

Kapitel 17

Komplementationsgruppenbestimmung bei Fanconi-Anämie mit Hilfe retroviraler Vektoren

Detlev Schindler¹

Helmut Hanenberg²

¹Institut für Humangenetik, Universität Würzburg

²Klinik für Kinder-Onkologie, -Hämatologie und -Immunologie,
Zentrum für Kinder- und Jugendmedizin,
Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf

Komplementation und Komplementationsgruppen

Bis heute wurden elf Fanconi-Anämie (FA)-Komplementationsgruppen definiert, die mit den Buchstaben A, B, C, D1, D2, E, F, G, I, J und L gekennzeichnet sind. Wahrscheinlich existieren darüber hinaus weitere Gruppen, nachdem einige wenige Patienten sich keiner der bekannten elf Komplementationsgruppen zuordnen lassen.

Für die neun Komplementationsgruppen FA-A, FA-B, FA-C, FA-D1, FA-D2, FA-E, FA-F, FA-G und FA-L konnte jeweils ein Gen (*FANCA* bis *FANCL*) identifiziert werden, das bei Patienten der betreffenden Komplementationsgruppe Veränderungen (Mutationen) aufweist und daher funktionsuntüchtig ist. Deshalb nimmt man an, dass jeder Komplementationsgruppe ein einzelnes, jeweils unterschiedliches, defektes Gen zugrunde liegt.

Umgekehrt sind Defekte in einem bestimmten FA-Gen maßgeblich verantwortlich dafür, dass der betreffende Patient der jeweiligen Komplementationsgruppe angehört. Erstaunlicherweise ist das Krankheitsbild unter FA-Patienten trotz unterschiedlicher Defekte in acht, wahrscheinlich mindestens zehn

verschiedenen Genen bei den Angehörigen aller dieser Komplementationsgruppen sehr ähnlich. Lediglich eine Komplementationsgruppe unterscheidet sich deutlich. Die Patienten der Komplementationsgruppe FA-D1 sind bis auf eine Ausnahme vor dem sechsten Lebensjahr an mindestens einem Tumor erkrankt und früh gestorben. Bei dieser Untergruppe ist das Gen *FANCD1* defekt, das seit 1996 als Brustkrebsgen-2 (*BRCA2*) bekannt ist, aber erst 2002 als FA-Gen identifiziert wurde.

Herkömmliche Komplementationsanalyse

Die klassische Komplementierung beruht auf der Tatsache, dass in Zellen einer bestimmten Komplementationsgruppe (z. B. FA-A) nur das jeweilige FA-Gen (z. B. *FANCA*) und das zugehörige Protein defekt sind, alle anderen FA-Gene bzw. -Proteine aber normal (Abb. 1).

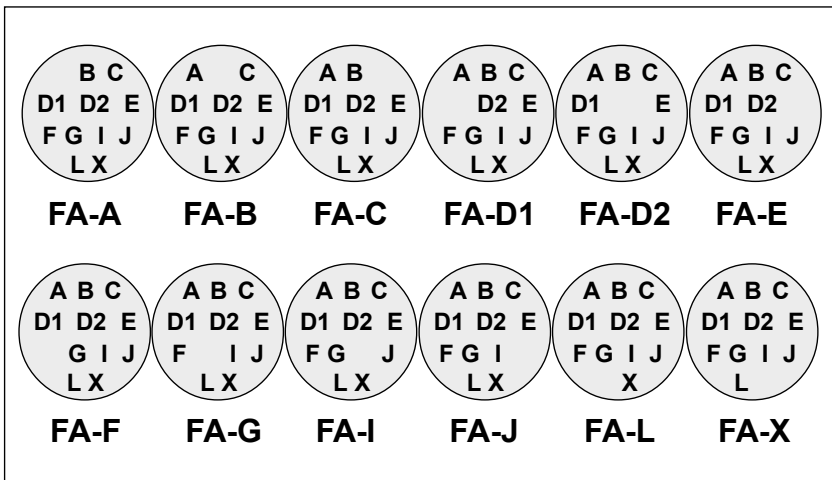


Abb. 1: Schematische Darstellung der FA-Gen-Defekte in Zellen von Patienten unterschiedlicher Komplementationsgruppen. Bei jeder der elf bekannten (FA-A bis -L) bzw. einer unbekanntem Komplementationsgruppe ist genau das FA-Gen funktionsuntüchtig, das der entsprechenden Komplementationsgruppe zugrunde liegt, während die übrigen normal sind.

