

Mutationsanalyse des ATM-Gens bei Patientinnen mit Mammakarzinom

Regina Bendix, Marion Nicke, Britta Skawran, Diana Steinmann, Claudia Stöckmann, Hildegard Frye-Boukhriss, Andrea Korte, Christine Volkmann, Jörg Schmidtke, Manfred Stuhmann, Michael Bremer, Dirk Rades, Elisabeth K. Ortmann, Johann Hinrich Karstens, Thilo Dörk

Zusammenfassung

Das ATM-Gen, das bei der Ataxia telangiectatica (Louis-Bar-Syndrom, AT) mutiert ist, spielt wahrscheinlich eine Rolle bei der Reparatur von strahlungsinduzierten DNA-Schäden. Es besteht die Vermutung, daß obligate AT-Genträger/-innen ein erhöhtes Krebsrisiko und insbesondere Frauen ein 5-8fach erhöhtes Risiko für Brustkrebs haben. Wir untersuchten deshalb 190 unselektierte Patientinnen mit einem Mammakarzinom nach eventuell vorhandenen Mutationen im ATM-Gen. Etwa die Hälfte der kodierenden Region des ATM-Gens und die flankierenden Intronsequenzen wurden mittels einer SSCP-Analyse überprüft und auffällige Proben sequenziert. Wir fanden 10 Aminosäuresubstitutionen, die über die gesamte kodierende Region des ATM-Gens verteilt sind, sowie mehrere intronständige Varianten. Unsere bisherigen Ergebnisse zeigen eine große Vielfalt an Missense-Mutationen im ATM-Gen bei Patientinnen mit Brustkrebs, die es erforderlich machen, die Konsequenzen dieses Mutationstypes weiter zu untersuchen.

Schlüsselwörter

ATM, Mammakarzinom

Summary

Mutation analysis of the ATM gene in breast cancer patients

The ATM gene that is mutated in ataxia-telangiectasia (AT) has a possible role in the repair of radiation-induced DNA damage. Obligate AT carriers appear to be at an increased risk to develop cancer and especially women have a 5-8 times higher risk for breast cancer. We have thus investigated 190 unselected breast cancer patients for mutations in the ATM gene. Approximately half of the ATM coding region and flanking intron sequences have so far been screened by SSCP analysis, followed by dye-terminator sequencing of aberrantly migrating samples. We detected 10 amino acid substitutions scattered throughout the ATM coding region as well as several intronic variants. Our present results indicate a high diversity of missense substitutions of the ATM gene in breast cancer, and therefore it will be necessary to further investigate the consequences of this mutation type.

Keywords

ATM, breast cancer

Einleitung

Das bei der Krankheit Ataxia telangiectatica (Louis-Bar-Syndrom, AT) mutierte ATM-Gen kodiert für ein großes Protein von 3056 Aminosäuren und spielt vermutlich bei der Reparatur von strahlungsinduzierten DNA-Schäden eine entscheidende Rolle. Die Inzidenz der AT liegt weltweit ungefähr bei 1:40 000–1:100 000 Lebendgeburten (1,2), die AT-Genträgerfrequenz in den bisher untersuchten Bevölkerungen wird auf etwa 1% geschätzt. In einigen Artikeln von M. Swift et al. (3,4,5) wurde die Hypothese aufgestellt, daß AT-Genträger/-innen ein erhöhtes Krebsrisiko und insbesondere Frauen ein 5–8fach erhöhtes Risiko für Brustkrebs haben. Das erhöhte Brustkrebsrisiko wird durch andere retrospektive und prospektive Studien von AT-Familien in den USA und Europa unterstützt (6,7,8), dennoch ist die Hypothese umstritten (9) und bis heute nicht durch bevölkerungsbezogene Studien gesichert.

Das Ziel des hier vorgestellten Projekts war deshalb die Suche nach Mutationen des ATM-Gens in einem unselektierten Kollektiv an Brustkrebspatientinnen. Unser Untersuchungskollektiv umfasst 190 unselektierte Patientinnen mit einem Mammakarzinom, die in der Abteilung für Strahlentherapie und spezielle Onkologie behandelt wurden und deren Hautreaktion nach postoperativer Bestrahlung und andere klinische Verlaufsdaten systematisch erfasst worden sind (vgl. Bremer et al., S. 57–59).

