

Aus dem Institut für Humangenetik
der Universität Würzburg
Vorstand: Prof. Dr. med. Holger Höhn

Gentherapie bei Fanconi Anämie
Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von
Christine Höfling
aus Würzburg

Würzburg im Dezember 2007

Referentenblatt

Referent: Prof. Dr. med. Holger Höhn

Koreferent: Prof. Dr. med. Detlev Schindler

Dekan: Prof. Dr. med. M. Frosch

Tag der mündlichen Prüfung :
19.02.2008

Die Promovendin ist Ärztin

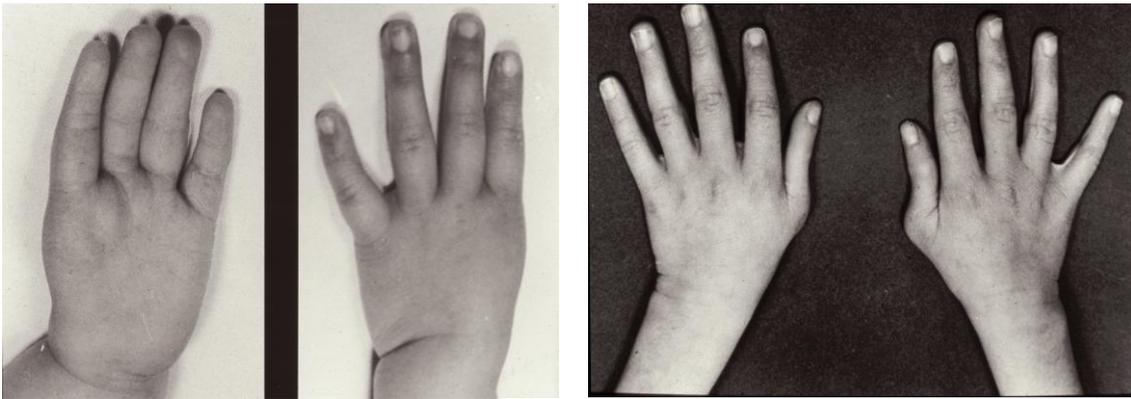
Inhaltsverzeichnis

I. Einleitung.....	Seite 1
1. Klinisches Bild.....	Seite 1
2. Gene.....	Seite 3
3. Bisherige Therapieansätze.....	Seite 8
4. Somatische Reversion und Fragestellung.....	Seite 11
II. Methoden.....	Seite 13
1. Prinzipien der Gentherapie.....	Seite 13
2. Vektoren.....	Seite 14
3. Transduktion in vitro, ex vivo, in vivo.....	Seite 17
III. Ergebnisse.....	Seite 17
1. in vitro: Komplementationsanalysen.....	Seite 17
2. in vivo: FA-Tiermodelle.....	Seite 25
3. ex vivo/in vivo: bisherige Studien bei FANCC und FANCA.....	Seite 27
IV. Diskussion.....	Seite 33
1. Voraussetzungen zur Durchführung der Gentherapie.....	Seite 33
2. Risiken und Probleme.....	Seite 35
3. Bisherige Erfolge/Misserfolge bei Fanconi Anämie.....	Seite 36
4. Schlussfolgerungen und Ausblick.....	Seite 38
V. Zusammenfassung.....	Seite 40
VI. Abstract.....	Seite 42
VII. Literaturverzeichnis.....	Seite 44
VIII. Danksagung	
IX. Lebenslauf	

I. Einleitung

I. 1. Klinisches Bild

Bei Fanconi Anämie handelt es sich um eine rezessiv vererbte Multisystem-Erkrankung, die mit erhöhter spontaner Chromosomenbrüchigkeit, sowie erhöhter Anfälligkeit für toxische Substanzen, wie Mitomycin C (MMC) oder Diepoxybutan (DEB) einhergeht. Bereits im Kindesalter kommt es zu Knochenmarkversagen mit zunehmender Panzytopenie, was sich klinisch als erhöhte Blutungsneigung und Infektanfälligkeit manifestiert. Mehr als 50% der Patienten zeigen einen auffälligen Kleinwuchs, der sich bereits bei Geburt durch ein zu niedriges Geburtsgewicht, sowie Mikrozephalie und Mikrophtalmie äußert. Auch in der Folge bleibt die Körperlänge dieser kleinwüchsigen Kinder meist unter der 3. Percentile. Ca. 70% der Patienten weisen Fehlbildungen der Daumen und Arme im Sinne von fehlenden, hypoplastischen, überzähligen oder gespaltenen Daumen bzw. hypoplastischen oder fehlenden Radii auf. Ebenso zeigen sich auch andere Skelettfehlbildungen, wie z.B. angeborene Hüftanomalien, Fehlbildungen der Wirbelsäule, Skoliose oder Auffälligkeiten der Rippen. Jedoch finden sich nicht nur Fehlbildungen am Skelettsystem, sondern auch an inneren Organen, bei denen strukturelle renale Fehlbildungen (z.B. Hufeisenniere) im Vordergrund stehen. Differentialdiagnostisch von Bedeutung ist das Auftreten von Pigmentierungsstörungen der Haut im Sinne von Café au lait Flecken, die insbesondere am Rumpf, aber auch im Halsbereich und an den Extremitäten gefunden werden. Auch im Gastro-Intestinal-Trakt kann es zu Fehlbildungen (insbesondere Atresien) im Bereich des Magens, des Ösophagus oder des Darms kommen, die gegebenenfalls direkt nach der Geburt operativ korrigiert werden müssen. Bis zu ein Drittel der Patienten weist Fehlbildungen im Bereich des Ohres auf, die zu mehr oder weniger starken Einschränkungen der Hörfähigkeit und damit auch zu Lernschwierigkeiten führen können.



Fanconi Anemia

Radial ray dysplasia

Missing / hypoplastic thumbs

Surgical correction of missing thumb



Abbildung1: aus Foliensammlung Prof. Schindler / Prof. Hanenberg

Mit zunehmendem Alter der Patienten stellen sich zusätzliche Probleme ein. Die Fertilität kann sowohl bei weiblichen, als auch bei männlichen Patienten erheblich eingeschränkt sein, vereinzelt Schwangerschaften sind allerdings beschrieben. Ebenso steigt mit zunehmendem Lebensalter das Risiko einer Krebserkrankung. Bei Fanconi Anämie-Patienten treten besonders Karzinome im Bereich der Mundhöhle, der oberen Atmungs- und Verdauungsorgane, sowie (bei Frauen) im Genitalbereich auf. Die Reduktion der Blutzellreihen beginnt zumeist mit einer Thrombopenie. Dann folgen Erythropenie und Leukopenie. Die Lymphozytenwerte bleiben noch am längsten stabil. Zu niedrige Erythrozytenwerte verursachen eine mehr oder weniger ausgeprägte Anämie, niedrige Thrombozytenzahlen führen zu massiven Blutungen und niedrige Leukozyten können schwerwiegende Infektionen auslösen und/oder begünstigen. Neben dem Knochenmarkversagen sind maligne Veränderungen der Blutbildung lebensbedrohlich. Hierzu gehören vor allem das myelodysplastische Syndrom (MDS) oder akute Leukämien, insbesondere die

akute myeloische Leukämie (AML). Die Lebenserwartung von Patienten, die an Fanconi Anämie leiden ist deutlich eingeschränkt und liegt bei knapp über 20 Jahren (1-4).

I. 2. Gene

Bis heute wurden dreizehn Fanconi - Anämie - Komplementationsgruppen (5-9) definiert, die mit den Buchstaben A, B, C, D1, D2, E, F, G, I, J, L, M und N gekennzeichnet sind. Man ist sich allerdings sicher, noch nicht alle Komplementationsgruppen identifiziert zu haben. Für alle Komplementationsgruppen konnte jeweils ein Gen (FANCA bis FANCN) identifiziert werden. In Europa verteilen sich die einzelnen Komplementationsgruppen wie folgt: FA-A 66%, FA-C 10%, FA-G 9%, FA-D1 3%, FA-D2 3%, FA-E 1%, FA-F 1%. FA-L <1%. Die Gene der entsprechenden Komplementationsgruppen weisen bi-allelische Mutationen auf, die zur Funktionseinschränkung bzw. zum Funktionsverlust des jeweiligen Genproduktes führen. Man nimmt an, dass jeder Komplementationsgruppe ein einzelnes, jeweils unterschiedliches, defektes Gen zugrunde liegt. Umgekehrt führt ein defektes FA-Gen dazu, dass der betreffende Patient der jeweiligen Komplementationsgruppe angehört. Trotz unterschiedlicher genetischer Defekte ähneln sich die klinischen Erscheinungsbilder, mit Ausnahme der Komplementationsgruppe FA-D1. Das FA-D1-Gen entspricht dem BRCA2 (breast cancer gene 2)-Gen und führt bereits vor dem 6. Lebensjahr zum Auftreten lebensbedrohlicher Tumorerkrankungen. Patienten mit bi-allelischen Mutationen in diesem Gen haben einen deutlich schwereren Krankheitsverlauf und eine noch stärker reduzierte Lebenserwartung (3).

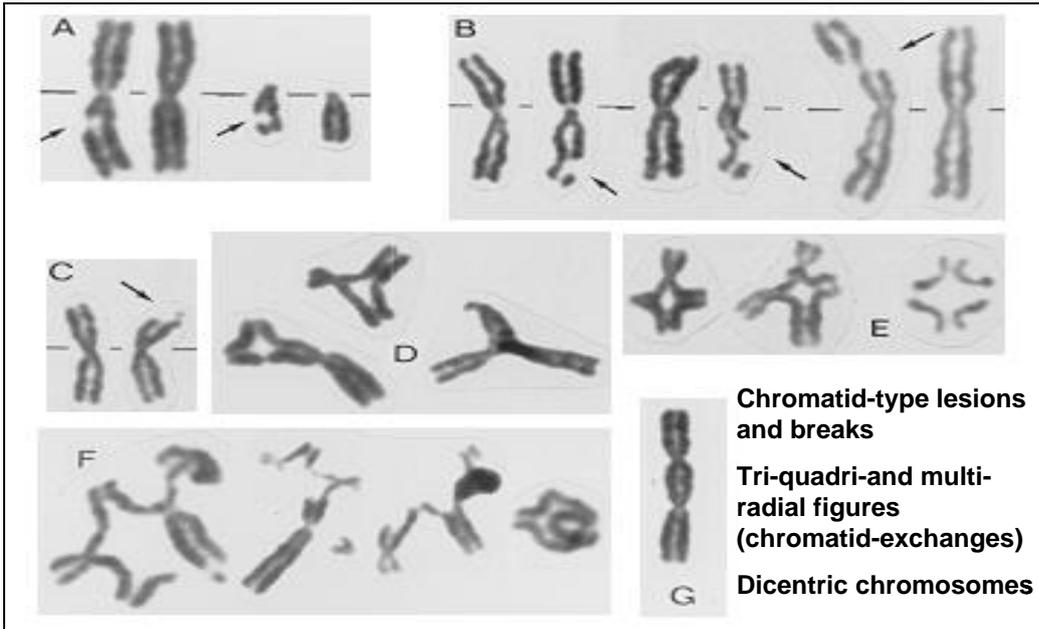


Abbildung 2: Chromosomenbrüchigkeit nach Gabe von MMC.
aus Foliensammlung Prof. Schindler / Prof. Hanenberg

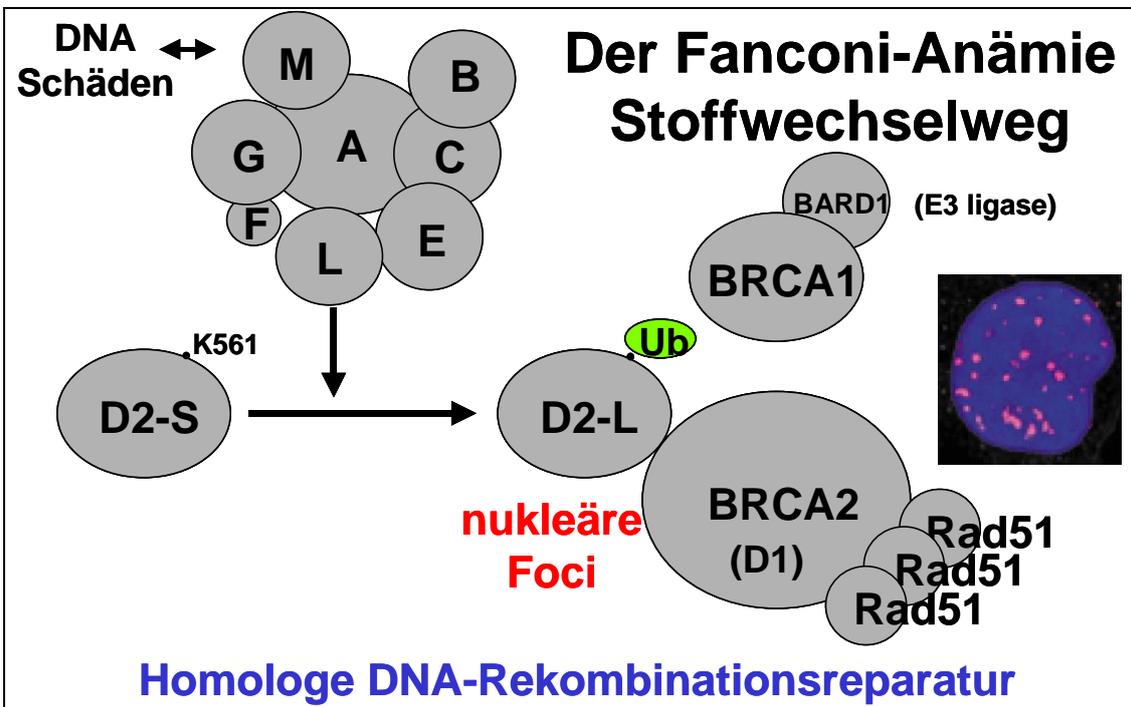


Abbildung 3: Der Fanconi Anämie Stoffwechselweg
aus Foliensammlung Prof. Schindler / Prof. Hanenberg

Mittlerweile hat man die Zusammenarbeit der einzelnen FA-Gene weiter entschlüsselt und im sogenannten „Fanconi-Anemia-Pathway“ zusammengefasst (5).

Man teilt die FA-Gene in drei Gruppen ein:

- I. „FA core complex“ (FANCA, B, C, E, F, G, L, M)
- II. „FA ID complex“ (FANCD2 und FANCI)
- III. „link to cancer“ (FANCD1 oder auch BRCA2, FANCN oder auch PALB2 und FANCI oder auch BRIP1).