Dadurch wird bei einer Verschmelzung von beispielsweise FA-A- und FA-C-Zellen (Zellfusion) von der FA-A-Zelle das *FANCC*-Gen und von der FA-C-Zelle das *FANCA*-Gen zur Verfügung gestellt, so dass die Vereinigungs-(Hybrid-)Zellen keinen FA-Defekt mehr aufweisen (Abb. 2).

Vereint man hingegen Zellen derselben Komplementationsgruppe (z. B. FA-A mit FA-A), so sind die Fusionszellen auch weiterhin defekt, da keiner der beiden Fusionspartner das fehlende normale FA-Gen (*FANCA*) mit in die Fusionszellen einbringt (Abb. 2). Testet man diese Fusionszellen, so bleiben sie Mitomycin-C (MMC)-überempfindlich im Gegensatz zu Fusionszellen ungleicher Komplementationsgruppen. So kann die betreffende Komplementationsgruppe bestimmt werden.

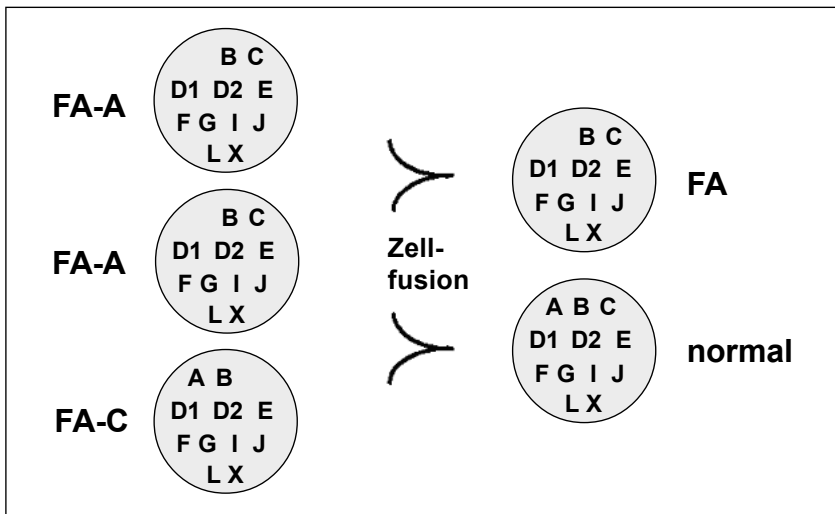


Abb. 2: Prinzip der klassischen Komplementationsgruppenbestimmung mittels Zellfusion. Werden Zellen der gleichen Komplementationsgruppe (z. B. FA-A, oben) vereinigt/fusioniert, weisen die Fusionszellen Defekte in demselben Gen wie die Fusionspartner auf und zeigen weiterhin die typischen FA-Eigenschaften der Überempfindlichkeit gegenüber Mitomycin C und anderen DNA-quervernetzenden Substanzen. Stammen die Fusionszellen von Partnern unterschiedlicher Komplementationsgruppen (FA-A und FA-C, unten), so sind die Fusionszellen normal, da jeder Fusionspartner den FA-Gendefekt des anderen komplementiert.

In herkömmlicher Weise durchgeführte Komplementationsgruppenbestimmung umfasst vier Schritte: erstens die Gewinnung/Etablierung einer im Labor unbegrenzt wachsenden Zelllinie (**lymphoblastoide Linie**) nach EBV-Transformierung von **B-Zellen** aus dem peripheren Blut von Patienten, zweitens die Sicherung der MMC-Überempfindlichkeit dieser Linie, drittens die Verschmelzung von Zellen dieser Linie mit Zellen von elf Referenzlinien und viertens die Testung der MMC-Empfindlichkeit der Vereinigungszellen (somatischen Zellhybride).

Die Herstellung einer unbegrenzt wachsenden Zelllinie aus dem Blut eines Patienten kann gerade bei FA ein sehr mühseliges und langwieriges Unterfangen sein, das leider nicht immer von Erfolg gekrönt ist.

Brauchbar für die weitere Analyse ist eine schließlich etablierte Zelllinie des Patienten aber nur dann, wenn sie noch MMC-überempfindlich ist. Hat sich etwa bei einem FA-Patienten im körpereigenen blutbildenden System ein sogenanntes somatisches Mosaik mit Zellen gebildet, in denen eine Mutation korrigiert ist und die somit MMC-resistent geworden sind, so ist auch eine im Labor etablierte Linie dieses Patienten in der Regel nicht mehr MMC-überempfindlich.