Methoden

Die Suche nach ATM-Mutationen gliederte sich methodisch in drei Schritte. Zuerst wurden aus der genomischen DNA der Lymphozyten die einzelnen Exons des ATM-Gens mittels der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) amplifiziert. Es folgte eine Einzelstrangkonnformationen (SSCP-) Analyse, mit der Unterschiede in der Nucleotidsequenz eines definierten Genabschnittes aufgrund des abweichenden Wanderungsverhaltens der PCR-Probe bei der elektrophoretischen Auftrennung in einem Polyacrylamidgel festgestellt werden können. Jene PCR-Proben, die auf einem SSCP-Gel ein auffälliges

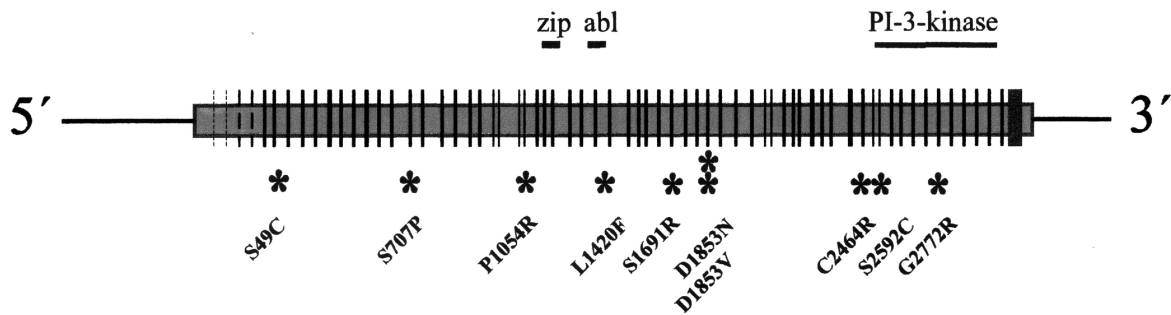


Abb 1
Verteilung der bisher detektierten 10 Aminosäuresubstitutionen im ATM-Gen
Über den 66 Exons sind die Leucin-Zipper-Domäne (Leu), die c-abl-Domäne (abl) und die PI-3-Kinase-Domäne gekennzeichnet.

Tab 1
Lokalisation und Häufigkeit der bis dato unter 190 Brustkrebspatientinnen gefundenen Aminosäuresubstitutionen nach der molekulargenetischen Analyse von 35 der insgesamt 66 Exons des ATM-Gens

Aminosäuresubstitution	Nukleotid-Austausch	Genort	Anzahl (%) der Trägerinnen unter Brustkrebspatientinnen
S2592C	7775C→G	Exon 54	1 (0,005)
G2772R	8214G→A	Exon 59	1 (0,005)
C2464R	7390T→C	Exon 52	2 (0,01)
S49C	146C→G	Exon 5	3 (0,02)
S1691R	5071A→G	Exon 36	3 (0,02)
D1853V	5558A→T	Exon 39	3 (0,02)
S707P	2119T→C	Exon 15	5 (0,03)
P1054R	3161C→G	Exon 24	8 (0,04)
L1420F	4258C→T	Exon 31	9 (0,05)
D1853N	5557G→A	Exon 39	47 (0,28)

Bandenmuster ergeben haben, wurden anschließend sequenziert. Die Sequenzierungen sind nach der Kettenabbruchmethode, teilweise manuell und radioaktiv, zum größten Teil aber fluoreszenzgestützt an einem automatischen Sequenzierer (ABI 310 der Firma Perkin Elmer) durchgeführt worden. Identifizierte Genveränderungen wurden mit einem zweiten, unabhängigen Test in einem Direktverfahren, beispielsweise durch restriktionsenzymatische Spaltung, bestätigt.

Ergebnisse

Nach der molekulargenetischen Analyse von 35 der insgesamt 66 Exons haben wir neben zahlreichen intronständigen Varianten bisher 10 Aminosäuresubstitutionen detektiert. Diese sind über das gesamte ATM-Gen verteilt (Abb1). Drei Missense-Mutationen flankieren die Phosphatidylinositol-3-Kinase-Domäne, und jeweils zwei flankieren die c-Abl-Bindungsstelle bzw. den Leucin-Zipper-Bereich. Bis auf die Substitution S1691R befinden sich alle detektierten Aminosäureänderungen an evolutionär konservierten Positionen (10).

In der Tabelle (Tab 1) sind die gefundenen Aminosäuresubstitutionen ihrer Häufigkeit nach aufgeführt. Alle Patientinnen, die die selteneren Varianten aufweisen (in der Tabelle oben aufgeführt), waren bei Erstdiagnose über 50 Jahre alt und hatten somit ein post-

menopausales Mammakarzinom. Bei keiner der als Trägerin einer Aminosäuresubstitution identifizierten Patientinnen war eine über das übliche Maß hinausgehende adverse Hautreaktion als Bestrahlungsnebenwirkung dokumentiert.

