

Zeigen primäre Fibroblastenkulturen von Patienten mit Fanconi Anämie eine erhöhte Sensitivität gegenüber UV- und Röntgenstrahlung?

Michael Dürr, Reinhard Kalb, Kristina Jung, Michaela Gross, Matthias Wagner, Sabine Herterich, Detlev Schindler

Zusammenfassung

Das Zellwachstum sowie die Fähigkeit zur Koloniebildung nach Exposition von UV- und Röntgenstrahlung wurde für primäre Fibroblastenkulturen von FA-Patienten aus allen bekannten Komplementationsgruppen bestimmt. Im Unterschied zu den bisher durchgeführten Studien dieser Art erfolgte die Zellkultur unter hypoxischen Bedingungen (5% statt 20% v/v Sauerstoff). Als Negativkontrollen dienten Fibroblastenkulturen von klinisch unauffälligen Personen, als Positivkontrollen wurden dagegen Fibroblasten von Patienten mit den bekannten Strahlenempfindlichkeitssyndromen, Cockayne Syndrom (erhöhte UV-Sensitivität) und Ataxia telangiectasia (erhöhte Sensitivität gegenüber ionisierender Strahlung), herangezogen. Obwohl es bei den Untersuchungen zu linienspezifischen Schwankungen in der Strahlenempfindlichkeit kam, ergaben sich keine systematischen Unterschiede bezüglich der dosisabhängigen Verringerung von Zellwachstum und Klonierungsfähigkeit zwischen FA-Zellen und negativen Kontrollkulturen. Ebenso war kein systematischer Unterschied zwischen den Kulturen der einzelnen Komplementationsgruppen nachweisbar, die Unterschiede in der zellulären Strahlenreaktion zwischen FA-Zellen und positiven Kontrollkulturen waren dagegen hochsignifikant. Bei zwei Fibroblastenkulturen, von zwei Geschwistern aus der Komplementationsgruppe FANCD2, trat im Vergleich zur Negativkontrolle eine leicht erhöhte UV-Sensitivität auf, welche allerdings nicht den Grad der Sensitivität von Cockayne-Fibroblasten erreichte. In dieser Studie konnte, in Übereinstimmung mit der fehlenden Strahlensensitivität bei den bisher verfügbaren murinen Knock-out-Modellen, für FA keine systematische Erhöhung der Strahlenempfindlichkeit bei mesenchymaler Zellen festgestellt werden.

Schlüsselwörter

Fanconi Anämie, primäre Hautfibroblasten, UV-Sensitivität, Strahlensensitivität, Komplementationsgruppen

Summary

Following exposure to UV- and X-irradiation, cell growth and colony survival of primary fibroblast cultures derived from FA patients of all known complementation groups were determined under conditions of reduced (5% v/v) rather than ambient oxygen. Negative controls were fibroblast cultures from clinically normal donors, whereas fibroblast cultures from patients with Cockayne syndrome (UV-sensitivity) and Ataxia telangiectasia (X-ray sensitivity) served as positive controls. There was extensive interstrain variation with respect to UV- and radiosensitivity, but no systematic difference with respect to the dose-related decrease of cell growth and colony survival among FA strains of all complementation groups and negative control strains. In contrast, there were highly significant differences in the radiation response between FA strains and the respective positive controls. One exception was a minor increase of UV-sensitivity of two fibroblast cultures derived from siblings belonging to complementation group FANCD2. As in murine knock-out models of FA, our data provide no evidence for a systematic increase in UV- and X-ray sensitivity of mesenchymal cells derived from any of the known FA-complementation groups.

Keywords

Fanconi anemia, primary fibroblast cultures, UV-irradiation, X-ray sensitivity, complementation groups