Ist dagegen MMC-Überempfindlichkeit gewährleistet, so müssen zur Bestimmung der Komplementationsgruppe bei herkömmlichem Verfahren dann Zellen dieser Patientenlinie nacheinander mit Zellen von Linien aller elf bekannten Komplementationsgruppen vereinigt werden. Die Vereinigungszellen müssen in Kultur wachsen und für jede einzelne Fusion auf ihre MMC-Überempfindlichkeit hin geprüft werden. Dieses Verfahren dauert bestenfalls Monate.

Sollte der noch nicht zugeordnete Patient einer der elf Komplementationsgruppen angehören (z. B. FA-A), so sind die Fusionszellen in zehn (FA-A plus FA-B, FA-A plus FA-C, FA-A plus FA-D1, FA-A plus FA-D2, FA-A plus FA-E, FA-A plus FA-F, FA-A plus FA-G, FA-A plus FA-I, FA-A plus FA-J, FA-A plus FA-L) von elf Fällen normal. Sie haben ihre FA-spezifischen Eigenschaften und damit ihre Überempfindlichkeit gegenüber MMC verloren (Abb. 2).

Nur wenn Zellen des betreffenden Patienten mit Zellen der gleichen Komplementationsgruppe fusioniert werden (z. B. FA-A mit FA-A), so zeigen die Fusionszellen noch die typischen FA-Eigenschaften. Sollte ein Patient dagegen einer bisher unbekannt Komplementationsgruppe angehören, so sind die Fusionszellen bei Vereinigung mit Zellen der bekannten elf Komplementationsgruppen immer normal.

Der Umstand, dass Komplementationsgruppenbestimmungen mittels Zellfusion in hohem Maße zeit- und arbeitsaufwendig sind, und dass ein solch langwieriges Verfahren vielfältigen möglichen Störeinflüssen unterworfen ist, hat dazu geführt, nach Alternativen zu suchen.

Retrovirale Komplementationsgruppenbestimmung

Eine neuere Methode der Komplementationsanalyse benutzt künstlich hergestellte retrovirale Vektoren, um jeweils spezifisch ein FA-Gen in die Zellen eines FA-Patienten mit noch nicht zugeordneter Komplementationsgruppe einzubringen. Der prinzipielle Unterschied zwischen Komplementation durch Zellfusion und retroviraler Komplementation besteht in Folgendem: Bei der Komplementationsanalyse durch Zellfusion werden in FA-Zellen einer noch nicht zugeordneten Komplementationsgruppe mit dem Fusionspartner, das sind Zellen einer FA-Referenzlinie, immer alle FA-Gene außer einem übertragen. Es wird nach dem aussagekräftigen negativen Fall gesucht, bei dem durch den Fusionspartner keine Komplementation vermittelt wird. Bei der retroviralen Komplementationsanalyse wird immer nur ein FA-Gen pro Ansatz übertragen und es wird der positive Fall gesucht, in dem dieses eine FA-Gen Komplementation vermittelt, d. h. die FA-typischen Eigenschaften der Zellen (MMC-Überempfindlichkeit) korrigiert.

Retrovirale Vektoren, die jeweils eines der bekannten FA-Gene *FANCA* bis *-L* tragen, stehen verschiedenen Arbeitsgruppen, die sich mit FA beschäftigen, zur Verfügung. In Europa wurden von uns verschiedene Retroviren für alle bekannten FA-Gene herge-

stellt – mit einer Ausnahme: Das *FANCD1/BRCA2*-Gen ist so groß, dass es in keinen normalen retroviralen Vektor hineinpasst. Hier hat man andere Möglichkeiten entwickelt, Defekte dieses Gens nachzuweisen.

Mit Hilfe dieser künstlichen Retroviren werden die bisher isolierten FA-Gene *FANCA*, *FANCB*, *FANCC*, *FANCD2*, *FANCE*, *FANCF*, *FANCG* und *FANCL* im Labor in Zellen eines Patienten noch nicht zugeordneter Komplementationsgruppe eingebracht. Nur eines der retroviral übertragenen FA-Gene kann die FA-Eigenschaften der Patientenzellen (MMC-Überempfindlichkeit) korrigieren/normalisieren, nämlich die gesunde Kopie desjenigen Gens, das beim Patienten defekt ist (Abb. 3).