Diskussion

Der Beitrag einer „AT-Heterozygotie“ zur Entwicklung eines Mammakarzinoms ist derzeit umstritten (4,9). Zur Klärung dieser Fragestellung mangelt es bisher an großen Fall-Kontroll-Untersuchungen am unselektierten Patientinnenkollektiv. Im Rahmen unserer Studie an 190 Patientinnen mit Mammakarzinom konnte bisher die Aminosäuresubstitution als vorherrschender Mutationstyp festgestellt werden. Im Kontrast dazu sind bei der kürzlich von Sandoval et al. veröffentlichten molekulargenetischen Analyse von 66 Familien mit klassischem Louis-Bar-Syndrom (11, vgl. S. 20–21) überwiegend Terminationsmutationen detektiert worden. Beim derzeitigen Stand unserer Studie, die allerdings erst etwa die Hälfte der kodierenden Region des ATM-Gens abdeckt, konnte dieser häufigste AT-Mutationstyp unter den von uns untersuchten Brustkrebspatientinnen noch nicht gefunden werden.

Aminosäuresubstitutionen kommen als für AT ursächliche Mutationen zwar ebenfalls in Betracht, doch sind sie

bei Patienten mit Louis-Bar-Syndrom in der Minderheit. Zur endgültigen Klassifizierung von Aminosäuresubstitutionen bedarf es daher weiterführender Untersuchungen im Einzelfall, bevor Patientinnen mit Mammakarzinom als „AT heterozygot“ eingestuft werden. Es wird u.a. wichtig sein, die von uns gefundenen Aminosäuresubstitutionen in einem größeren Kollektiv zu untersuchen, um zu einer signifikanten klinischen Auswertung zu kommen. Weiterhin sind Expressions- und Funktionsstudien der ATM-Missensemutationen in vitro erforderlich, damit bewiesen werden kann, ob die einzelnen ATM-Varianten eine krankheitsverursachende Mutation oder einen wirkungsneutralen Polymorphismus darstellen. Erst nach Abschluß dieser Assoziationsstudien und Funktionsanalysen kann eine Aussage darüber getroffen werden, ob und mit welchem relativen Risiko eine „AT-Heterozygotie“ im bevölkerungsweiten Maßstab für die Entwicklung eines Mammakarzinoms prädisponiert.

Literatur

1. Sedgwick RP, Boder E (1991) Ataxia-telangiectasia. In de Jong JMBV (ed.), Handbook of Clinical Neurology. Hereditary Neuropathies and Spinocerebellar Atrophies. Elsevier Science, Amsterdam, The Netherlands. Vol. 16 (60), Chapter 26: 347-423.
2. Gatti RA, Boder E, Vinters HV, Sparkes RS, Norman A, Lange K. (1991) Ataxia-telangiectasia: an interdisciplinary approach to pathogenesis. Medicine 70: 99-117.

3. Swift M, Reitnauer PJ, Morell D, Chase CL (1987) Breast and other cancers in families with ataxia-telangiectasia. *N Engl J Med* 316: 1289-1294.
4. Swift M, Morell D, Massey RB, Chase CL. Incidence of cancer in 161 families affected by ataxia-telangiectasia. *N Engl J Med* 1991; 325: 1831-1836.
5. Morell D, Chase CL, Swift M (1990) Cancers in 44 families with ataxia-telangiectasia. *Cancer Genet Cytogenet* 50: 119-123.
6. Pippard EC, Hall AJ, Barker DJ, Bridges BA (1988) Cancer in homozygotes and heterozygotes of ataxia-telangiectasia and xeroderma pigmentosum in Britain. *Cancer Res* 48: 2929-2932.
7. Borresen AL, Andersen TI, Tretli S, Heiberg A, Moller P (1990) Breast cancer and other cancers in Norwegian families with ataxia-telangiectasia. *Genes Chrom Cancer* 2: 339-403.
8. 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.
9. Fitzgerald MG, Bean JM, Hedge 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. *Nat Genet* 15: 307-310.
10. Pecker I, Avraham KJ, Gilbert DJ, Savitsky K, Rotman G, Harnik R, Fukao T, Schröck E, Hirotsumi S, Tagle DA, Collins FS, Wynshaw-Boris A, Ried T, Copeland NG, Jenkins NA, Shiloh Y, Ziv Y (1996) Identification and chromosomal localization of *Atm*, the mouse homolog of the ataxia-telangiectasia gene. *Genomics* 35: 39-45.
11. Sandoval N, Platzer M, Rosenthal A, et al. (1999) Characterization of ATM gene mutations in 66 ataxia-telangiectasia families. *Hum Mol Genet* 8: 69-79.