Der „FA core complex“ hat als Hauptaufgabe die Mono-Ubiquitinierung von FANCD2 und FANCI.

Der „FA ID complex“ ist mit verantwortlich für die DNA-Reperatur und damit funktionell wichtiger als der „FA core complex“.

Aus folgenden Gründen:

1. Der klinische Phänotyp von Patienten mit FANCD2-Mutation ist generell deutlich ausgeprägter, als bei Patienten mit Mutationen im „core complex. Insbesondere ist hier das frühe Auftreten von hämatologischen Tumoren zu erwähnen.
2. FANCD2 ist essentiell während der körperlichen Entwicklung und eine komplette Inaktivierung könnte tödlich sein.
3. FANCD2-knockout Mäuse zeigen die gleichen körperlichen Fehlbildungen wie der Mensch, im Gegensatz zu Mäusen anderer Komplementationsgruppen.
4. Die Mehrzahl der FA core complex Gene ist in vielen Nicht-Vertebraten nicht vorhanden, im Gegensatz zu FANCD2 und FANCI.

Diese Unterschiede lassen darauf schließen, dass die Ubiquitinierung von FANCD2 durch den FA core complex nicht allein verantwortlich ist für seine Funktion, und dass eine Nicht-Ubiquitinierung von FANCD2 eine wichtige Rolle in der körperlichen Entwicklung und der Tumorentstehung spielt .

Im Gegensatz hierzu steht die III. Gruppe. Diese Proteine haben normale Werte von monoubiquitiniertem FANCD2 nach Auftreten von DNA-Schäden. Hieraus lässt sich schließen, dass diese Proteine entweder den „FA ID complex“ unterwandern oder einem eigenen Weg folgen. Ein wichtiges Merkmal dieser Gruppe ist seine Verbindung zu Brustkrebs: homozygote Mutationen verursachen FA, heterozygote Mutationen prädisponieren Frauen für Brustkrebs. Den ersten Hinweis hierzu gab es, als man das FANCD1-Gen als BRCA2-Gen identifizierte. BRCA1 und BRCA2 sind zwei Haupt-Tumor-Suppressor-Gene. Mutationen in diesen beiden Genen können familiären Brust- und Eierstockkrebs auslösen. Obwohl BRCA1 bei FA-Patienten keine Mutationen aufweist, hat man herausgefunden, dass das „BRCA1-interacting protein BRIP1“ identisch ist mit FANCD1. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass BRCA1 sich mit BRCA2 zusammenschließt und einen Komplex bildet, der sich vom BRCA1-BRIP1-Komplex unterscheidet und BRCA1 wird sowohl von BRCA2 als auch von BRIP1 benötigt, um an die Stelle des DNA-Schadens zu gelangen. Diese Daten unterstreichen eine wichtige Verbindung zwischen FA und Brustkrebs (5).

Die weiteren Verbindungen der FA-Gene mit den DNA-Reparatur-Systemen sind Bestandteil der aktuellen Forschung.

FA genes (synonyms)	Prevalence in FA patients (estimated percentage)	Chromosomal location	Protein size (kDa)	Protein features	Requirement for D2 ubiquitination	Conservation
FANCA	66 %	16q24.3	163	Phosphorylated following DNA damage	+	vertebrate
FANCB	Ca. 2 %	Xp22.31	95	Contains nuclear localization sequence	+	vertebrate
FANCC	10 %	9q22.3	63	-	+	vertebrate
FANCD1 (BRCA2)	Ca. 2 %	13q12-13	380	Contains BRC repeats and an OB-fold DNA binding domain; regulates RAD51	-	Vertebrate, worm
FANCD2	Ca. 2 %	3q25.3	155,162	Monoubiquitylated and phosphorylated following DNA damage	+	Vertebrate, worm, insect, slime mould
FANCE	Ca. 2 %	6p21-22	60	Binds FANCD2; phosphorylated by CHK1 following DNA damage	+	vertebrate
FANCF	Ca. 2 %	11p15	42	-	+	vertebrate
FANCG (XRCC9)	9 %	9p13	68	Contains TPR repeats; phosphorylated following DNA damage	+	vertebrate
FANCI	Ca. 2 %	15q25-26	140,147	A partner for FANCD2; monoubiquitylated and phosphorylated following DNA damage	+	Vertebrate, worm, insect, slime mould
FANCI (BRIP1/BACH1)	Ca. 2 %	17q22-24	140	5'-to-3' DNA helicase; binds BRCA1; phosphorylated following DNA damage	-	Vertebrate, invertebrate, yeast
FANCL (PHF9)	< 0,2 %	2p16.1	43	PHD/ring-finger ubiquitin-ligase activity; contains WD40 repeats	+	Vertebrate, insect, slime mould
FANCM (Hef)	< 0,2 %	14q21.3	250	Contains helicase and endonuclease domains; phosphorylated following DNA damage	+	Vertebrate, invertebrate, yeast, archaea

FANCN (PALB2)	Ca. 2 %	16p12.1	140	An essential partner for BRCA2 stability and nuclear localization	-	Vertebrate
---------------	---------	---------	-----	---	---	------------

Tabelle 1: Merkmale der bisher 13 Fanconi Anämie Komplementationsgruppen
 In Anlehnung an: Emergence of a DNA-damage response network consisting of Fanconi anaemia and BRCA proteins, Weidong Wang, Nature Reviews Genetics, September 2007 (5)

I. 3. Bisherige Therapieansätze

Die Therapie der Fanconi Anämie erfolgt überwiegend symptomatisch, d.h. es werden die klinischen Folgen, jedoch nicht die Ursachen der Krankheit behandelt. Organfehlbildungen an Niere, Verdauungstrakt und Skelettsystem werden gegebenenfalls operativ korrigiert. Ergo- und Physiotherapie schulen und unterstützen die Patienten und ihre Familien im Umgang mit den Einschränkungen im Alltag. Regelmäßige Vorsorgeuntersuchungen helfen eine maligne Entartung rechtzeitig zu erkennen und behandeln zu können. Kommt es zu einer Einschränkung der Knochenmarksfunktion, kann dies ebenfalls in regelmäßigen Laborkontrollen und Knochenmarksbiopsien festgestellt werden. Zur Behandlung der Folgen der Knochenmarksdepression stehen eine Reihe von Therapieoptionen zu Verfügung: Transfusionsbehandlungen, Antibiotika, medikamentöse Therapie mit Androgenen und Kortikoiden sowie die Gabe synthetischer Wachstumsfaktoren wie z.B. Zytokinen, insbesondere der Wachstumsfaktor G-CSF. Kurativ hinsichtlich der aplastischen Anämie ist jedoch einzig und allein die Stammzelltransplantationen (4).

Transfusionsbehandlungen bergen auch heute immer noch das Risiko einer Infektion mit dem HepC- oder/und dem HI-Virus. Dennoch ist die Gabe von Erythrozytenkonzentraten bei stark erniedrigten Hb-Werten sowie die Gabe von Thrombozytenkonzentraten bei stark erniedrigten Thrombozytenwerten und sichtbaren Blutungszeichen unverzichtbar.

Antibiotika kommen prophylaktisch bei einer Leukopenie zum Einsatz, genauso wie bei einer bereits bestehenden bakteriellen Infektion.

Die medikamentöse Therapie stützt sich auf die Gabe von Androgenen und Kortikoiden (10, 4). 50 – 75% der FA-Patienten sprechen auf eine Androgentherapie an. Androgene, wie das synthetisch hergestellte Oxymetholon, sind männliche Hormone, die die Produktion einer oder mehrerer Blutzellreihen über längere Zeit stimulieren können. Androgene sind am wirksamsten in der Verbesserung des „roten Blutbildes“, jedoch wird nicht selten auch eine lebensrettende Verbesserung der Leuko- und Thrombozytenwerte festgestellt. Die Androgentherapie kann bei Ansprechen zu einer Lebensverlängerung führen, ist jedoch keine „Heilmethode“. Die meisten Patienten sprechen nach einer Weile nicht mehr darauf an, andere Patienten reagieren überhaupt nicht auf Androgene. Nicht unproblematisch sind die Nebenwirkungen der Androgentherapie gerade bei weiblichen Patienten, bei denen es zu einer Virilisierung und zu schlimmer Akne kommen kann. Eine gefürchtete Nebenwirkung der Androgensubstitution sind Lebererkrankungen, insbesondere Leberadenome, die multipel auftreten und sehr schnell wachsen können. Leberadenome sind bei beiden Geschlechtern beschrieben. Das Auftreten dieser prinzipiell gutartigen Tumoren ist allerdings kein Grund eine Androgentherapie nicht zumindest zu versuchen. Auch die Gabe von Kortikoiden kann allein oder in Kombination mit Androgenen zu einer Stabilisierung des Blutbildes führen.

Einen weiteren therapeutischen Ansatz stellt die Gabe hämatopoietischer Wachstumsfaktoren dar. Bei Fanconi Anämie Patienten wurden vorwiegend Granulozyten-Kolonien-stimulierende Wachstumsfaktoren, wie „G-CSF“ und „GM-CSF“, mit Erfolg getestet. Der Erfolg wurde daran gemessen, dass es zu einem Anstieg der neutrophilen Granulozyten kam. In einigen Fällen wurde auch ein Anstieg in den Hb- und Thrombozytenwerten beobachtet (10, 11).

Die Therapie mit der größten Langzeitwirkung stellt zur Zeit die Transplantation humaner Stammzellen entweder von gesunden HLA-identischen Geschwisterspendern, HLA-identischen Fremdspendern oder aus Nabelschnurblut (12) dar. Eine erfolgreiche Stammzelltransplantation eliminiert die Probleme, die mit dem Knochenmarkversagen zusammen hängen (Anämie, Neutropenie, Thrombopenie und Leukopenie). FA-Patienten behalten jedoch ihr hohes Risiko für die spätere Entwicklung maligner Erkrankungen, die nicht die Knochenmarkzellen betreffen, und sie können nach wie vor unter Problemen leiden, von denen die anderen Organe des Körpers betroffen sind. So weisen nahezu 80% der Patienten endokrine Störungen auf. Hierzu gehören Defizienzen von Wachstumshormon und Schilddrüsenhormon, sowie das frühzeitige Auftreten von Insulinresistenz und Diabetes mellitus.

Die besten Ergebnisse, im Sinne von Anwachsen der fremden Zellen und der geringeren Anzahl von Transplantatabstoßungen auf Grund einer Graft-versus-Host-Reaktion (GVHR), haben die Stammzelltransplantationen HLA-identischer Geschwisterspender gezeigt. Die Erfolgsrate liegt hier um die 80 %, bei Fremdspendern liegt die Erfolgsrate derzeit noch unter 60%. Um eine Stammzelltransplantation erfolgreich durchführen zu können, muss das Knochenmark des Empfängers eliminiert werden. Diese sogenannte Konditionierung erfolgt mit Hilfe eines eigens für FA-Patienten angepassten Schemas. Dieses Schema beinhaltet eine Ganzkörperbestrahlung und die Gabe von Fludarabin. Fludarabin ist ein neues Medikament, was nach erfolgter Transplantation das Risiko einer Transplantatabstoßung vermindern soll. Es gehört zu den neuen Nucleosidanaloga und wirkt sowohl chemotherapeutisch, als auch immunsuppressiv (1, 3, 8, 13).

I. 4. Somatische Reversion und Fragestellung

Alle bisher genannten Therapieansätze führen bei FA-Patienten zwar zu einer Verbesserung der Blutwerte mit einer häufigen Verlängerung der Lebenserwartung, jedoch können selbst die immer erfolgreicher verlaufenden Stammzelltransplantationen die Patienten nur hinsichtlich ihrer Knochenmarksprobleme heilen.

Seit mehreren Jahren hat man festgestellt, dass es auch bei der Fanconi Anämie sog. Mosaik-Patienten gibt (1, 3). Unter Mosaik-Patienten versteht man FA-Patienten, bei denen ein Teil der Blutzellen normal funktioniert, während ein anderer Teil weiterhin eine erhöhte Chromosomenbrüchigkeit aufweist. Derartige Mosaik sind allerdings nur auf die Blutzellen beschränkt, Hautfibroblasten sind nicht davon betroffen (14).

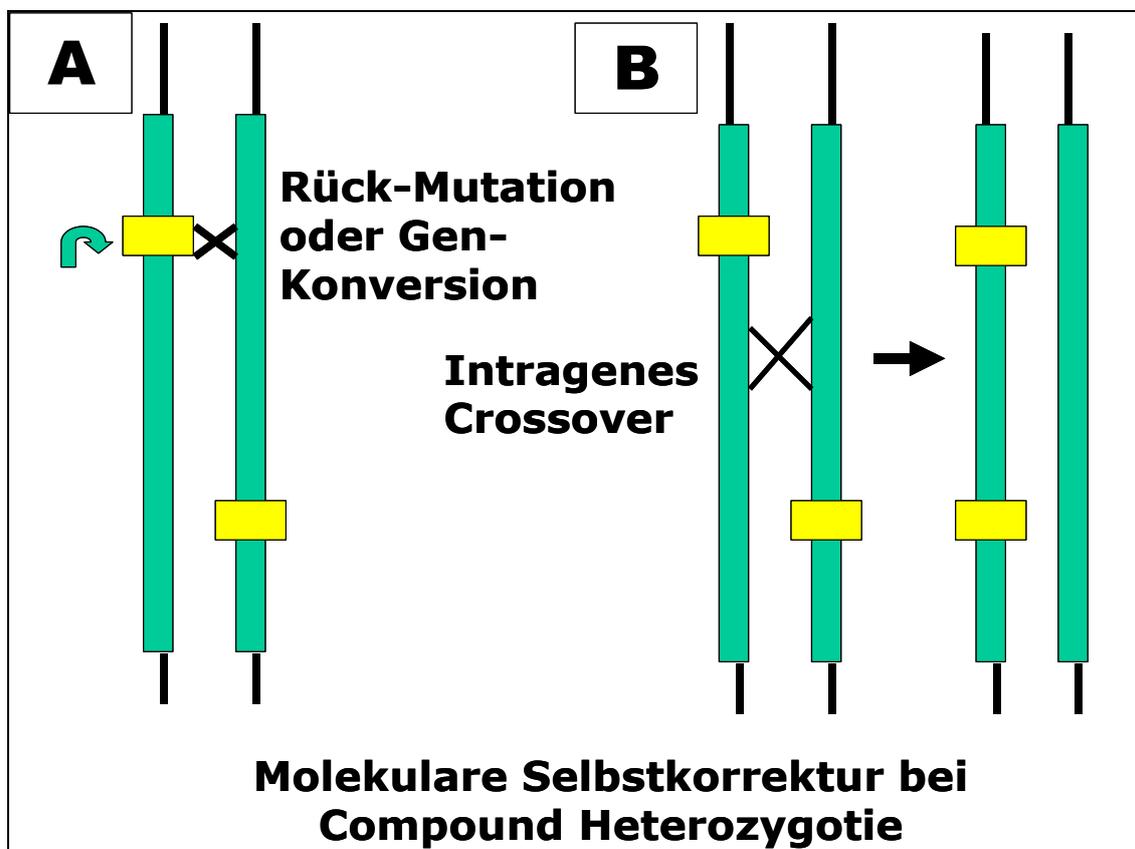


Abbildung 5: aus Foliensammlung Prof. Schindler / Prof. Hanenberg

An die Möglichkeit einer Mosaik-Bildung sollte man denken, wenn folgende Befunde vorliegen:

1. spontane Verbesserung der Blutwerte eines FA-Patienten;
2. ein Mischbefund von normalen und FA-typischen Zellen bei der Testung des peripheren Blutes auf Chromosomenbrüchigkeit oder Zellzyklusarrest;
3. Vorhandensein von MMC-resistenten Zellen im peripheren Blut bei weiterhin MMC-empfindlichen Hautfibroblasten;
4. MMC- oder DEB-Resistenz einer B-Zell-derivierten, lymphoblastoiden Zelllinie eines FA-Patienten.“(15)

Des Weiteren hat man im Laufe der Jahre bei diesen Patienten beobachtet, dass die gesunden Zellen einen Wachstumsvorteil gegenüber den kranken Zellen haben (10,15,16). Es kam zu einer kontinuierlichen und stabilen Verbesserung des Blutbildes mit einer deutlich erhöhten Lebenserwartung.