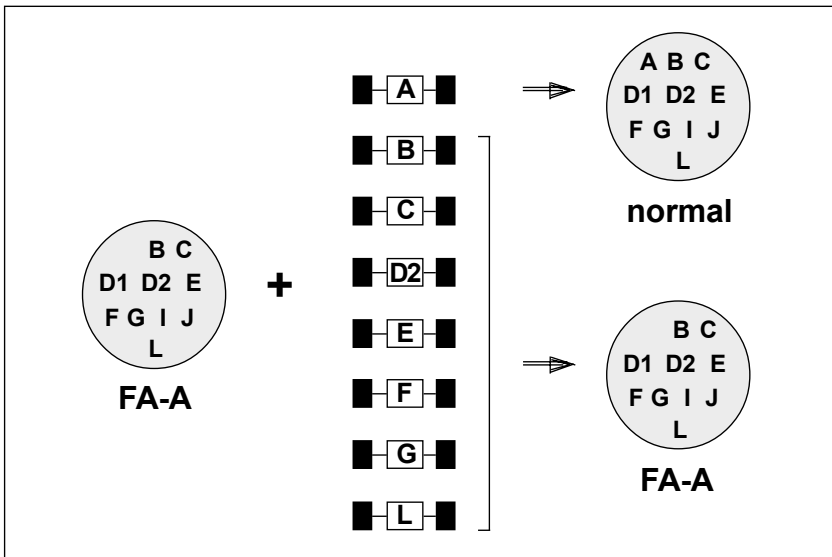


Abb. 3: Prinzip der Komplementation mittels retroviraler Vektoren.

In Zellen der Komplementationsgruppe FA-A bringt ein retroviraler Vektor eine intakte Kopie des FA-Gens ein, das in den Zellen defekt ist (*FANCA*, oben). Die Zellen werden korrigiert. Die anderen Retroviren übertragen Gene, die in den Zellen nicht defekt sind (*FANCB/C/D2/E/F/G/L*, unten). Die Zellen werden daher nicht korrigiert.

Korrigiert keines der retroviral in die Zellen eingeführten Gene die Zellen, so gehört der Patient zu den Komplementations-

gruppen FA-D1, FA-I und FA-J oder zu einer neuen noch nicht definierten Gruppe. Zur schnelleren Prüfung der MMC-Überempfindlichkeit benutzen wir als automatisiertes Analyseverfahren oft die Durchflusszytometrie, mit der in weniger als einer Minute Tausende bis Zehntausende an Zellen gemessen und dann ausgewertet werden.

Retrovirale Komplementationsanalyse kann an **Lymphozyten (T-Zellen)** durchgeführt werden, die direkt aus einer Blutprobe (1-4 ml) eines Patienten noch nicht zugeordneter Komplementationsgruppe isoliert werden. Es ist also nicht mehr erforderlich, dass in jedem Falle zuerst eine lymphoblastoide Patientenzelllinie angelegt wird. Selbstverständlich kann retrovirale Komplementationsanalyse auch mit Zellen einer **lymphoblastoiden B-Zelllinie** durchgeführt werden, sofern eine solche Linie ohnehin zur Verfügung steht oder aus anderen Gründen angelegt wird.

Komplementationsanalysen lassen sich auch mit **CD34-positiven Zellen** (CD34+ Zellen) aus dem Knochenmark oder nach deren Mobilisation mit G-CSF aus dem peripheren Blut durchführen. Diese Zellen sind z. T. noch sehr unreif und werden klinisch zur Stammzelltransplantation eingesetzt. In Zellkultur bildet der größte Teil der CD34+ Zellen, ausgehend von einer einzelnen Zelle, innerhalb von 14 Tagen unter geeigneten Wachstumsbedingungen kleine Kolonien von bis zu mehreren hundert Zellen. In diese isolierten CD34+ Zellen können mittels retroviraler Vektoren die einzelnen FA-Gene eingebracht werden. Es kann dann in Kultur getestet werden, ob eines der FA-Gene die Koloniebildung der CD34+ Zellen in Gegenwart von MMC überhaupt ermöglicht bzw. vergleichbar mit den von gesunden Personen gewonnenen CD34+ Zellen macht.

Ferner möglich ist die retrovirale Komplementationsanalyse an **Fibroblasten**, also Bindegewebszellen aus Kulturen einer Hautbiopsie. Fibroblasten-ähnliche Zellen für diese Untersuchungen können auch aus dem Knochenmark oder vorgeburtlich aus Amnionflüssigkeit (Fruchtwasser) gewonnen werden. Anhand der Untersuchung von Fibroblasten wird eine Komplementationsanalyse insbesondere auch bei FA-Patienten möglich, die sich in

der Vergangenheit erfolgreich einer Knochenmarktransplantation unterzogen haben und deren Blutzellen somit normal sind.