Einleitung

Fanconi-Anämie (FA) ist eine autosomal rezessiv vererbte Erkrankung, die durch Mutationen in verschiedenen Genen bedingt wird. Derzeit sind sieben Fanconi-Gene lokalisiert und kloniert [1]. Ähnlich wie die Gene für Ataxia telangiectasia (AT), Werner Syndrom (WS) und Xeroderma Pigmentosum (XP) werden die FA-Gene zur Gruppe der „Caretaker-Gene“ gerechnet, deren Funktion in der Gewährleistung der genetischen Stabilität gegenüber endogener oder exogener Schädigung besteht. Mutationen in den FA-Genen führen dementsprechend zu chromosomaler Instabilität, die neben Entwicklungsstörungen mit Zellzyklusdefekten, Knochenmarksversagen und Neoplasie einhergeht. Die derzeit bevorzugte Behandlungsmethode besteht in einer allogenen Knochenmarkstransplantation von geeigneten Geschwisterspendern; auch die Erfolgsquote bei einer Transplantation zwischen nicht verwandten HLA-kompatiblen Spendern verbessert sich zunehmend [2]. Während seit langem in der Literatur unbestritten ist, dass FA-Fibroblasten eine hohe Empfindlichkeit gegenüber bifunktionellen, alkylierenden Agenzien, wie MMC (Mitomycin C), DEB (Diepoxybutan) und NM (nitrogen mustard) aufweisen, wird eine mögliche Strahlenempfindlichkeit von FA-Zellen kontrovers diskutiert [Übersicht in Referenz 3]. Die wichtigsten *in vivo* Daten zu diesem Thema basieren auf Beobachtungen, welche sich im Rahmen der radiotherapeutischen Behandlung bei Knochenmarkstransplantationen oder im Rahmen von Untersuchungen zur Tumovor-sorge ergaben. Insbesondere das Auftreten von prominenten Hautreaktionen ließ den klinischen Verdacht aufkommen, FA-Fibroblasten besäßen eine erhöhte Radiosensitivität [4]. Im Gegensatz dazu konnten bei einer kürzlich durchgeführten Studie keinerlei cytotoxische Effekte nach einer Ganzkörperbestrahlung mit einer Dosis von 6 Gy beobachtet werden [5]. *In vitro* Studien mit FA-Zellen erbrachten ebenfalls unterschiedliche Ergebnisse. So weisen einige Untersuchungen auf eine erhöhte, andere dagegen auf eine normale Radiosensitivität hin. Zum besseren Verständ-

nis dieser teilweise widersprüchlichen Resultate ist darauf hinzuweisen, dass mit dem gewählten Tests nur jeweils eine Facette des komplexen Phänomens Radiosensitivität erfasst werden kann. Zusätzlich treten zwischen den einzelnen Studien Unterschiede bezüglich des Zelltyps, der Mutationen, der Behandlungsweise und den Kultivierungsbedingungen auf. Weiterhin gibt es Hinweise auf Differenzen zwischen den Komplementationsgruppen. So besaßen in der Studie von Carreau et al. [6] unter den getesteten lymphoblastoiden FA-Zellen die Linien der Komplementationsgruppen D2 (EUFA202), E (EUFA 410), F (EUFA121), G (EUFA 143, EUFA316) und die frühere H (EUFA 173) eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber dem Radiomimetikum Bleomycin. Seit der Zuordnung der FA-H-Linie zur Komplementationsgruppe A [7], bei der keine erhöhte Sensitivität festgestellt wurde, müssen auch Unterschiede innerhalb einer Komplementationsgruppe oder zwischen den Zelllinien in Betracht gezogen werden. Weitere Anzeichen auf eine mögliche IR und UV-Sensitivität von FA-Zellen stammen aus Studien mit den „Chinese hamster ovary (CHO) mutant“- Zelllinien UV40 [8] und NM3 [9]. Beide Linien zeigten eine hohe IR- und UV-Sensitivität, die auf Mutationen in einem Gen zurückgeführt wurden, dessen humanes Homolog FANCG/XRCC9 darstellt. Eine direkte Übertragung der Ergebnisse auf den Menschen gestaltet sich jedoch als äußerst schwierig, da sowohl die unterschiedliche genetische Ausstattung zwischen Mensch und Nager als auch die Möglichkeit von weiteren Mutationen durch die chemische Mutagenese berücksichtigt werden müssen.

Eine mögliche Schlüsselrolle im FA-Pathway kommt dem FANCD2-Gen zu, dessen Translationsprodukt nicht nur durch MMC sondern auch durch IR und UV in einer Zeit- und Dosis-abhängigen Art und Weise aktiviert wird. MMC und Strahlung bewirken die Aktivierung des FANCD2-Proteins, wobei es zu einem Konformationswechsel von der S-Form zur L-Form kommt, begleitet von einer Zunahme der FANCD2-Foci in HeLa Zellen [10]. Mutationen in FANCD2, aber auch in

anderen FA-Genen führen zu einem Fehlen der L-Form nach Bestrahlung. Weiterhin werden keine FANCD2-Foci mehr gebildet, was auf eine Aktivierungsdefizienz schließen lässt. Somit wäre ein molekularer Hinweis für Strahlensensitivität zumindest bei FANCD2 -Zellen gegeben.