Auf Grund dieser Beobachtungen, die man im Sinne einer spontan auftretenden, also „natürlichen“ Gentherapie interpretieren kann, stellt sich die Frage, ob es nicht möglich ist, Stammzellen gentherapeutisch so zu verändern, dass sie keine Chromosomenbrüchigkeit mehr aufweisen und sich damit im Laufe der Zeit gegenüber den kranken Zellen durchsetzen und so zu einer wirklichen Heilung der Patienten führen. Die bisherigen Berichte über das Auftreten von „natürlicher Gentherapie“ bei FA-Patienten geben zu der Hoffnung Anlass, dass auch eine in vitro durchgeführte Korrektur der Gendefekte zur Verbesserung der Situation der Patienten führen könnte. Im Rahmen dieser Arbeit sollen daher die bisherigen Versuche zur somatischen Gentherapie bei der Fanconi Anämie zusammengestellt und einer kritischen Evaluation unterzogen werden.

II. Methoden

II. 1. Prinzipien der Gentherapie

Bevor Gentherapien erfolgreich eingesetzt werden können, muss man sich folgende Fragen stellen:

1. Wie lassen sich gesunde Kopien des benötigten Gens in die Stammzellen von FA-Patienten einbauen?
2. Wie kann das neue Gen dazu gebracht werden, so abgelesen zu werden, dass möglichst die richtige Menge des fehlenden Proteins produziert wird, welches FA-Patienten für ihren Organismus und das Blutsystem benötigen?
3. Können sich die Zellen, die das korrigierte Gen enthalten, so zahlreich vermehren, dass der Effekt auf den Körper dauerhaft ist?
4. Wie kann man die Gefahr einer leukämischen Reaktion nach Gentherapie so gering wie möglich halten, bzw. ausschalten? (8)

Um ein gesundes Gen dauerhaft in hämatopoietische Stammzellen einzubringen, muss es in deren genetischer Information verankert sein. Nur dann wird diese gesunde Kopie des Gens bei allen Teilungen der Zelle als Teil der genetischen Informationen in die Tochterzelle und deren Nachkommenschaft weitergereicht und ist somit dauerhaft in jeder Zelle des Blut- und Immunsystems vorhanden. Im Laufe der Evolution sind zahlreiche Schutzmechanismen in den Zellen höherer Mechanismen entstanden, um die eigene Erbinformation vor äußeren Einflüssen zu schützen und somit das Überleben als Spezies zu sichern. Deshalb ist es auch heute noch außerordentlich schwierig, mit chemischen oder physikalischen Methoden genetische Informationen dauerhaft in menschlichen Stammzellen zu verankern (17).

Hämatopoietische Stammzellen als Zielzellen für die Gentherapie findet man unter normalen Bedingungen nur im Knochenmark. Nur bei Anwendung von Wachstumsfaktoren wie dem G-CSF oder nach Chemotherapien werden hämatopoietische Stammzellen vorübergehend im peripheren Blut gefunden. Stammzellen können somit durch eine Knochenmarkentnahme oder auch nach Gabe von G-CSF im Rahmen einer Aphaese aus dem peripheren Blut gewonnen werden (18). Anhand eines speziellen Rezeptors auf der Oberfläche der Stammzellen, CD34 genannt, lassen sie sich von den übrigen Zellen abtrennen und entsprechend anreichern.

Im Rahmen einer Gentherapie werden diese Zellen für ein bis zwei Tage mit rekombinanten menschlichen Wachstumsfaktoren, z.B. G-CSF, zur Teilung angeregt und dann auf Fibronectin-beschichteten Kulturplatten mit den retroviralen Vektoren bei 37°C für zwei bis drei Tage transduziert. Mit Hilfe des Fibronectin binden die künstlichen Retroviren effektiv an die Stammzellen und werden in die Zellen aufgenommen. Schließlich erfolgt der weitgehend zufällige Einbau (Integration) ihrer genetischen Information in das menschliche Genom der Zelle. Am fünften Tag werden die Gen-korrigierten Stammzellen aus der Kultur geerntet, gewaschen und als Infusion über eine Vene dem Patienten zurückgegeben (17).

II. 2. Vektoren

Bei der Gentherapie von Stammzellen (17) werden bevorzugt Retroviren als Transportsysteme benutzt, weil diese im Rahmen der Evolution besondere Mechanismen entwickelt haben, um ihre eigene Erbinformation dauerhaft in fremde Zellen einzubringen. Alle natürlich vorkommenden Retroviren – außer den Foamyviren – können gefährliche Erkrankungen auslösen. Deshalb müssen diese Viren mit Hilfe molekulargenetischer Methoden so entschärft werden, dass sie praktisch kein Sicherheitsrisiko mehr beinhalten und gefahrlos unter bestimmten standardisierten Bedingungen angewendet werden können.

Ihr Einsatz ist allerdings auf Laboratorien mit Sicherheitsvorkehrungen nach der Gentechniksicherheitsverordnung beschränkt. Die beim Menschen bisher eingesetzten retroviralen Vektoren stammen fast alle von einfachen Mäuse-Leukämie-Viren, wie dem Moloney leukemia virus, ab (19). Nur in zwei Studien wurde das HI-Virus verwendet. Die Erbinformation dieser Viren wird weitgehend durch die normale Kopie des menschlichen Gens ersetzt und das Konstrukt Baustein für Baustein sequenziert. Für die klinische Anwendung erfolgt dann die Herstellung von künstlichen Retroviren, die zum einen die menschlichen Zellen nur einmal befallen und sich somit nicht ausbreiten können (= replikationsdefekte Viren) und die zum anderen die genetische Information für das gewünschte Gen tragen.

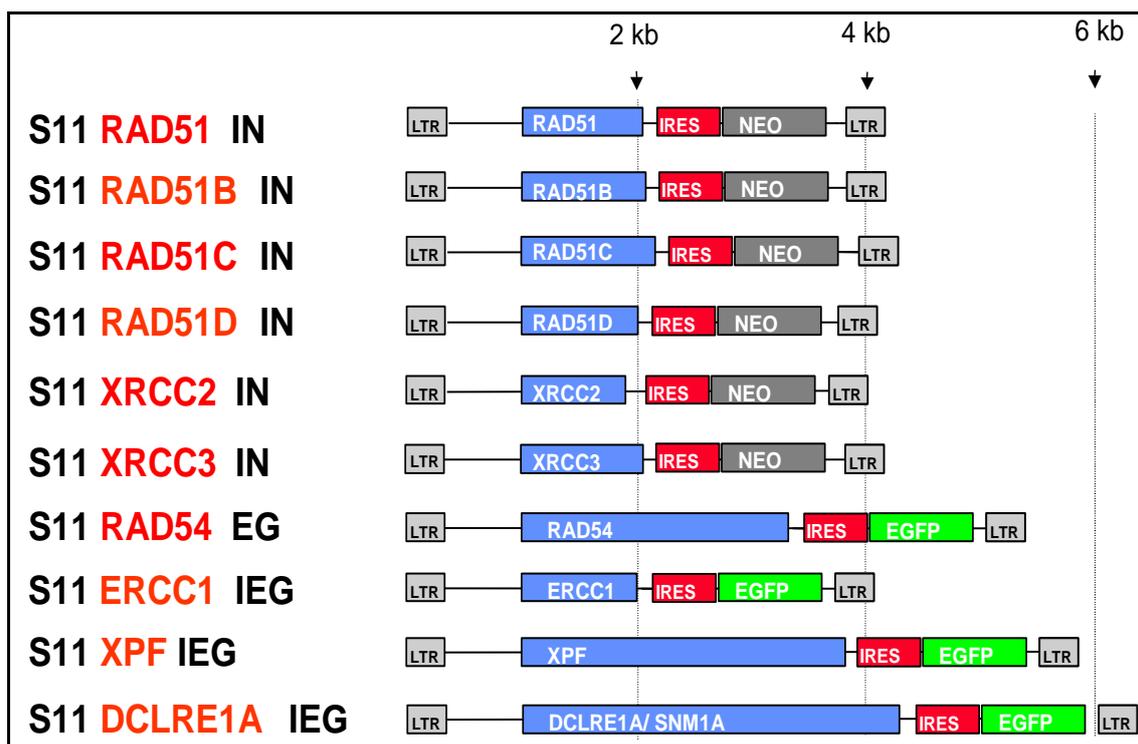


Abbildung 6: Beispiele für retrovirale Konstrukte als Vektoren für DNA-Reparaturgene aus Foliensammlung Prof. Schindler / Prof. Hanenberg

In neueren Studien zeigte sich die Verwendung von Lentiviren (19, 20), einer Untergruppe der Retroviren, als vielversprechend. Unter Lentiviren versteht man behüllte Einzelstrang-RNA-Viren. Die Besonderheit dieser Viren besteht darin, dass sie auch sich nicht teilende, eukaryotische Zellen infizieren können. Zu den Lentiviren gehören das humane Immundefizienz-Virus HIV-1 und HIV-2, sowie das EIAV der Pferde (21, 22).

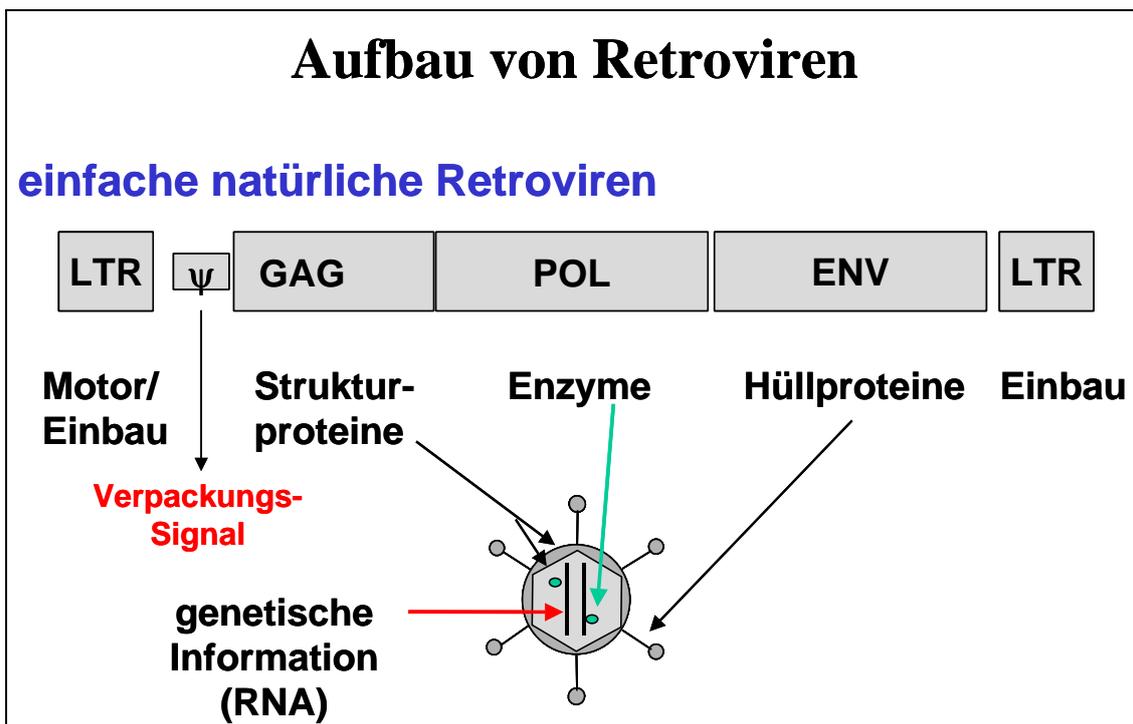


Abbildung 7: Aufbau von Retroviren aus Foliensammlung Prof. Schindler / Prof. Hanenberg

Die künstlichen Retroviren werden abschließend hinsichtlich ihrer Wirksamkeit und Effizienz, das gewünschte Gen zu übertragen, überprüft und zahlreichen Sicherheitstests unterzogen. Bis zur klinischen Anwendung werden sie bei -80°C gelagert (23).

II. 3. Transduktion

Unter dem Begriff Transduktion versteht man die "Infektion" einer Zelle mit einem viralen Vektor. Transduktion kann in vitro, ex vivo und in vivo erfolgen.

Eine Transduktion in vitro findet statt, nachdem CD34+ - Zellen nach Stimulation, aus dem peripheren Blut entnommen wurden. Die Transduktion der Zellen erfolgt mit dem retroviralen Vektor in Kultur.