Bei Patienten mit komplettem Mosaik konnte die Komplementationsgruppe in der Vergangenheit mit Routinetechniken nicht festgestellt werden; sie wurden als MMC-resistent klassifiziert (etwa 15% aller FA-Patienten). Bisher ist noch nie beobachtet worden, dass ein somatisches Mosaik (MMC-Resistenz durch Selbstkorrektur einer Mutation in blutbildenden Zellen) auch in Fibroblasten auftritt. Deshalb kann mittels retroviraler Komplementationsanalyse nun die Komplementationsgruppe aller FA-Patienten bestimmt werden, wenn es sich als notwendig erweist eben aus Fibroblasten aus der Haut.

Bisherige Ergebnisse und Erfahrungen

Bisher haben wir in mehr als 150 Fällen retrovirale Komplementationsuntersuchungen an T-Zellen aus dem peripheren Blut durchgeführt und in mehr als 80% der Fälle innerhalb von zwei bis drei Wochen die Patienten den Gruppen FA-A, FA-B, FA-C, FA-E, FA-F, FA-G, FA-L und FA-nonABCEFG zuordnen können. Somit ist es mit Hilfe der retroviralen Komplementationsanalyse möglich, innerhalb des ersten Monats nach Diagnose der FA auch die Untergruppe bei mehr als 4/5 der Patienten festzustellen, so dass ggf. bei weiterem Kinderwunsch die Mutationen in dem betroffenen Gen auch zeitnah zur Verfügung stehen können. Die Nutzung von T-Zellen aus dem peripheren Blut zur Komplementationsgruppenanalyse hat allein den Nachteil, dass diese Untersuchungen immer sofort durchgeführt werden müssen und die Zellen nach den drei Wochen in Kultur nicht mehr weiter verwendet werden können.

Für eine Wiederholung der Analysen muss erneut Blut des Patienten angefordert werden. Deshalb werden parallel zur Komplementationsanalyse aus T-Zellen lymphoblastoide Zelllinien angelegt, die späteren wiederholenden oder bestätigenden Analysen dienen. Bei knapp 15% der Patienten bringt die retro-

virale Komplementation kein Ergebnis, da die T-Zellen ein Mosaik ausgebildet haben und somit keine FA-typischen Eigenschaften (MMC-Überempfindlichkeit) mehr aufweisen.

Bei Untersuchungen an mehr als 200 lymphoblastoiden Linien mussten wir feststellen, dass von ihnen ein noch erheblicherer Anteil als von den T-Zellen (über 20%) MMC-resistent war, obwohl nur ein Teil der Patienten wirklich ein Mosaik im Blutsystem aufwies. Diese Linien können also manchmal auch in Kultur MMC-resistent werden. Lymphoblastoide Linien, die FA-typische Eigenschaften besaßen, konnten sehr gut für die retrovirale Komplementationsanalysen genutzt werden, da sie ohne Stimulation kontinuierlich und unbegrenzt wachsen.

Bei Untersuchungen an mehr als 130 Fibroblastenstämmen von FA-Patienten konnten wir feststellen, dass diese Untersuchungen an den adhärennten Zellen zwar in hohem Maße zeit- und materialaufwendig sind, aber bei mehr als 95% der Patienten zu einem eindeutigen Ergebnis führten. Deshalb waren die Fibroblastenuntersuchungen für uns ein sehr wichtiges Instrument, um verlässliche Aussagen über die Häufigkeit von Mosaiken treffen zu können.

Stellenwert retroviraler Vektoren und Analysen

Retrovirale Vektoren, wie sie für die FA-Komplementationsanalyse eingesetzt werden, sind von natürlichen Retroviren zumeist der Maus (z. B. Maus-Leukämievirus, MLV) abgeleitete Konstrukte, die mit molekulargenetischen Methoden soweit entschärft wurden, dass sie praktisch kein Sicherheitsrisiko beinhalten und gefahrlos unter bestimmten standardisierten Bedingungen angewendet werden können. Ihr Einsatz ist allerdings auf Laboratorien mit Sicherheitsvorkehrungen nach der Gentechniksicherheitsverordnung beschränkt.

Obwohl es sich also hierbei um gentechnisch veränderte künstliche Retroviren handelt, sollte man Sicherheitsbedenken nicht überbewerten und sich vor Augen halten, dass es sich bei den retroviralen Vektoren für die Komplementationsanalyse im La-

bor grundsätzlich um die gleichen Vektoren handelt, mit denen Gentherapiestudien bei FA-Patienten begonnen wurden, d. h. die beim Menschen klinisch eingesetzt wurden.

