienten, wodurch auch immer sie klinisch definiert sein möge, über vorliegende ATM-Mutationen sicher erkennbar wären, dann könnte umgekehrt die Strahlendosis bei den weit aus zahlreicheren restlichen Patienten erhöht werden, denn die gängigen Bestrahlungsprotokolle werden an Hand der durchschnittlichen Häufigkeit von Nebenwirkungen erstellt. Gewollte Folge wäre, daß dadurch bei den nicht vermehrt strahlensensitiven Patienten wahrscheinlich eine verbesserte Tumorkontrolle erreicht werden könnte. Insofern sollte jede nur mögliche Anstrengung unternommen werden, Patientengruppen mit genetischer Basis klinisch erhöhter Strahlensensitivität zu erkennen. Selektionskriterien wie die Beschränkung auf bestimmte Tumorarten, Erfassung nur von entweder Früh- oder Späteffekten, Unterscheidung nach der unterschiedlichen Natur und dem Verlauf der Nebenwirkungen oder Zelltyp- beziehungsweise Gewebspräferenzen ihrer Manifestation spielen für prospektive Untersuchungen mit größeren Patientenzahlen vermutlich eine entscheidende Rolle.

#### Danksagung

Diese Untersuchungen wurden durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft unterstützt im Rahmen der Sachbeihilfe Op 71/1-1. Für ausgezeichnete technische Hilfe danken wir Frau Gitta Emmert und Frau Renate Schakowski.

#### Anmerkung

Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden in Kurzform vorgestellt in Form eines mündlichen Beitrags auf dem „40th Annual ASTRO Meeting“ vom 25. bis 29. Oktober 1998 in Phoenix, Arizona, USA.

#### Literatur

- Appleby JM, Barber JBP, Levine E, Varley JM, Taylor AMR, Stankovic T, Heighway J, Warren C, Scott D (1997) Absence of mutations in the ATM gene in breast cancer patients with severe responses to radiotherapy. *Br J Cancer* 76:1546-1549.
- Dear S, Staden R (1991) A sequence assembly and editing for efficient management of large projects. *Nucleic Acids Res* 19:3907-3911.
- 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.
- Hall EJ, Schiff PB, Hanks GE, Brenner DJ, Russo J, Chen J, Sawant SG, Pandita TK (1998). A preliminary report: frequency of AT heterozygotes among prostate cancer patients with severe late responses to radiation therapy. *Cancer J Sci Am* 4:385-389.
- Morgan JL, Holcomb TM, Morrisey RW (1968) Radiation reaction in ataxia-telangiectasia. *Am J Dis Child* 116:557-558.
- Nachtrab U, Oppitz U, Flentje M, Stopper H (1998) Radiation-induced micronucleus formation in human skin fibroblasts of patients showing severe and normal tissue damage after radiotherapy. *Int J Radiat Biol* 73:279-287.
- Paterson MC, Anderson AK, Smith BP, Smith PJ (1979) Enhanced radiosensitivity of cultured fibroblasts from ataxia telangiectasia heterozygotes manifested by defective colony-forming ability and reduced DNA repair replication after hypoxic gamma-irradiation. *Cancer Res* 39:3725-3734.
- Perez CA, Brady LW (1992) Principles and practice of radiation oncology. 2nd ed. Lippincott, Philadelphia:51-55.
- Ramsay J, Birrell G, Lavin M (1998) Testing for mutations of the ataxia telangiectasia gene in radiosensitive breast cancer patients. *Radiother Oncol* 47:125-128.
- 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.
- Savitsky K, Bar-Shira A, Gilad S, Rotman G, Ziv Y, Vanagaite L, Tagle DA, Smith S, Uziel T, Sfez S, Ashkenazi M, Pecker I, Frydman M, Harnik R, Patanjali SR, Simmons A, Clines GA, Sartiel A, Gatti RA, Chessa L, Sanal O, Lavin MF, Jaspers NGJ, Taylor AMR, Arlett CF, Miki T, Weissman SM, Lovett M, Collins FS, Shiloh Y (1995) A single ataxia telangiectasia gene with a product similar to PI-3 kinase. *Science* 268:1749-1753.
- Taylor, AMR, Harnden DG, Arlett CF, Harcourt SA, Lehmann AR, Stevens S, Bridges BA (1975) Ataxia telangiectasia: a human mutation with abnormal radiation sensitivity. *Nature* 258:427-429.
- Uziel T, Savitsky K, Platzer M, Ziv Y, Helbitz T, Nehls M, Boehm T, Rosenthal A, Shiloh Y, Rotman G (1996) Genomic organization of the ATM gene. *Genomics* 33:317-320.

14. Vorechovsky I, Rasio D, Luo L, Monaco C, Hammarström L, Webster DB, Zaloudik J, Barbanti-Brodani G, James M, Russo G, Croce CM, Negrini M (1996a) The ATM gene and susceptibility to breast cancer: analysis of 38 breast tumors reveals no evidence for mutation. *Cancer Res* 56:2726-2732.

15. Vorechovsky I, Luo L, Lindblom A, Negrini M, Webster DB, Croce CM, Hammarström L (1996b) ATM mutations in cancer families. *Cancer Res* 56:4130-4133.

16. Weeks DE, Paterson MC, Lange K, Andrais B, Davis RC, Yoder F, Gatti RA (1991) Assessment of chronic gamma radiosensitivity as an in vitro assay for heterozygote identification of ataxia-telangiectasia. *Radiat Res* 128:90-99.

17. West CM, Elyan SA, Berry P, Cowan R, Scott D (1995) A comparison of the radiosensitivity of lymphocytes from normal donors, cancer patients, individuals with ataxia-telangiectasia (AT) and AT heterozygotes. *Int J Radiat Biol* 68:197-203.