Eine Transduktion ex vivo findet ebenfalls statt, nachdem CD34+ - Zellen nach Stimulation, aus dem peripheren Blut entnommen wurden. Die Transduktion der Zellen erfolgt mit dem retroviralen Vektor außerhalb des Körpers.

Eine Transduktion in vivo erfolgt, indem der retrovirale Vektor direkt in das jeweilige Lebewesen (z.B. Maus oder Mensch) eingebracht wird und die Zellen im Körper infizieren soll (23, 24).

III. Ergebnisse

III. 1. in vitro: Komplementationsanalysen

Bei der Fanconi Anämie wurden bis heute 13 Komplementationsgruppen (5, 6, 7) definiert, die mit den Buchstaben A, B, C, D1, D2, E, F, G, I, J, L, M und N gekennzeichnet sind. Für alle Komplementationsgruppen konnte jeweils ein Gen (FANCA bis FANCN) identifiziert werden, welches bei den Patienten der betreffenden Komplementationsgruppe Veränderungen aufweist, und daher funktionsuntüchtig ist. Eine somatische Gentherapie kann nur durchgeführt werden, wenn bekannt ist, welches der zahlreichen Gene bei einem Patienten tatsächlich mutiert, also defekt ist. Um diese Voraussetzung zu schaffen, muss der Patient zunächst einer der oben genannten Komplementationsgruppen zugeordnet werden.

Wie ordnet man nun einen Patienten einer Komplementationsgruppe zu?

Komplementationsanalyse durch Zellfusion (Hybridisierung)

Die klassische Komplementationsanalyse 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.

Dadurch wird bei einer Zellfusion von beispielsweise FA-A- und FA-C-Zellen von einer FA-A-Zelle das FANCC-Gen und von der FA-C-Zelle das FANCA-Gen zur Verfügung gestellt, sodass die fusionierten (Hybrid-)Zellen keinen FA-Defekt mehr aufweisen.

Fusioniert 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 Fusionszelle einbringt. Testet man diese Fusionszellen, so bleiben sie MMC-überempfindlich, im Gegensatz zu Fusionszellen ungleicher Komplementationsgruppen. So kann die betreffende Komplementationsgruppe bestimmt werden.

In herkömmlicher Weise durchgeführte Komplementationsgruppenbestimmungen umfassen vier Schritte:

1. die Gewinnung/Etablierung einer lymphoblastoiden Linie nach EBV-Transformierung von B-Zellen aus dem peripheren Blut des Patienten
2. die Sicherung der MMC-Überempfindlichkeit dieser Linie
3. die Verschmelzung von Zellen dieser Linie mit Zellen von dreizehn Referenzlinien
4. die Testung der MMC-Empfindlichkeit der somatischen Zellhybride.

Nur wenn Zellen des betreffenden Patienten mit Zellen der gleichen Komplementationsgruppe fusioniert werden (z.B. FA-A mit FA-A), zeigen die Fusionszellen noch die typischen FA-Eigenschaften.

Da diese Art der Komplementationsgruppenbestimmung in hohem Maße zeit- und arbeitsaufwendig sind, hat man nach Alternativen gesucht.

Komplementationsanalyse mit Hilfe von retroviralen Vektoren

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 wie folgt:

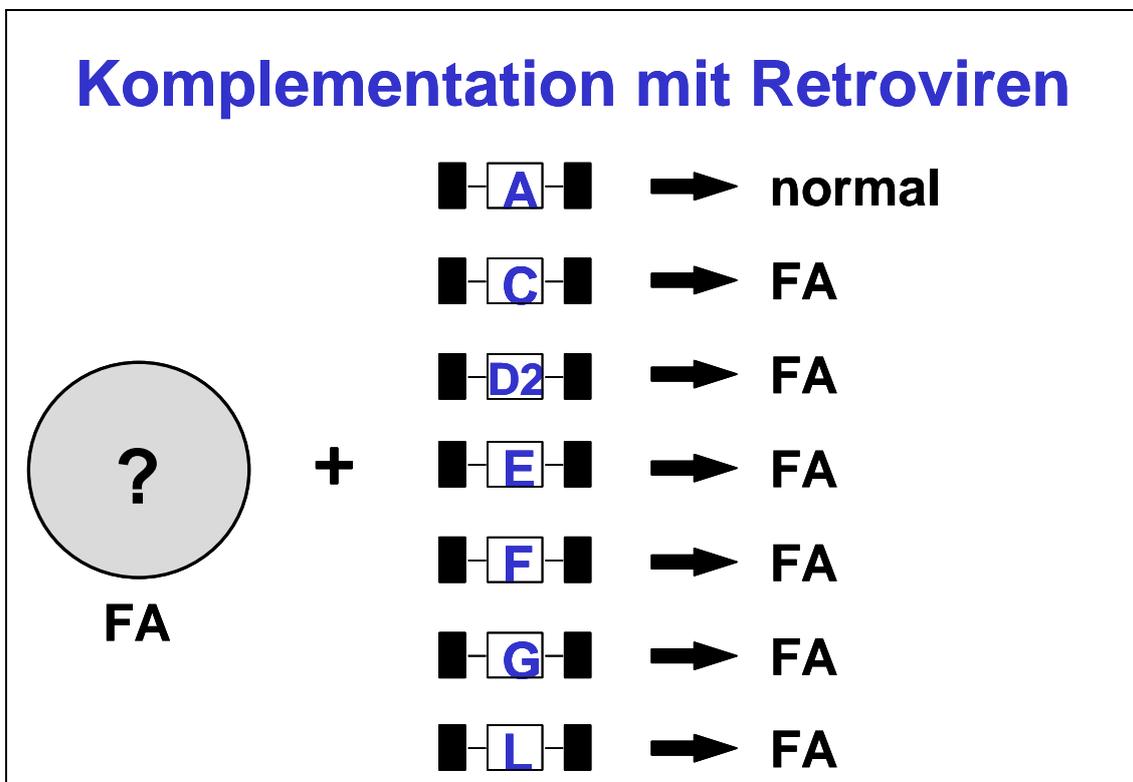


Abbildung 8a: Zuordnung eines unbekanntes FA-Patienten zur Komplementationsgruppe FA-A aus Foliensammlung Prof. Schindler / Prof. Hanenberg

Komplementation mit Retroviren

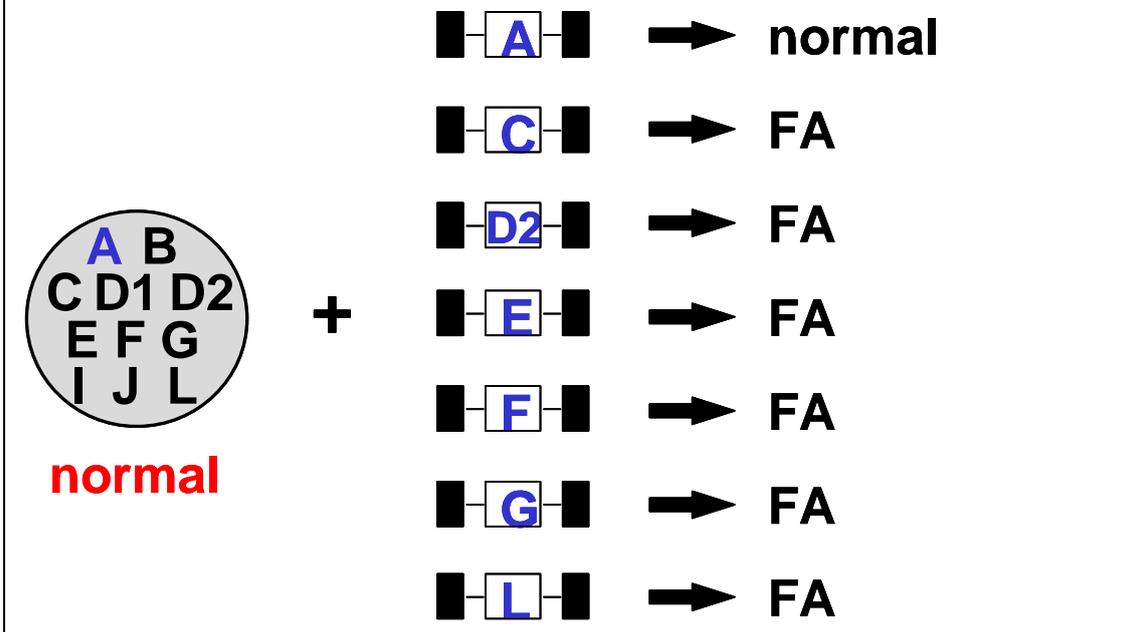


Abbildung 8b: Zuordnung eines unbekanntes FA-Patienten zur Komplementationsgruppe FA-A aus Foliensammlung Prof. Schindler / Prof. Hanenberg

Bei der Komplementationsanalyse durch Zellfusion werden in FA-Zellen einer noch nicht zugeordneten Komplementationsgruppe mit dem Fusionspartner, d.h. 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 (25).

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 der Düsseldorfer Arbeitsgruppe verschiedene Retroviren für alle bekannten FA-Gene hergestellt – 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 bis FANCL im Labor in Zellen eines Patienten mit 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.

Korrigiert keines der retroviral eingeführten Gene die Zellen, so gehört der Patient zu den Komplementationsgruppen FA-D1, FA-I und FA-J oder zu einer neuen, noch nicht definierten Gruppe.

Retrovirale Komplementationsanalyse kann an Lymphozyten (T-Zellen) durchgeführt werden, die direkt aus einer Blutprobe (1-4ml) eines Patienten noch nicht zugeordneter Komplementationsgruppe isoliert werden können. Auch mit Zellen einer lymphoblastoiden B-Zelllinie kann eine retrovirale Komplementationsanalyse durchgeführt werden.

Komplementationsanalysen lassen sich ebenfalls mit CD34-positiven Zellen aus dem Knochenmark oder nach deren Mobilisierung mit G-CSF aus dem peripheren Blut durchführen. 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 (25).

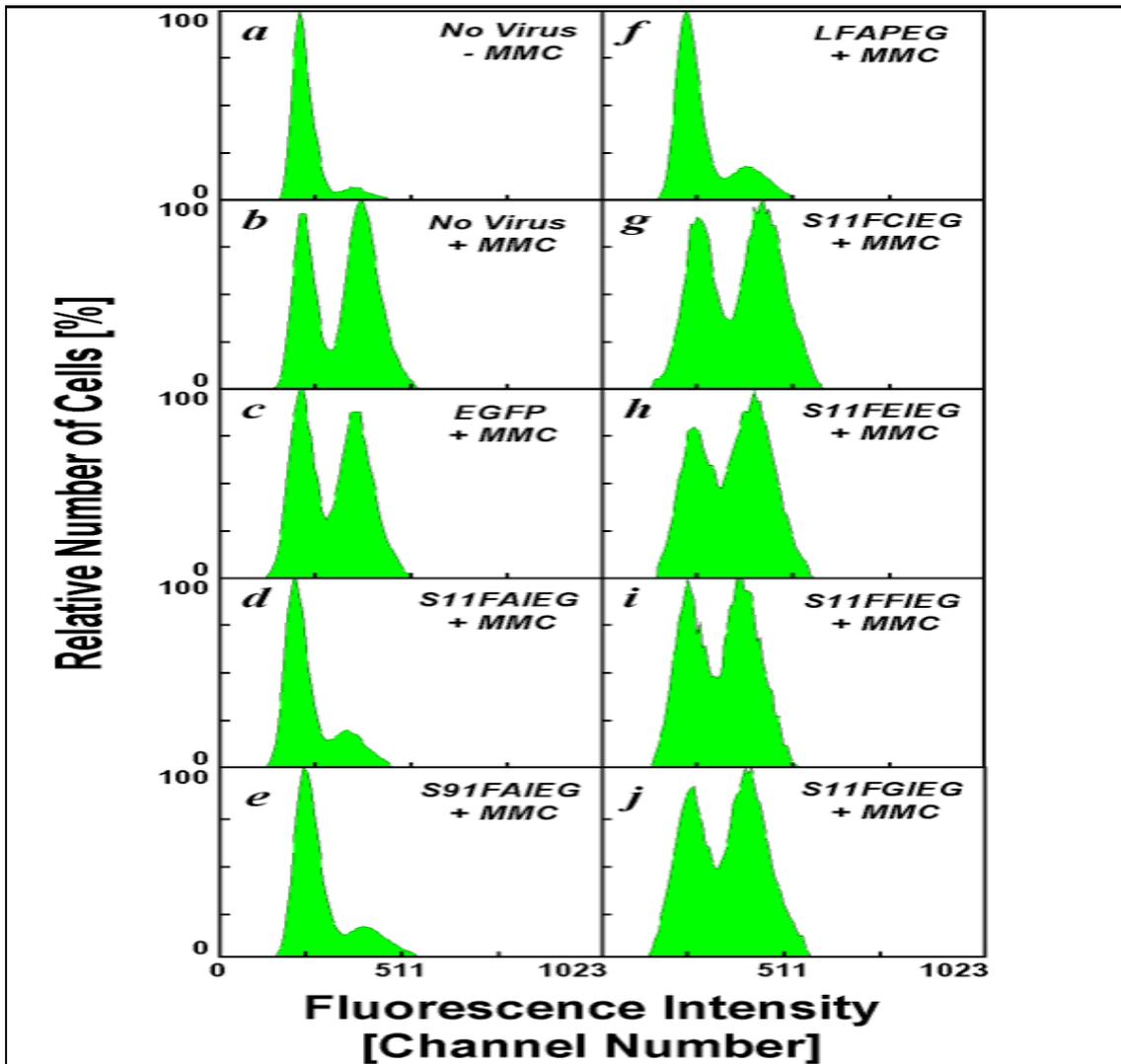


Abbildung 9: Beispiel der Bestimmung der Komplementationsgruppe in Hautfibroblasten eines FA-Patienten. Das Beispiel illustriert die Zuordnung der Fibroblasten des Patienten zur Untergruppe FA-A. Nur mit dem A-tragenden Vektor war die Komplementation erfolgreich. Dieses war sichtbar als Rückgang der Akkumulation von Zellen in der G2-Phase. Die genetisch korrigierten Zellen verhalten sich hinsichtlich ihrer Zellzyklusverteilung wieder wie normale /nicht-FA-Zellen.

aus Foliensammlung Prof. Schindler / Prof. Hanenberg

Ferner möglich ist die retrovirale Komplementationsanalyse an Fibroblasten (14). Fibroblasten-ähnliche Zellen für diese Untersuchung können aus einer Hautbiopsie, aber auch aus dem Knochenmark oder vorgeburtlich aus Amnionflüssigkeit gewonnen werden. Anhand der Untersuchung von Fibroblasten wird eine Komplementationsanalyse insbesondere auch bei den Patienten möglich sein, die sich in der Vergangenheit erfolgreich einer

Stammzelltransplantation unterzogen haben und deren Blutzellen folglich normal sind.