Abwägung der Vor- und Nachteile beider Methoden der Komplementationsgruppenbestimmung bei FA-Patienten lässt deutliche *Vorteile* der retroviralen Komplementationsanalyse in Hinblick auf Schnelligkeit, geringere Störanfälligkeit und Durchführbarkeit an unterschiedlichen Zelltypen und durch verschiedene Zentren erkennen. Der wesentliche *Nachteil* der retroviralen Komplementationsanalyse liegt darin, dass mit dieser Methode nur FA-Patienten positiv klassifiziert werden können, für deren Komplementationsgruppe das verantwortliche FA-Gen zuvor isoliert worden ist, damit es in retrovirale Vektoren eingesetzt werden konnte.

Bei den zunehmend selteneren Fällen (<5%) unbekannter bzw. undefinierter FA-Komplementationsgruppen hat die klassische und sehr aufwendige Komplementationsgruppenzuordnung durch somatische Zellhybride (Zellfusion) weiterhin ihre Bedeutung, insbesondere für wissenschaftliche Fragestellungen. Allerdings werden sich die Möglichkeiten der retroviralen Komplementationsanalyse dem Fortschritt anpassen und jedes neu isolierte FA-Gen wird - sofern es nicht zu groß ist (wie *FANCD1/BRCA2*) oder toxische Wirkung in Zellen hat - innerhalb kurzer Zeit auch in retroviralen Vektoren zur Verfügung stehen.

Ob es konstante Unterschiede im Verlauf der Erkrankung zwischen FA-Patienten gibt, die verschiedenen Komplementationsgruppen angehören, ist mit Ausnahme der FA-D1/BRCA2-Patienten im Moment noch nicht sicher zu sagen. Überlagert wird die Zugehörigkeit zu einer bestimmten Komplementationsgruppe nämlich durch die Vielzahl unterschiedlicher Mutationen, die innerhalb jeder Gruppe für erhebliche Variabilität der Symptome sorgen.

Eine schnelle und eindeutige Komplementationsgruppenzuordnung ist allerdings eine notwendige Voraussetzung dafür, dass bei Patienten überhaupt Mutationsanalysen im betroffenen FA-Gen effektiv durchgeführt werden können (vgl. Kapitel 18). Nur auf dieser Basis sind Untersuchungen zwischen Krankheits-

verlauf, Komplementationsgruppenzugehörigkeit und spezifischer Mutation möglich, die unter Umständen in der Zukunft allgemeine Voraussagen über den voraussichtlichen Krankheitsverlauf bei manchen FA-Patienten gestatten.

Notwendig ist eine schnelle und verlässliche Komplementationsgruppenzuordnung für Familien, für die pränatale Diagnostik eine wichtige Entscheidungshilfe für die weitere Familienplanung darstellt. Individuell notwendig ist die Kenntnis der Komplementationsgruppenzugehörigkeit auch für die Planung einer Teilnahme an zukünftigen Gentherapiestudien, vorausgesetzt Gentherapie kann zu einer echten Behandlungsmethode mit Aussicht auf Heilung bzw. zumindest lang anhaltende Besserung der klinischen Symptomatik entwickelt werden. Zellen von Patienten schließlich, die sich nicht klassifizieren lassen, sind wichtig für die Suche nach eventuell noch undefinierten Komplementationsgruppen und unbekanntem FA-Genen.

Die hier dargestellte methodische Weiterentwicklung der FA-Komplementationsanalyse mittels retroviraler Vektoren trägt dem Bedürfnis vieler Patienten und betroffener Familien Rechnung, möglichst früh ihre Komplementationsgruppenzugehörigkeit zu erfahren. Sie trägt auch der Notwendigkeit Rechnung, die Kapazität der Diagnostik in diesem Bereich erweitern und die Suche nach den Mutationen in dem betroffenen FA-Gen bei mehr als 80% der Patienten möglichst schnell einleiten zu können.

Die zukünftige Entwicklung könnte dahin gehen, jedem FA-Patienten bereits mit oder kurz nach Diagnosesicherung seine zugehörige Komplementationsgruppe mitzuteilen. Die retrovirale Komplementationsanalyse, die innerhalb von zwei bis drei Wochen bei der Mehrzahl der neu diagnostizierten Patienten die Komplementationsgruppe bestimmen kann, hat vor diesem Hintergrund in kürzester Zeit ihren zentralen Platz in der FA-Diagnostik einnehmen können und ihre wissenschaftliche Bewährung durch kontrollierte Untersuchungen mit unseren Vektoren an fast 300 europäischen Patienten erfolgreich bestanden. Inwieweit diese Untersuchungen als Routineleistung in den Leistungskatalog der Krankenkassen mit aufgenommen werden können, muss allerdings die Zukunft zeigen.

Technischer Ablauf erweiterter FA-Diagnostik

Der im Folgenden dargestellte Ablauf diagnostischer Maßnahmen bei Verdacht auf FA (Abb. 4) beruht auf den optimierten Vorgehensweisen, die sich zwischen unseren Labors in Würzburg und Düsseldorf in den letzten Jahren erfolgreich eingespielt haben.

Von einem Patienten mit der Verdachtsdiagnose FA wird eine Heparin-Blutprobe von 8 ml an Prof. Dr. Schindler, Institut für Humangenetik, Biozentrum, Am Hubland, 97074 Würzburg, eingeschickt. Erscheint aufgrund der beigelegten klinischen Angaben die Verdachtsdiagnose FA wahrscheinlich, werden 2 ml der Blutprobe an PD Dr. Hanenberg, Labor für Stammzelltransplantation und Experimentelle Hämatologie, Kinderklinik, Heinrich-Heine-Universität, Moorenstr. 5, 40225 Düsseldorf, weitergeleitet, wo sie am nächsten Tag eintreffen.

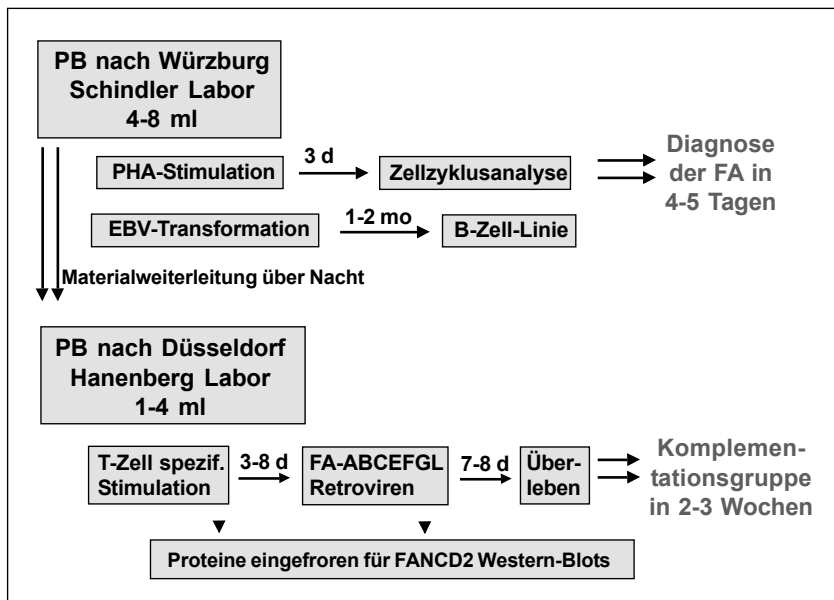


Abb. 4: optimierter Algorithmus der diagnostischen Maßnahmen bei Verdacht auf FA in Würzburg und Düsseldorf. Die Einzelheiten sind im Text näher erläutert. Folgende Abkürzungen wurden verwendet: PB = Peripheres Blut (heparinisiertes Venenblut), ml = Milliliter (Volumeneinheit), PHA = Phyt hämagglutinin, EBV = Ebstein-Barr-Virus, d = Tage, mo = Monate.

In *Würzburg* werden aus den verbleibenden 6 ml die mononukleären Zellen isoliert und dann ein Teil der Zellen für die Diagnosesicherung der FA mit Phythämagglutinin (PHA) stimuliert. Der Rest der Zellen wird mit Epstein-Barr-Virus infiziert und die Zellen in Kultur genommen, um eine lymphoblastoide Linie zu etablieren. Zu einem Teil der PHA-stimulierten T-Zellen aus dem peripheren Blut wird MMC dazugegeben und die Zellen werden dann nach insgesamt drei Tagen geerntet. Mittels durchflusszytometrischer Zellzyklusanalyse wird am nächsten oder übernächsten Tag die Verdachtsdiagnose FA geprüft. *Diese initiale Diagnostik dauert 4-5 Arbeitstage.* Die Etablierung der lymphoblastoiden Zelllinie des neuen FA-Patienten nimmt ein bis zwei Monate in Anspruch. Sollte beim Patienten keine FA vorliegen, werden die Kulturen zur Etablierung einer lymphoblastoiden Linie nach den anfänglichen Messungen vernichtet.