Bei Patienten mit komplettem Mosaik in ihren peripheren Blutzellen konnte die Komplementationsgruppe in der Vergangenheit mit Routinetechniken nicht festgestellt werden; sie wurden als MMC-resistent klassifiziert. Da noch nie beobachtet wurde, dass ein somatisches Mosaik auch in Fibroblasten auftritt, kann mittels retroviraler Komplementationsanalyse in Fibroblasten auch dann die Komplementationsgruppe eines FA-Patienten bestimmt werden, wenn dieser ein komplettes Mosaik in seinen peripheren Blutzellen aufweist.

Bisher wurden in mehr als 150 Fällen retrovirale Komplementationsanalysen an T-Zellen aus dem peripheren Blut durchgeführt und in mehr als 80% der Fälle konnten die Patienten innerhalb von zwei bis drei Wochen den Gruppen FA-A, FA-B, FA-C, FA-E, FA-F, FA-G, FA-L, FA-nonABCDEFGL zugeordnet werden (Referenz). 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 analysiert werden können.

Die Nutzung von T-Zellen aus dem peripheren Blut zur Komplementationsanalyse 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 eventuell erforderliche Wiederholung der Analysen muss erneut Blut des Patienten angefordert werden. Deshalb werden parallel zur Komplementationsanalyse aus primären T-Zellen EBV-transformierte lymphoblastoide Zelllinien angelegt, die späteren wiederholenden oder bestätigenden Analysen dienen.

Bei knapp 15% der Patienten bringt die retrovirale Komplementation kein Ergebnis, da die lymphoblastoiden Zellen ein Mosaik ausgebildet haben und somit keine FA-typischen Eigenschaften (MMC-Überempfindlichkeit) mehr aufweisen.

Bei Untersuchungen an mehr als 200 lymphoblastoiden Linien wurde festgestellt, dass ca. 20% dieser Linien resistent gegenüber MMC war, obwohl nur ein Teil der Patienten wirklich ein Mosaik im Blutsystem ausgebildet hatte. Diese Linien können also auch in Kultur MMC-resistent werden. Lymphoblastoide Linien, die dauerhaft FA-typische Eigenschaften besitzen, stellen ein ideales Material für die retrovirale Komplementationsanalyse dar, weil sie ohne Stimulation kontinuierlich und unbegrenzt in der Zellkultur vermehrt und gegebenenfalls auch kryokonserviert werden können.

Die Abwägung der jeweiligen Vor- und Nachteile der beiden 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 und daher in retroviralen Vektoren kloniert werden konnte (11, 25, 26).

Die retrovirale Transduktion von FA Zellen zum Zwecke der Bestimmung der Komplementationsgruppe hat u.a. die entscheidenden Voraussetzungen für die in vivo Anwendung der somatischen Gentherapie bei FA-Patienten geschaffen. Bevor allerdings gentherapeutische Verfahren beim Menschen eingesetzt werden können, ist deren Anwendung in Tiermodellen unverzichtbar. Im Tiermodell können Effizienz und mögliche Nebenwirkungen dieser Therapieform untersucht und entsprechend modifiziert werden.

III. 2. in vivo: FA-Tiermodelle

Gentherapiestudien an Tieren sind Voraussetzung für die Anwendung beim Menschen. Als Versuchstiere werden überwiegend Mäuse verwendet, die das kranke FA-Gen in sich tragen und somit die Krankheit imitieren. An FA-Untergruppen stehen FANCA - und FANCC - Mäuse zu Verfügung. Diese Mäuse weisen jedoch weder äußere FA-Merkmale auf, noch entwickeln sie ein spontanes Knochenmarksversagen, wie dies bei FA-Patienten der Fall ist. Setzt man diese Mäuse jedoch chromosomenschädigenden Substanzen, wie MMC oder DEB aus, so zeigen auch diese Mäuse die FA-typischen Chromosomenbrüche. Als Kriterium einer erfolgreichen Gentransduktion und damit funktionellen Korrektur zählt somit die Wiederherstellung der MMC-Resistenz der retroviral behandelten Patientenzellen (1, 27).

In einer französischen Studie (16) hat man von neun FA-A-Patienten humane Stammzellen entnommen und diese unter hypoxischen Bedingungen und dem Zusatz von N-Acetylcystein inkubiert. Alle neun Zellreihen haben unter diesen Bedingungen Kolonien ausgebildet. Im nächsten Schritt wurden diese Zellen mit dem Vektor FOCHA-FANCA-IRES-CD24(FOCHA-FICD), einem Abkömmling des Moloney-Murine-leukemia-virus, transduziert. Die transduzierten Zellen konnten Kolonien bilden und waren alle unempfindlich gegenüber der Exposition mit MMC. Es fanden sich weder Chromosomenbrüche noch ein G2-Arrest. Anschließend erfolgte die Injektion dieser Zellen in bestrahlte FANCA-Mäuse. Nach 12 Wochen schienen die Mäuse gesund zu sein, das Blutbild war weitestgehend normal und in den Blutzellen konnte mittels PCR die transduzierte FANCA-cDNA nachgewiesen werden. Die Mäuse wurden anschließend getötet und in der Autopsie bestätigte sich der klinische Eindruck, dass sich das Knochenmark dieser Tiere nicht mehr als hypoplastisch darstellte. Außerdem fanden sich keine Anzeichen für Leukämie-verdächtige Zellen.

Bei einer amerikanischen Studie (28) wurden humane Stammzellen von FA-A-Patienten mit einem selbst-inaktivierenden Moloney-Murine-leukemia-virus, basierend auf dem Lentivirus HIV-1, transduziert. Anschließend erfolgte die Injektion in bestrahlte FANCA-Mäuse. Nach Exposition mit MMC zeigte sich auch hier keine Chromosomenbrüchigkeit mehr. Die Hämatopoese war stabil, da der Gentransfer mit Lentiviren eine Korrektur auf Stammzellniveau mit Langzeitwirkung erreichte. In vivo zeigten die genkorrigierten Zellen einen Wachstumsvorteil, der eine Transplantation dieser korrigierten Zellen in ebenfalls bestrahlte FANCA-Mäuse ermöglichte. Auch nach dieser zweiten Transplantation blieb die Hämatopoese stabil.

In einer weiteren Studie (29) wurde mit FANCC-Mäusen gearbeitet. Hier erfolgte ein ex vivo Gentransfer von FA-C cDNA auf CD34+ Vorläuferzellen von FA-C-Patienten mittels dem Moloney-murine-retrovirus nach Prästimulation mit IL-3, IL-6 und SCF (stem cell factor). Anschließend erfolgte die Injektion dieser transduzierten Zellen in acht Empfänger-Mäuse. Nach sechs Monaten fanden sich bei diesen Tieren normale Blutwerte, was ebenfalls auf einen in vivo Wachstumsvorteil der getherapierten Zellen schließen lässt. 10 - 30% der peripheren Blutzellen waren markiert mit dem FA-C Retrovirus. Normalerweise ist die Transduktion bei sich nicht teilenden Zellen, wie sie bei Fanconi Anämie vorliegen, schwierig. Durch die Prästimulation der Zellen mit Zytokinen (IL-3, IL-6, IL-11, SCF) oder 5-FU erfolgt eine Induktion des Zellzyklus und erleichtert somit die Transduktion.

Weitere Studien (20, 30-32) zeigten ähnliche Ergebnisse. Somit können die zahlreichen gentherapeutischen Versuche, die im Falle der FA mit Tiermodellen durchgeführt wurden, insgesamt als positiv bewertet werden. In keiner dieser experimentellen Serien kam es überdies zum Auftreten von Malignomen.

III. 3. ex vivo/in vivo: bisherige Studien bei FANCC und FANCA

Auf Grund der durchweg positiven Ergebnisse der tierexperimentellen Studien wurden auch bei FA- Patienten bereits eine Reihe von Gentherapiestudien durchgeführt

In einer Studie aus dem Jahr 1994 (33) mit FA-C-Patienten wurde als retroviraler Vektor ein rekombinanter Adeno-assoziiertes Virus (rAAV) verwendet. Hierbei handelt es sich um die erste Demonstration von einer rAAV-Gentherapie in menschlichen Vorläuferzellen. Wie auch in den anderen Studien erfolgte die Transduktion mit FA-C-cDNA von Lymphoblasten und CD34 Vorläuferzellen in Gegenwart von Zytokinen (IL-3, IL-6, SCF). Diese genkorrigierten Zellen wiesen keine FA-Diagnose-Kriterien mehr auf: es bestand keine MMC-Sensitivität mehr, es zeigten sich keine Chromosomenbrüche mehr und es kam zu keinem Stagnieren mehr in der G2-Phase. Eine stabile provirale Integration konnte in der PCR nachgewiesen werden.

Eine andere Studie (34) mit FA-C-Patienten stammt ebenfalls aus dem Jahr 1994. Hier wurden lymphoblastoide Zellreihen von FA-C-Patienten mit einem retroviralen Vektor (Moloney-murine-retrovirus), der die entsprechende cDNA enthielt, transduziert. Diese Zellreihen wurden im Anschluss auf ihre MMC-Empfindlichkeit überprüft und es wurde festgestellt, dass die Zellen nicht mehr MMC-sensitiv waren, dass sie keine chromosomalen Abberationen mehr aufwiesen und dass anhand dieser Zellreihen die Diagnose Fanconi Anämie nicht mehr gestellt werden konnte.

Ebenso wie lymphoblastoide Zellreihen wurden auch CD34+-Stammzellen von FA-C-Patienten mit dem retroviralen Vektor transduziert. Diese humanen Stammzellen wurden nach vorheriger Stimulation mit G-CSF aus dem peripheren Blut entnommen. Auch die Stammzellen zeigten, wie bereits die Lymphoblasten, keine MMC-Überempfindlichkeit mehr und wiesen sich durch einen deutlichen Wachstumsvorteil gegenüber nicht korrigierten Zellen aus.

Hier ist es gelungen Lymphoblasten und CD34 Vorläuferzellen von FA-C-Patienten mit vier verschiedenen Mutationen im FANCC-Gen zu komplementieren.

Auch eine Studie aus dem Jahr 1995 (35) beschäftigte sich mit FA-C-Patienten. In dieser Studie konnte die erfolgreiche retrovirale Transduktion von peripheren Stammzellen und Nabelschnurblut dokumentiert werden. Wie schon in zahlreichen anderen Studien wurde auch hier ein Abkömmling des Moloney-murine-retrovirus als Vektor verwendet. Zuerst wurden lymphoblastoide Zellreihen von FA-C-Patienten mit diesem Vektor transduziert. Die Zellen wiesen danach keine MMC-Sensitivität mehr auf und zeigten einen deutlichen Wachstumsvorteil. Die Zugabe von Zytokinen (IL-3, IL-6, SCF) erleichterte die Transduktion. Im Anschluss daran erfolgte nach Mobilisierung mit G-CSF und anschließender Asservierung die Transduktion von CD34 Vorläuferzellen unter Zusatz von Zytokinen (IL-3, IL-6, SCF). Wie schon bei den Lymphoblasten zeigte sich auch bei den Stammzellen keine MMC-Überempfindlichkeit mehr. Ebenso wurden CD34 Vorläuferzellen aus Nabelschnur unter den gleichen Bedingungen transduziert und wiesen danach die gleiche MMC-Unempfindlichkeit auf wie Lymphoblasten und CD34-Stammzellen. Die retrovirale Transduktion mit gesunder FA-cDNA, gefolgt von einer Zell-Reinfusion, eröffnet die Möglichkeit der in vivo Expansion und autologen Rekonstruktion mit genkorrigierten Stammzellen, die aus dem peripheren Blut oder aus Nabelschnurblut gewonnen werden können. Die Re-Infusion könnte ohne vorherige myelo-ablative Chemotherapie erfolgen und würde somit das Risiko von Spät komplikationen, wie z.B. der Tumorinduktion, drastisch senken.

In einer Studie aus dem Jahr 1997 (36) erfolgte die Transduktion und Korrektur lymphoblastoider Zellreihen bei 4 FA-A-Patienten mit Hilfe eines retroviralen Vektors. Auch hier wurde als Vektor für die komplementäre FA-A cDNA ein Abkömmling des Moloney-murine-retrovirus verwendet. Die retroviral transduzierten Lymphoblasten waren im Verlauf deutlich weniger sensitiv gegenüber MMC.

Die korrigierten FA-A-Zellen zeigten ebenfalls eine normale Zellkinetik und keinen G2-Arrest mehr. Auch das Wachstum dieser Zellen war weitestgehend normal. Wie erwartet hat man in Kontrolluntersuchungen festgestellt, dass die Korrektur einer FA-Zelle mit Hilfe von retroviralem Gentransfer nur möglich ist, wenn genau die fehlende cDNA transduziert wird. Transduziert man also eine FA-A-Zelle mit einem FA-A-cDNA-Vektor erfolgt die Korrektur der Zelle. Erfolgt die Transduktion einer FA-A-Zelle jedoch mit einem FA-C-cDNA-Vektor behält die transduzierte Zelle ihre FA-typischen Eigenschaften.

All diese und weitere Studien haben gezeigt, dass eine Integration gesunder FA-cDNA in humane Lymphoblasten und CD34 Vorläuferzellen möglich ist. Gerade die genkorrigierten Stammzellen könnten durch ihren Wachstumsvorteil gegenüber den FA-Zellen zu einer Stabilisierung der Hämatopoiese führen und somit die Lebenserwartung von FA-Patienten deutlich verlängern, wenn nicht sogar zu einer Heilung dieser Patienten beitragen.