In *Düsseldorf* werden aus den 2 ml Blut die mononukleären Zellen isoliert und dann die T-Zellen spezifisch mittels der Antikörper CD3 und CD28 für 3-8 Tage vermehrt. In dieser Zeit wird in *Würzburg* die Diagnose FA bestätigt oder ausgeschlossen. Bei positiver Diagnose wird ein Teil der T-Zellkultur für spätere Analysen, wie FANCD2- und BRCA2-Western-Blots, tiefgefroren. Dann erfolgt die Infektion der restlichen T-Zellen mit Retroviren, die die Gene *FANCA*, *FANCB*, *FANCC*, *FANCE*, *FANCF*, *FANCG* und *FANCL* tragen. Zwei Tage später werden die Zellen geerntet und für 4-6 Tage mit sechs unterschiedlichen MMC-Konzentrationen inkubiert. Nach dem Ernten der Zellen wird für jedes Virus in sieben verschiedenen Messungen mit jeweils 10.000 bis 20.000 analysierten Zellen pro Retrovirus der Anteil der überlebenden T-Zellen bestimmt.

Aus den Überlebenskurven der T-Zellen wird zum einen die Diagnose FA bestätigt. Hauptziel ist aber Komplementationsgruppenzuordnung. Sollte der Prozentsatz der überlebenden Zellen in einer Messreihe deutlich von den Übrigen abweichen (zum Beispiel für das *FANCA*-Retrovirus LFA, Abb. 5), so hat das mittels Retrovirus in die Zelle eingebrachte normale FA-Gen die T-Zellen des Patienten komplementiert. Somit gehört dieser Patient zur betreffenden Komplementationsgruppe und hat Mutationen in dem jeweiligen Gen (im Beispiel FA-A und *FANCA*).

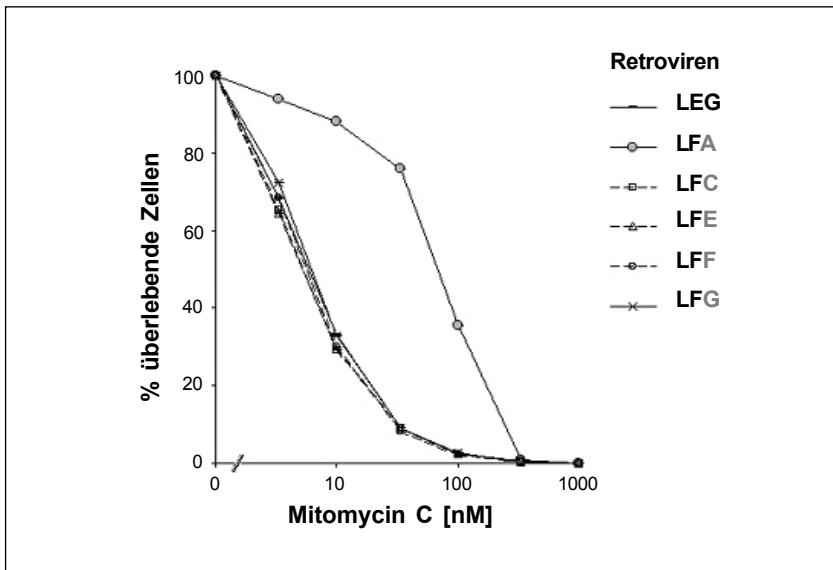


Abb. 5: Beispiel einer erfolgreichen Komplementation bei einem neu diagnostizierten Patienten mit einem *FANCA*-exprimierenden Retrovirus in T-Zellen. Die Einzelheiten sind im Text näher erläutert. Folgende Abkürzungen wurden verwendet: *LEG* = Retroviraler Vektor mit einem grün fluoreszierenden Kontroll-Gen (*GFP*), *LFA/LFC/LFE/LFF/LFG* = retrovirale Vektoren mit *FANCA/C/E/F/G*; *nM* = nanomolar (Konzentration in Nanomol pro Liter).

Diese initiale Komplementationsanalyse dauert zwei bis drei Wochen. In ca. 15% der Fälle werden die T-Zellen des Patienten mit keinem der retroviralen Vektoren komplementiert. Dann werden von uns weitere Untersuchungen mit einem *FANCD2*-Retrovirus an der lymphoblastoiden Linie oder an Hautfibroblasten durchgeführt. In Würzburg werden zusätzlich Proteinanalysen der beiden Gene *FANCD1/BRCA2* und *FANCD2* vorgenommen.

Die auch dann nicht klassifizierbaren Patienten haben einen Defekt in einem bisher nicht bekannten FA-Gen. Ihre Zellen sind Gegenstand von wissenschaftlichen Bemühungen, um in unseren beiden Labors in Würzburg und Düsseldorf noch unbekannte FA-Gene zu finden.