Autor/ Jahr	Titel	Komple- mentations- gruppe	Vektoren	Ergebnisse
Liu JM, Kim S, Walsh CE 1995	Retroviral- mediated transduction of the fanconi anemia C complementing (FACC) gene in two murine transplantation models.	FA-C Ex vivo	Moloney murine leukemia retrovirus	Schwierigkeit der retroviralen Transduktion bei sich nicht teilenden Zellen Verbesserung durch Prästimulation mit 5-FU oder Zytokinen, wie IL-3, IL-6 und SCF(Induktion des Zellzyklus). Wachstumsvorteil genkorrigierter Zellen in vivo
Liu JM 4/1998	Gene transfer for the eventual treatment of Fanconi's anemia.	FA-C In vitro/ex vivo	Moloney murine leukemia virus	Tumor-Suppressor-Protein p53 aktiviert FA-C- Expression. FA-C ist Sensor für DNA-Schäden. FA-C ist lokalisiert im Zytoplasma. Interaktion mit P450. Überexpression von FA-C schützt vor Zelltod durch Modulation der Apoptose. Inkompletter Zelltod hämatopoietischer Zellen erleichtert das Wachstum

				defekter präleukämischer Zellklone. Vektorintegration nur bei sich teilenden Zellen. Koloniewachstum nach Transduktion führt zu einem anti-apoptotischen Effekt. Wachstumsvorteil nur in vitro und nicht in vivo
Gush KA, Fu KL, Grompe M, Walsh CE 01/2000	Phenotypic correction of Fanconi anemia group C knockout mice.	FA-C Ex vivo/in vitro	Murine Moloney Leukemia Virus-based retroviral vector	Stabile Blutwerte nach erfolgter Transduktion, auch bei erneuter Transplantation der korrigierten Zellen
Kurre P, Kiem HP 8/2000	Progress towards hematopoietic stem cell gene therapy.	Ex vivo	Moloney murine leukemia virus	Erfolgreiche Mausergebnisse können auf den Menschen nicht übertragen werden. MLV-Vektor kann nur sich teilende Zellen infizieren. Lentivirale Vektoren können auch sich nicht teilende Zellen infizieren/transduzieren.
Rio P, Segovia JC, Haneberg H, Casado JA, Martinez J, Gottsche K, Cheng NC, Van de Vrugt HJ, Arwert F, Joenje H, Bueren JA 09/2002	In vitro phenotypic correction of hematopoietic progenitors from Fanconi anemia group A knockout mice.	FA-A Ex vivo	LFAPEG LPEG Based on the recombinant vector MSCV2.1	Normales in vitro Zellwachstum nach Transduktion
Yamada K., Ramezani A., Hawley RG, Ebell W., Arwert F, Arnold LW, Walsh CE 10/2003	Phenotype correction of Fanconi anemia group A hematopoietic stem cells using lentiviral vector.	FA-A	Self-inactivating vector plasmid SINF-MU3-FANCA-UTR-W based on HIV-1	Korrektur auf Stammzellniveau Langzeit-Wirkung
Galimi F, Noll M, Kanazawa Y, Lax T,	Gene therapy of Fanconi anemia: preclinical efficacy using	FA-A/FA-C In vivo/ex vivo	Third-generation, self-inactivating, HIV-derived lentiviral vector	In vivo: Korrigierte Zellen zeigen volle Resistenz gegenüber DNA-schädigenden

Chen C, Grompe M, Verma IM 10/2005	lentiviral vectors.		(lenti- FANCA/FANCC)	Substanzen, wie MMC Ex vivo: Stabiler Selektionsvorteil der gentherapierten Zellen in vivo; Korrektur auf Stammzellniveau
Cohen- Haguenauer O, Peault B, Bauche C, Daniel MT, Casal I, Levy V, Dausset J, Boiron M, Auclair C, Gluckman E, Marty M. 02/2006	In vivo repopulation ability of genetically corrected bone marrow cells from Fanconi anemia patients.	FA-A Ex vivo/in vitro	Moloney murine leucemia retrovirus	Wachstumsvorteil genkorrigierter Zellen in vivo. Ausreichender Pool an HSC muss vorhanden sein. Keine Leukämie-Zeichen.

Tabelle 2: bisherige Gentherapie-Studien an Tiermodellen der Fanconi Anämie

Autor/Jahr	Titel	Komplemen- tations- gruppe	Anzahl der Pati- enten	Transduktion	Vektor	Ergebnis
Walsh CE, Grompe M, Vanin E, Buchwald M, Young NS, Nienhuis AW, Liu JM 07/1994	A functionally active retrovirus vector for gene therapy in Fanconi anemia group C.	FA-C	4	In vitro/ex vivo Lympho- blastoide Zellreihen CD34- Vorläuferzellen	Moloney murine retrovirus	Korrektur von FA-C Lymphoblasten: Keine MMC- Sensitivität mehr. Keine chromosomalen Aberrationen mehr. Diagnose FA kann nicht mehr gestellt werden. FANCC-Gen ist wichtig für das Wachstum hämatopoietischer Stammzellen
Walsh CE, Nienhuis AW, Samulski Rj, Brown MG, Miller JL, Young	Phenotypic correction of Fanconi anemia in human hematopoietic cells with a	FA-C		In vitro Lymphoblastoide Zellreihen CD34-Zellen	rAAV	Transduziertes FA-C- Gen zeigt intaktes provirales Genom in Lymphoblasten und Hämatopoietischen Vorläuferzellen. Keine MMC-Sensitivität,

NS, Liu JM 10/1994	recombinant adeno-associated virus vector.					keine Chromosomenbrüche, kein G2-Arrest mehr. Stabile provirale Integration
Walsh CE, Mann MM, Emmons RV, Wang S, Liu JM 08/1995	Transduction of CD34-enriched human peripheral and umbilical cord blood progenitors using a retroviral vector with the Fanconi anemia group C gene.	FA-C		Ex vivo Lymphoblastoide Zellreihen Nabelschnurblut	Moloney murine leukemia retrovirus	Genkorrigierte Vorläuferzellen haben Wachstumsvorteil. Potentielle Therapie: ex vivo FANCC-cDNA-Gen-Transduktion mit anschließender Re-Infusion ohne myeloablative Chemotherapie, gefolgt von in vivo Expansion und autologer Rekonstruktion mit genkorrigierten Stammzellen. Bessere Vektorinfektion in Gegenwart rekombinanter Wachstumsfaktoren wie IL-3, IL-6 und SCF
Fu KL, Foe JR, Joenje H, Rao KW, Liu JM, Walsh CE 11/97	Functional correction of Fanconi anemia group A hematopoietic cells by retroviral gene transfer.	FA-A	4	In vitro/ex vivo	Moloney murine retrovirus	Transfer komplementierter DNA ist möglich. Wachstum der Vorläuferzellen. KM-Zellen-Verbesserung. FAA-Vektor für FA-A-Patienten. Weniger sensitiv gegenüber MMC
Pulsipher M, Kupfer GM, Naf D, Suliman A, Lee JS, Jakobs P, Grompe M, Joenje H, Sieff C, Guinan E, Mulligan R, D'Andrea AD 07/1998	Subtyping analysis of Fanconi anemia by immunoblotting and retroviral gene transfer.	FA-A, FA-C, non FA-AC	26	Ex vivo Lymphoblastoide Zellreihen	pMMP retroviral	Keine MMC-Sensitivität mehr. Retroviraler Vektor korrigiert FA-Zellreihen und erkennt FA-A/C-Proteine in transduzierten Zellen. Komplette Übereinstimmung zwischen den Ergebnissen der retroviralen Komplementationsanalyse und der konventionellen Zellfusion
Jacome A, Navarro S, Casado	A simplified approach to improve the	FA-A	4	Ex vivo CD34-Zellen	Gamma-retroviren	Lange in vitro Manipulation erhöht des Risiko für

JA, Rio P, Madero L, Estella J, Sevilla J, Badell I, Ortega JJ, Olive T, Hanenberg H, Segovia JC, Bueren JA. 02/2006	efficiency and safety of ex vivo hematopoietic gene therapy in fanconi anemia patients.					Myelodysplasien und Leukämien. Erfolgreiche Transduktion von Vorläuferzellen ohne in vitro Prästimulation
---	--	--	--	--	--	--

Tabelle 3: bisherige Gentherapie-Studien an Patienten mit Fanconi Anämie

IV. Diskussion

IV. 1. Voraussetzungen zur Durchführung der Gentherapie

Um Gentherapie am Menschen erfolgreich anwenden zu können, müssen folgende Voraussetzungen erfüllt sein:

1. erfolgreiche in vitro Versuche mit Zellen, wie sie bei FA jeweils durch die Komplementationsanalysen geschaffen wurden und
2. erfolgreiche Tierversuche

Um ein gesundes Gen dauerhaft in hämatopoietische Stammzellen einbringen zu können, muss es in deren genetischer Information verankert werden. Nur dann wird die gesunde Kopie dieses Gens bei allen Teilungen der Zelle als Teil der genetischen Information an die Tochterzellen und deren Nachkommenschaft weitergereicht und ist somit dauerhaft in jeder Zelle des Blut- und Immunsystems vorhanden (17).

Hämatopoietische Stammzellen als Zielzellen für die Gentherapie findet man unter normalen Bedingungen nur im Knochenmark. Nur bei Anwendung von Wachstumsfaktoren wie dem „Granulozyten-Kolonien stimulierenden Faktor“ (G-CSF) oder nach Chemotherapien werden hämatopoietische Stammzellen vorübergehend ins periphere Blut ausgeschwemmt.

Stammzellen können somit durch Knochenmarkentnahme oder auch nach Gabe von G-CSF im Rahmen einer Aphaese aus dem peripheren Blut gewonnen werden. Anhand eines speziellen Rezeptors auf der Oberfläche der Stammzellen, CD34 genannt, lassen sie sich von den übrigen filtrierten Zellen abtrennen (17).

In einer Studie aus den Jahren 1996-1998 (18) wurden acht Patienten einer Gentherapie zugeführt. Zunächst erfolgte die Mobilisierung und Asservierung humaner CD34+ - Stammzellen nach Gabe von G-CSF. Dieses gestaltete sich schwierig, da die Stammzellzahl bei FA-Patienten reduziert sein kann, war jedoch mit mehreren Anläufen möglich. Es wurde festgesetzt, dass die Gewinnung dieser Stammzellen vor dem Eintreten eines Knochenmarkversagens erfolgen und die Zellen anschließend kryokonserviert werden sollten.

Diese Zellen könnten für folgende Zwecke benutzt werden:

1. Die Gabe dieser Stammzellen kann erfolgen, wenn das Knochenmarkversagen weiter fortschreitet.
2. Diese Stammzellen können als Knochenmarktransplantat dienen.
3. Diese Zellen verlängern die Zeit bei der Suche nach einem geeigneten Fremdspender.
4. Diese Stammzellen können nach einer Chemotherapie bei Leukämie infundiert werden.
5. Diese Zellen können als Pool für eine Gentherapie verwendet werden (18).

Idealerweise sollte die Gentherapie möglichst früh nach Manifestation der Erkrankung durchgeführt werden, da der kontinuierliche Verlust an Stammzellen als Zielzellen, sowie die Anhäufung struktureller Veränderungen im Erbgut die Wahrscheinlichkeit, dass die Gentherapie dem Patienten klinischen Nutzen bringt, zunehmend verringert. Auch brauchen die wenigen korrigierten Stammzellen nach der Gentherapie ausreichend Zeit, um den Stammzellpool und gleichzeitig alle Zellreihen der Hämatopoese mit korrigierten Zellen aufzufüllen (17).

IV. 2. Risiken und Probleme

Da eine der wesentlichen lebensbedrohlichen Manifestationen der Fanconi Anämie das Knochenmarkversagen ist, sollte ein Ersatz des Knochenmarks, entweder durch Transplantation oder durch Transduktion von Stammzellen, hinsichtlich des hämatopoietischen Systems für die Patienten kurativ sein. Hinsichtlich der Transplantation von hämatopoietischen Stammzellen wurde der Heilungserfolg bereits vielhundertfach bewiesen und belegt (13). Auch für die Anwendung der Gentherapie sollte diese Patientengruppe in besonderer Weise geeignet sein, da Zellen des Knochenmarks relativ leicht zugänglich sind, außerhalb des Körpers manipuliert werden und auf einfache Weise in den Körper zurückgegeben werden können.

In den letzten Jahren hat sich gezeigt, dass die Durchführung der Gentherapie an CD34+ Stammzellen von FA-Patienten jedoch problematischer ist, als bei Patienten mit der SCID-Erkrankung, einem Gendefekt des Immunsystems. Dies ist zum einen auf die großen Schwierigkeiten zurückzuführen, eine genügende Zahl von Stammzellen von FA-Patienten aus dem häufig bereits aplastischen Knochenmark zu gewinnen, sie mehrere Tage in Kultur zu halten und dabei mit retroviralen Vektoren mit dem jeweiligen FA-Gen zu transduzieren.

Die Gefahr, dass durch die Gentherapie der Stammzellen eine Leukämie induziert wird, ist zwar als gering einzustufen, aber aufgrund der Ergebnisse in Mausmodellen mit defekten FA-Genen durchaus vorhanden. Allerdings muss dieses unbekannte Risiko der Leukämieinduktion angesichts der Tatsache, dass bei knapp 20% der FA-Patienten im Alter von 20 Jahren eine AML spontan entsteht, mit den Patienten und Angehörigen diskutiert und gegenüber den möglichen Vorteilen durch die Teilnahme an einer klinischen Gentherapiestudie sorgfältig abgewogen werden (18).

IV. 3. Bisherige Erfolge/Misserfolge bei Fanconi Anämie

Als großer Erfolg der konventionellen Therapieansätze bei Fanconi Anämie ist zu werten, dass die Lebenserwartung bei Patienten mit dieser Erkrankung deutlich gestiegen ist und es mittlerweile keine Seltenheit mehr ist, dass diese Patienten das 20. Lebensjahr erreichen.

Mit dafür verantwortlich sind verbesserte Therapieoptionen. So konnte beispielsweise die medikamentöse Therapie mit neueren Androgenen ausgebaut werden, deren virilisierende Nebenwirkungen weniger stark sind.

Ebenso sind im Verlauf der letzten 5 Jahre hämatopoietische Stammzelltransplantationen sehr viel sicherer geworden. Dies beruht vor allem auf der Entwicklung spezieller Transplantationsprotokolle für Fanconi Anämie Patienten, welche insbesondere eine sehr viel schonendere Myoablation beinhalten, als dies in früheren Jahren der Fall war. So konnte die Vorbestrahlungsdosis reduziert oder auch ganz eliminiert werden, um das Risiko für Posttransplantationstumore zu senken. Durch den Einsatz von Fludarabin wurde das Risiko einer GvH und einer Transplantatabstoßung entscheidend vermindert. Die ermutigenden Transplantationsergebnisse dürfen jedoch nicht darüber hinwegtäuschen, dass die Anzahl der passenden Spender immer noch verschwindend gering ist und dass eine Transplantation nur dann gute Ergebnisse zeigen kann, wenn ein HLA-identischer gesunder Geschwister-

oder Fremdspender vorhanden ist. Formalgenetisch kommt nur jedes vierte Geschwisterkind als HLA-kompatibler Knochenmarkspender in Frage. Bei der niedrigen Kinderzahl heutiger Familien verfügen daher weniger als 20% der Betroffenenfamilien über einen passenden Geschwisterspender. Die Erfolgsraten der Transplantationen mit HLA-kompatiblen Fremdspender bzw. haplo-identischen Familienangehörigen liegen derzeit noch unter 60%, so dass intensiv an alternativen Methoden zur Korrektur des defekten Knochenmarks gearbeitet wird. Die Selbstkorrektur hämatopoietischer Zellen bei einigen FA-Patienten ergab erste Hinweise auf die mögliche Effektivität einer somatischen Gentherapie. Mit einer Vielzahl von in vitro und in vivo Versuchen wurden in der Folge die Rahmenbedingungen für eine erfolgreiche Gentherapie erarbeitet.

Als wichtigen Erfolg ist die Tatsache zu werten, dass eine Zuordnung zu einer spezifischen Komplementationsgruppe und zu einem entsprechend defekten Gen immer früher erfolgen kann, weil sich die Analysemethoden deutlich verbessert haben. Mittlerweile konnten durch entsprechende Methoden 13 Komplementationsgruppen und Gene identifiziert werden. Während die ursprünglichen Komplementationsanalysen auf Zellfusion genetisch unterschiedlicher Zelllinien von FA-Patienten beruhten, hat sich in jüngster Zeit in der diagnostischen Praxis die Komplementation mit entsprechenden retroviralen Vektoren durchgesetzt.

Hinsichtlich der Anwendung der somatischen Gentherapie bei Patienten mit Fanconi Anämie liegen bereits eine Reihe von klinischen Studien vor. Gerade für Patienten der Gruppen A und C gibt es zahlreiche Studien. Versuche an Mäusen haben gezeigt, dass das Einbringen fremder DNA in Stammzellen möglich ist und dass diese Zellen einen entscheidenden Wachstumsvorteil gegenüber den „kranken“ Zellen besitzen. Die Kriterien der Fanconi Anämie, wie MMC-Überempfindlichkeit mit Chromosomenbrüchen und G2-Arrest, konnte nach erfolgter Gentherapie nicht mehr nachgewiesen werden.

Es zeigte sich, dass das Einbringen fremder DNA in humane Stammzellen möglich ist und dass wenige korrigierte Zellen durch ihren Wachstumsvorteil die gesamte Hämatopoiese vorübergehend stabilisieren und damit normalisieren können.

Als Misserfolg ist die Tatsache zu werten, dass es noch nicht gelungen ist, eine Gentherapie auf breiter Basis bei allen Patienten mit Fanconi Anämie durchzuführen. Als größtes Hindernis erweist sich die ungenügende Zahl von hämatopoietischen Stammzellen, die im fortgeschrittenen Stadium des Knochenmarkversagen bei FA Patienten noch gewonnen werden können. Nur bei einem sehr geringen Teil der Patienten kann die für die Therapie erforderliche Anzahl an Stammzellen gewonnen werden. Der Gentransfer ist ebenfalls noch nicht in alle Zellen möglich, trotz verschiedenster Vektoren. Ebenso gibt es noch zu wenig Erfahrung mit anderen Komplementationsgruppen, als FA-A und FA-C. Des Weiteren fehlen Langzeitergebnisse, um Aussagen über die Wirkdauer von Gentherapien treffen zu können. Mit Hilfe der Gentherapie kann man zwar die Hämatopoiese stabilisieren, jedoch ist damit noch nicht das Risiko der Tumorentstehung gebannt.

IV. 4. Schlussfolgerungen und Ausblick

Bei Fanconi Anämie handelt es sich nach wie vor um eine seltene, sehr ernst zu nehmende Erkrankung. Seit ihrer Entdeckung durch den Schweizer Kinderarzt Guido Fanconi im Jahre 1927, konnten die Diagnostik- und Therapieverfahren entscheidend verbessert werden. Der Komplex der FA-Gene, der zugehörigen Komplementationsgruppen und Proteine konnte zum größten Teil entschlüsselt werden.

Die Lebenserwartung ist durch den Einsatz von Bluttransfusionen, medikamentöser Therapien und der Möglichkeit von Stammzelltransplantationen deutlich verlängert und die Lebensqualität verbessert worden. Seit nunmehr über 10 Jahren wird der Versuch unternommen, Patienten mit Hilfe der Gentherapie zu heilen. Die bisherigen Studienergebnisse sind durchaus ermutigend. Sowohl in Studien am Tier als auch am Menschen konnte ein erfolgreicher Transfer „gesunder“ cDNA in lymphoblastoide Zellreihen und CD34 Vorläuferzellen gezeigt werden. An diesen Zellen hat man anschließend beobachtet, dass sie einen Wachstumsvorteil aufweisen und nach Re-Infusion das Potential zur Restitution des Knochenmarks haben.

Je älter die Patienten jedoch werden, desto höher ist die Wahrscheinlichkeit, dass das Knochenmark bereits aplastisch ist, so dass es zu wenige Stammzellen gibt, die für einen Gentherapieversuch noch verwendet werden können. Zudem besteht die Gefahr, dass es bereits zur Tumorentstehung gekommen ist. Ein klinischer Erfolg der Gentherapie bei Fanconi Anämie wird demnach wahrscheinlich nur möglich sein bei Patienten, die früh genug diagnostiziert werden und die noch einen ausreichenden Pool an Stammzellen besitzen.

Im Hinblick auf die Tatsache, dass sich die Erfolgsaussichten der hämatopoietischen Stammzelltransplantationen in den letzten Jahren nicht nur bei verwandten und passenden Spendern, sondern auch bei Fremdspender-Transplantationen entscheidend verbessert haben, stellt sich die berechtigte Frage, ob die weiterhin problematischen Gentherapie-Versuche als therapeutische Option sinnvoll sind. Insbesondere die Fortschritte bei den Fremdspender-Transplantationen lassen erwarten, dass zukünftig nahezu alle FA-Patienten mit dieser Therapieform mit guten Erfolgsaussichten behandelt werden können. Insofern ist auch zu erwarten, dass die Option einer somatischen Gentherapie zukünftig wieder an Bedeutung verlieren wird.

V. Zusammenfassung

Unter Fanconi Anämie versteht man eine rezessiv vererbte Multisystem-Erkrankung, die einhergeht mit erhöhter spontaner Chromosomenbrüchigkeit, sowie erhöhter Anfälligkeit für toxische Substanzen, wie Mitomycin C (MMC) oder Diepoxybutan (DEB). An körperlichen Merkmalen sind vor allen Dingen aplastische/hypoplastische Daumen und Radii zu nennen. Bereits im Kindesalter kommt es zum stetigen Knochenmarkversagen, sowie dem frühzeitigen Auftreten von Malignomen. Die durchschnittliche Lebenserwartung liegt bei etwa 20 Jahren. Als Therapieoptionen stehen verschiedene Möglichkeiten zur Verfügung, wie z.B. die Gabe von Androgenen oder von Wachstumsfaktoren, die Stammzelltransplantation, aber auch die Gentherapie. Die Gentherapie möchte eine langfristige Verbesserung der Blutzellen auf Stammzellniveau erreichen. Dieses wurde in verschiedenen Studien belegt. Mittlerweile konnten 13 FA-Komplementationsgruppen mit den dazugehörigen Genen identifiziert werden. Die Zuordnung eines Patienten zu einer dieser Komplementationsgruppen erfolgt hauptsächlich mit Hilfe des retroviralen Gentransfers. Dabei werden die jeweiligen cDNAs der einzelnen Gene mit Hilfe von retroviralen Vektoren in die Patientenzellen eingebracht und mit Hilfe der Durchflusszytometrie getestet. Während FA-Zellen hochempfindlich gegenüber DNA-Crosslinkern sind und in der G2-Phase des Zellzyklus akkumulieren, weisen erfolgreich komplementierte Zellen eine normale MMC-Empfindlichkeit und daher normale G2-Phasen-Werte auf. Diese Komplementationsstudien belegen prinzipiell und sehr überzeugend, dass die Korrektur des jeweiligen genetischen Defektes auf dem Wege der retroviralen Transduktion möglich ist. Der Einsatz von Retroviren als Träger der intakten Gen-Information ist Bestandteil zahlreicher Gentherapiestudien in der ganzen Welt. In dieser Arbeit wurde an Hand der verfügbaren Literaturdaten untersucht, welche Faktoren dafür verantwortlich sind, dass die bei FA-Patienten durchgeführten Gentherapie-Studien bisher nicht den gewünschten Erfolg gebracht haben.

Dies liegt vor allen Dingen daran, dass gentherapeutische Versuche bei FA letztlich daran scheitern, dass bei fortgeschrittener aplastischer Anämie (= Knochenmarkversagen) die Gewinnung der zur erfolgreichen Transduktion erforderlichen Mengen an CD34 positiven Stamm-Blutzellen schwierig bis unmöglich ist.

Im Hinblick auf die Tatsache, dass sich die Erfolgsaussichten der hämatopoietischen Stammzelltransplantation in den letzten Jahren nicht nur bei verwandten und passenden Spendern, sondern auch bei Fremdspender-Transplantation entscheidend verbessert haben, stellt sich die berechtigte Frage, ob die weiterhin problematischen Gentherapie-Versuche als therapeutische Option sinnvoll sind. Insbesondere die Fortschritte bei den Fremdspender-Transplantationen lassen erwarten, dass zukünftig nahezu alle FA-Patienten mit dieser Therapieform mit guten Erfolgsaussichten behandelt werden können. Insofern ist auch zu erwarten, dass die Option einer somatischen Gentherapie zukünftig wieder an Bedeutung verlieren wird.

VI. Abstract

Fanconi anemia (FA) is an inherited recessive disease, which is accompanied by increased spontaneous chromosomal breakage, and increased susceptibility to DNA-crosslinking agents such as mitomycin C (MMC) or diepoxybutane (DEB). The physical characteristics of the majority of FA patients include short stature, radial ray defects, pigmentary changes and renal abnormalities. The namesake of the disorder is childhood-onset bone marrow failure. Additionally, FA-patients are at highly increased risk for malignancies, specifically MDS, AML and squamous cell carcinomas. There are various treatment options to improve life expectancy and quality of life of Fanconi anemia patients. Therapeutic options include administration of androgens or growth factors, hematopoietic stem cell transplantation (HSCT), but also somatic gene therapy.

Gene therapy aims at a long-term improvement in blood stem cells at the cellular level. This thesis reviews the current status of gene therapy in FA. There are 13 FA-complementation groups with as many corresponding genes identified. The assignment to a given group is made with the help of retroviral gene transfer. cDNAs representing the intact gene sequence of the respective FA genes are cloned into retroviral vectors and transduced into patient cells. Successful complementation is indicated by resistance to DNA-crosslinking agents, such as MMC or DEB. In the flow cytometric assay, MMC-resistance causes a reduction of the FA-typical accumulation of cells in the G2-phase of the cell cycle. As such, these retroviral complementation studies provide proof-of-principle that somatic gene replacement might be successful. However, review of the gene therapy studies published in the literature suggests that many problems persist with this approach. In the case of FA patients, the most severe limitation of somatic gene therapy is caused by the failing production of blood cells. In the advanced, aplastic stage of their disease, FA patients are completely or nearly devoid of bone marrow cells. In this situation, obtaining the necessary quantities of CD34 positive blood stem cells for successful transduction is difficult, if not impossible.

Owing to improved transplantation protocols and posttransplantation care, the outcome of hematopoietic stem cell transplantation of FA-patients has dramatically improved during recent years. This holds not only for matched sibling donor transplants, but also for unrelated, alternative donor transplants. These developments raise the question whether gene therapy should be further pursued as a therapeutic option. Given the many unsolved questions, limitations and potential hazards of somatic gene therapy, this therapeutic option is likely to lose some of its impact in future years. With further improvements, HSCT is likely to turn into the treatment of choice, even though this does not eliminate the life-long threat of solid tumors in FA-patients.

VII. Literaturliste

1. Tischkowitz M, Dokal I.

Fanconi anaemia and leukaemia - clinical and molecular aspects.

British Journal of Haematology. 126(2):176-91, July 2004

2. Frohnmayer D. und L.

Definition, Merkmale und Diagnose der Fanconi Anämie

Fanconi Anämie – Ein Handbuch für Eltern, Patienten und ihre Ärzte

Deutsche Fanconi Anämie Hilfe e.V. 2005

3. Tischkowitz MD, Hodgson SV

Fanconi anaemia.

J Med Genet. 40(1):1-10. 2003 Jan

4. Shimamura A.

Behandlung der hämatologischen Probleme von Patienten mit Fanconi Anämie

Fanconi Anämie – Ein Handbuch für Eltern, Patienten und ihre Ärzte

Deutsche Fanconi Anämie Hilfe e.V. 2005

5. Weidong Wang

Emergence of a DNA-damage response network consisting of Fanconi anaemia and BRCA proteins

Nature Reviews Genetics, 4 September 2007

6. Lieberman, Lani, Dror, Yigal

Advances in understanding the genetic basis for bone marrow failure
(hematology and oncology)

Current Opinion in Pediatrics. 18(1): 15-21, February 2006

7. Mankad A, Taniguchi T, Cox B, Akkari Y, Rathbun RK, Lucas L, Bagby G, Olson S, D'Andrea A, Grompe M.

Natural gene therapy in monozygotic twins with Fanconi anemia.

Blood.107(8):3084-90, 15. April 2006

8. Frohnmayer D. und L.

Behandlung und Therapie der Fanconi Anämie

Fanconi Anämie – Ein Handbuch für Eltern, Patienten und ihre Ärzte

Deutsche Fanconi Anämie Hilfe e.V. 2005

9. Neufeld E.

Medizinische Checkliste - Vorschläge für Basis- und Spezialuntersuchungen bei Patienten mit Fanconi Anämie

Fanconi Anämie – Ein Handbuch für Eltern, Patienten und ihre Ärzte

Deutsche Fanconi Anämie Hilfe e.V. 2005

10. Dirksen U, Moritz T, Burdach S, Flisshove M, Hanenberg H

Fanconi anemia and beta c deficiency-associated pulmonary alveolar proteinosis as two hereditary diseases of childhood which are potentially curable by stem cell gene therapy but require different therapeutic approaches.

Klin Padiatr. 211(4):329-35. 1999 Jul-Aug

11. Liu Jm, Buchwald M, Walsh CE, Young NS

Fanconi anemia and novel strategies for therapy.

Blood. 84(12):3995-4007. 1994 Dec 15

12. Fricker J

Fanconi's anaemia, cord blood transplant and gene therapy.

Mol Med Today. 2(10):406-7. 1996 Oct

13. Eyrich M, Winkler B, Schlegel PG

Stem Cell Transplantation in Fanconi Anemia - Recent Advances with Alternative Donors. Monogr Hum Genet, Basel, Karger, vol 15, pp 173-82 (2007)

14. Battaile KP, Bateman RL, Mortimer D, Mulcahy J, Rathbun RK, Bagby G, Fleming WH, Grompe M

In vivo selection of wild-type hematopoietic stem cells in a murine model of Fanconi anemia.

Blood. 94(6):2151-8. 1999 Sep 15

15. Höhn H.

Mosaikbildung bei Fanconi Anämie

Fanconi Anämie – Ein Handbuch für Eltern, Patienten und ihre Ärzte

Deutsche Fanconi Anämie Hilfe e.V. 2005

16. Cohen-Haguenaer O, Peault B, Bauche C, Daniel MT, Casal I, Levy V, Dausset J, Boiron M, Auclair C, Gluckman E, Marty M.

In vivo repopulation ability of genetically corrected bone marrow cells from Fanconi anemia patients.

Proc Natl Acad Sci U S A. 14;103(7):2340-5. 2006 Feb

17. Hanenberg H.

Die somatische Gentherapie von Stammzellen bei Fanconi Anämie

Fanconi Anämie – Ein Handbuch für Eltern, Patienten und ihre Ärzte

Deutsche Fanconi Anämie Hilfe e.V. 2005

18. Croop JM, Cooper R, Fernandez C, Graves V, Kreissmann S, Haneberg H, Smith FO, Williams DA

Mobilization and collection of peripheral blood CD34+ cells from patients with Fanconi anemia.

Blood. 98(10):2917-21. 2001 Nov 15

19. Kurre P, Kiem HP

Progress towards hematopoietic stem cell gene therapy.

Curr Opin Mol Ther. 2(4):400-11. 2000 Aug

20. Galimi F, Noll M, Kanazawa Y, Lax T, Chen C, Grompe M, Verma IM

Gene therapy of Fanconi anemia: preclinical efficacy using lentiviral vectors.

Blood.100(8):2732-6. 2002 Oct 15

21. Wikipedia

<http://de.wikipedia.org/wiki/Lentiviren>

22. Yamada K, Olsen JC, Patel M, Rao KW, Walsh CE

Functional correction of fanconi anemia group C hematopoietic cells by the use of a novel lentiviral vector.

Mol Ther. 3(4):485-90. 2001 Apr

23. Herzog RW, Cao O, Hagstrom JN, Wang L.

Gene therapy for treatment of inherited haematological disorders.

Expert Opinion Biol Ther. 6(5):509-22. May 2006

24. Herzog RW, Hagstrom JN

Gene therapy for hereditary hematological disorders.

Am J Pharmacogenomics. 1(2):137-44. 2001

25. Schindler D., Hanenberg H.
Komplementationsgruppenbestimmung bei Fanconi Anämie mit Hilfe retroviraler Vektoren
Fanconi Anämie – Ein Handbuch für Eltern, Patienten und ihre Ärzte
Deutsche Fanconi Anämie Hilfe e.V. 2005
26. Pulsipher M, Kupfer GM, Naf D, Suliman A, Lee JS, Jakobs P, Grompe M, Joenje H, Sieff C, Guinan E, Mulligan R, D'Andrea AD
Subtyping analysis of Fanconi anemia by immunoblotting and retroviral gene transfer.
Mol Med. 4(7):468-79. 1998 Jul
27. Liu JM
Gene transfer for the eventual treatment of Fanconi's anemia.
Semin Hematol. 35(2):168-79. 1998 Apr
28. Yamada K., Ramezani A., Hawley RG, Ebell W., Arwert F, Arnold LW, Walsh CE
Phenotype correction of Fanconi anemia group A hematopoietic stem cells using lentiviral vector.
Mol Ther. 8(4):600-10. 2003 Oct
29. Liu JM, Kim S, Walsh CE
Retroviral-mediated transduction of the fanconi anemia C complementing (FACC) gene in two murine transplantation models.
Blood Cells Mol Dis. 21(1):56-63. 1995
30. Rio P, Segovia JC, Hanenberg H, Casado JA, Martinez J, Gottsche K, Cheng NC, Van de Vrugt HJ, Arwert F, Joenje H, Bueren JA
In vitro phenotypic correction of hematopoietic progenitors from Fanconi anemia group A knockout mice.
Blood. 100(6):2032-9. 2002 Sep 15

31. Gush KA, Fu KL, Grompe M, Walsh CE
Phenotypic correction of Fanconi anemia group C knockout mice.
Blood. 95(2):700-4. 2000 Jan 15
32. Noll M, Bateman RL, D'Andrea AD, Grompe M
Preclinical protocol for in vivo selection of hematopoietic stem cells corrected by
gene therapy in Fanconi anemia group C.
Mol Ther. 3(1):14-23. 2001 Jan
33. Walsh CE, Nienhuis AW, Samulski Rj, Brown MG, Miller JL, Young NS, Liu
JM
Phenotypic correction of Fanconi anemia in human hematopoietic cells with a
recombinant adeno-associated virus vector.
J Clin Invest. 94(4):1440-8. 1994 Oct
34. Walsh CE, Grompe M, Vanin E, Buchwald M, Young NS, Nienhuis AW, Liu
JM
A functionally active retrovirus vector for gene therapy in Fanconi anemia group
C.
Blood. 84(2):453-9. 1994 Jul 15
35. Walsh CE, Mann MM, Emmons RV, Wang S, Liu JM
Transduction of CD34-enriched human peripheral and umbilical cord blood
progenitors using a retroviral vector with the Fanconi anemia group C gene.
J Investig Med. 43(4):379-85. 1995 Aug
36. Fu KL, Foe JR, Joenje H, Rao KW, Liu JM, Walsh CE
Functional correction of Fanconi anemia group A hematopoietic cells by
retroviral gene transfer.
Blood. 90(9):3296-303. 1997 Nov 1

37. Jacome A, Navarro S, Casado JA, Rio P, Madero L, Estella J, Sevilla J, Badell I, Ortega JJ, Olive T, Hanenberg H, Segovia JC, Bueren JA.
A simplified approach to improve the efficiency and safety of ex vivo hematopoietic gene therapy in fanconi anemia patients.
Human Gene Therapy. 17(2):245-50. 2006 Feb
38. Williams DA, Croop J, Kelly P.
Gene therapy in the treatment of Fanconi anemia, a progressive bone marrow failure syndrome.
Curr Opin Mol Ther.7(5):461-6. 2005 Oct
39. Croop JM
Gene therapy for fanconi anemia.
Curr Hematol Rep.2(4):335-40. 2003 Jul
40. Joenje H, Patel KJ
The emerging genetic and molecular basis of Fanconi anaemia.
Nat Rev Genet. 2(6):446-57. 2001 Jun
41. Kohn DB
Gene therapy for genetic haematological disorders and immunodeficiencies.
J Intern Med. 249(4):379-90. 2001 Apr
42. Liu JM, Kim S, Read EJ, Futaki M, Dokal I, Carter CS, Leitman SF, Pensiero M, Young NS, Walsh CE
Engraftment of hematopoietic progenitor cells transduced with the Fanconi anemia group C gene (FANCC).
Hum Gene Ther. 10(14):2337-46. 1999 Sep 20

43. Liu JM, Young NS, Walsh CE, Cottler-Fox M, Carter C, Dunbar C, Barrett AJ, Emmons R

Retroviral mediated gene transfer of the Fanconi anemia complementation group C gene to hematopoietic progenitors of group C patients.

Hum Gene Ther. 8(14):1715-30. 1997 Sep 20

44. Machl AW, Planitzer S, Kubbies M

A novel, membrane receptor-based retroviral vector for Fanconi anemia group C gene therapy.

Gene Ther. 4(4):339-45. 1997 Apr

45. Gluckmann E

Allogeneic bone marrow transplantation in Fanconi anemia.

Bone Marrow Transplant. 18 Suppl 3:S33-5. 1996 Dec

46. Lu L, Ge Y, Li ZH, Freie B, Clapp DW, Broxmeyer HE

CD34 stem/progenitor cells purified from cryopreserved normal cord blood can be transduced with high efficiency by a retroviral vector and expanded ex vivo with stable integration and expression of Fanconi anemia complementation C gene.

Cell Transplant. 4(5):493-503. 1995 Sep-Oct

47. Niall G. Howlett

Fanconi anemia, breast and embryonal cancer risk revisited

European Journal of Human Genetics (2007) 15, 715-717. 16 May 2007

48. Zhong L, Zhao W, Wu J, Maina N, Han Z, Srivastava A.

Adeno-associated virus-mediated gene transfer in hematopoietic stem/progenitor cells as a therapeutic tool.

Curr Gene Ther. 2006 Dec;6(6):683-98. Review.

49. Almarza E, Río P, Meza NW, Aldea M, Agirre X, Guenechea G, Segovia JC, Bueren JA.

Characteristics of lentiviral vectors harboring the proximal promoter of the vav proto-oncogene: a weak and efficient promoter for gene therapy.

Mol Ther. 2007 Aug;15(8):1487-94.

50. Si Y, Ciccone S, Yang FC, Yuan J, Zeng D, Chen S, van de Vrugt HJ, Critser J, Arwert F, Haneline LS, Clapp DW.

Continuous in vivo infusion of interferon-gamma (IFN-gamma) enhances engraftment

of syngeneic wild-type cells in Fanca^{-/-} and Fancg^{-/-} mice.

Blood. 2006 Dec 15;108(13):4283-7.

51. Gluckman E, Wagner JE.

Hematopoietic stem cell transplantation in childhood inherited bone marrow failure syndrome.

Bone Marrow Transplant. 2007 Dec 17

VIII. Danksagung

Hiermit möchte ich mich ganz herzlich bei den Menschen bedanken, die mir bei der Erstellung meiner Doktorarbeit mit Rat und Tat zur Seite gestanden haben:

Bei meinem Doktorvater, Herrn Prof. Höhn, für die sehr gute Betreuung, die stetige Unterstützung und schnellen Korrekturen.

Bei Prof. Schindler und Prof. Haneberg für die freundliche Bereitstellung ihrer Vorlesungsfolien.

Bei Frau Neumann für die zuverlässige Organisation verschiedener Fachartikel.

Bei meiner Familie und meinen Freunden für die Motivation zum Durchhalten.

IX. Lebenslauf

Name: Höfling, Christine Ursula
Geburtstag: 24.05.1980
Geburtsort: Würzburg
Familienstand: ledig, 1 Tochter (Lena Sophie Höfling, geb. 17.06.2001)
Nationalität: Deutsch
Konfession: römisch-katholisch

Aktuelle Arbeitsstelle:

seit Oktober 2006: Assistenzärztin der Urologie; Missionsärztliche Klinik,
Würzburg

Schulbildung:

1986-1990: Johannes-Kepler-Volksschule, Würzburg
1990-1999: St.-Ursula-Gymnasium, Würzburg
Juni 1999: Schulabschluss mit der allgemeinen Hochschulreife
(Leistungskurse: Französisch/Mathematik)

Medizinstudium an der Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg

05/00-03/02: Vorklinische Semester an der Universität Würzburg
Frühjahr 2002: Physikum
04/02-04/05: Klinische Semester an der Universität Würzburg
Frühjahr 2003: 1.Staatsexamen
Frühjahr 2005: 2.Staatsexamen
04/05-03/06: Praktisches Jahr
Mai 2006: 3.Staatsexamen

Promotion: am Institut für Humangenetik

Thema: „Gentherapie bei Fanconi Anämie“

Doktorvater: Prof. Dr. med. Holger Höhn

Lehrstuhlinhaber des Instituts für Humangenetik

Praktische Erfahrungen:

- September-November 1999: Pflegepraktikum in der Missionsärztlichen Klinik Würzburg, in den Abteilungen Pädiatrie und Innere Medizin
- seit November 1999: Ehrenamtliches Mitglied der Johanniter Unfallhilfe: Rettungsdienst, Organfahrdienst
- seit November 2002: Aktive Mitarbeiterin der Arbeitsgemeinschaft Notfallmedizin/Praktikum Notfallmedizin
Dieser Kurs wurde von mir und weiteren Studenten initiiert. Wegen seiner vorbildlichen Ausgestaltung und Durchführung gehört das Praktikum Notfallmedizin mittlerweile zum festen Bestandteil der notfallmedizinischen Ausbildung der Universität Würzburg.
- April-Juli 2004: Ringvorlesung Transplantationsmedizin

Famulaturen:

- August 2002: Innere Medizin, speziell Intensivmedizin
Missionsärztliche Klinik, Würzburg
- September 2003: Urologie
Missionsärztliche Klinik, Würzburg
- März 2004: Neurochirurgie
Gemeinschaftspraxis Drs. Poimann/
Popp/Fröhlich, Würzburg
- Juli/August 2004: Allgemeinmedizin und Diabetologie
Gemeinschaftspraxis R.und G.Geier,
Würzburg
- September 2004: Anästhesie
Missionsärztliche Klinik, Würzburg

Praktisches Jahr:

April-August 2005:	Chirurgie (Allgemein-, Viszeral-, Unfall- und Thorax-Chirurgie) Missionsärztliche Klinik, Würzburg
August-November 2005:	Urologie (Uroonkologie, Harnab- und – umleitung, plastisch-rekonstruktive Urologie, Kinder-Urologie, Transplantationen) Urologische Universitätsklinik, Würzburg
November 2005-März 2006:	Innere Medizin (Nephrologie, Transplantation, Intensivmedizin) Medizinische Klinik und Poliklinik I, Würzburg

Auszeichnungen:

Dezember 2003:	Albert-Kölliker-Lehrpreis der Medizinischen Fakultät der Universität Würzburg für besonders gute Lehre, verliehen an die Arbeitsgemeinschaft Notfallmedizin
----------------	---

Fremdsprachenkenntnisse:

Englisch
Latein
Französisch

Würzburg, den 21.12.2007