Zur Klärung der Frage, ob unter *in vitro* Bedingungen eine Strahlen- und UV-Sensitivität bei humanen FA-Zellen nachweisbar ist, wurden primäre Fibroblasten aus allen bekannten Komplementationsgruppen auf Strahlenempfindlichkeit bezüglich Röntgen- und UV-Strahlung getestet. Dabei wurde zum einen das Proliferationsverhalten und zum anderen die Fähigkeit zur Koloniebildung in Abhängigkeit verschiedener Strahlendosen untersucht. Ein technischer Aspekt, der diese Studie von den bisherigen ähnlichen Studien unterscheidet, ist die Tatsache, dass die Zellen unter hypoxischen Bedingungen kultiviert wurden, um den im Gewebe vorherrschenden Sauerstoffpartialdruck zu imitieren. Dies ist insofern bedeutend, da FA-Zellen eine Abhängigkeit zwischen chromosomaler Instabilität und Sauerstoffpartialdruck zeigen [11]. Weiterhin weisen FA-Fibroblasten unter atmosphärischen Sauerstoffbedingungen ein verlangsamtes Wachstum sowie schlechte Klonierungseigenschaften auf, wogegen unter hypoxischen Bedingungen eine nahezu normale Proliferation und Koloniebildung erreicht werden kann [12].

Material und Methoden

Zellen

Für die Studie wurden primäre Fibroblasten aus allen bekannten Komplementationsgruppen verwendet, wobei für FA-A, FA-C und FA-G mehrere unabhängige Linien und für FA-D1, FA-E, FA-F und FA-H (jetzt FA-A [7]) nur je eine Linie zur Verfügung standen. Die beiden getesteten FA-D2-Linien entstammen einem betroffenen zwillingspaar. Die Zugehörigkeit zu einer Komplementationsgruppe wurde mittels somatischer Zellfusion [13] und/oder durch Auffinden

von Mutationen in einem der bekannten FA-Gene bestimmt.

Zwei Arten von Kontrollen wurden verwendet:

- a) Negativkontrollen (verschiedene unabhängige Fibroblasten-Kulturen von klinisch unauffälligen gesunden Spendern)
- b) Positivkontrollen von Patienten mit bekannter Empfindlichkeit gegenüber ionisierender Strahlung (Ataxia telangiectasia) bzw. UV-Strahlung (Cockayne Syndrom).

Folgende primäre Fibroblastenlinien wurden für diese Studie untersucht: Komplementationsgruppe FA-A (EUFA432, EUFA598, EUFA517, EUFA880), FA-B (HSC230); FA-C (77RD325, EUFA001, VU811, VU911, F97/16, F99/194), FA-D1 (EUFA423), FA-D2 (VU202, VU008), FA-E (EUFA 622), FA-F (EUFA121), FA-G (FA1BER, FA15BER, EUFA316, F99/112) und FA-H (EUFA173), die jetzt zu FA-A gerechnet wird.

Proben von jeder angelegten Kultur wurden nach der 2. oder 3. *in vitro* Passage eingefroren und für die vorliegenden Experimente aufgetaut. Alle verwendeten Fibroblastenlinien wurden mit dem informierten Einverständnis der Patienten angelegt.

Zellkultur/ Datenerhebung

Die in der Zellkultur verwendeten Plastikgegenstände wurden von NUNC (Gibco BRL, Karlsruhe) bezogen. Weiterhin stammten „Minimum essential medium“ (MEM), fötales Kälberserum (FCS), PBS Und Trypsin-EDTA von Gibco BRL.

Alle Reagenzien wurden über den gesamten Zeitraum vom gleichen Hersteller bezogen, um konstante Zellkulturbedingungen zu gewährleisten. Die primären Fibroblasten wurden in Earle's Minimalmedium (MEM) mit 16% fötalen Kälber Serum (FCS) bei 37 °C und einem CO₂-Gehalt von 5,0% kultiviert. Zusätzlich erfolgte im Inkubator eine Einstellung der Sauerstoffkonzentration auf 5,0% (v/v) durch Verdrängung der Raumluft mit Stickstoff. Das Medium wurde alle fünf Tage gewechselt.

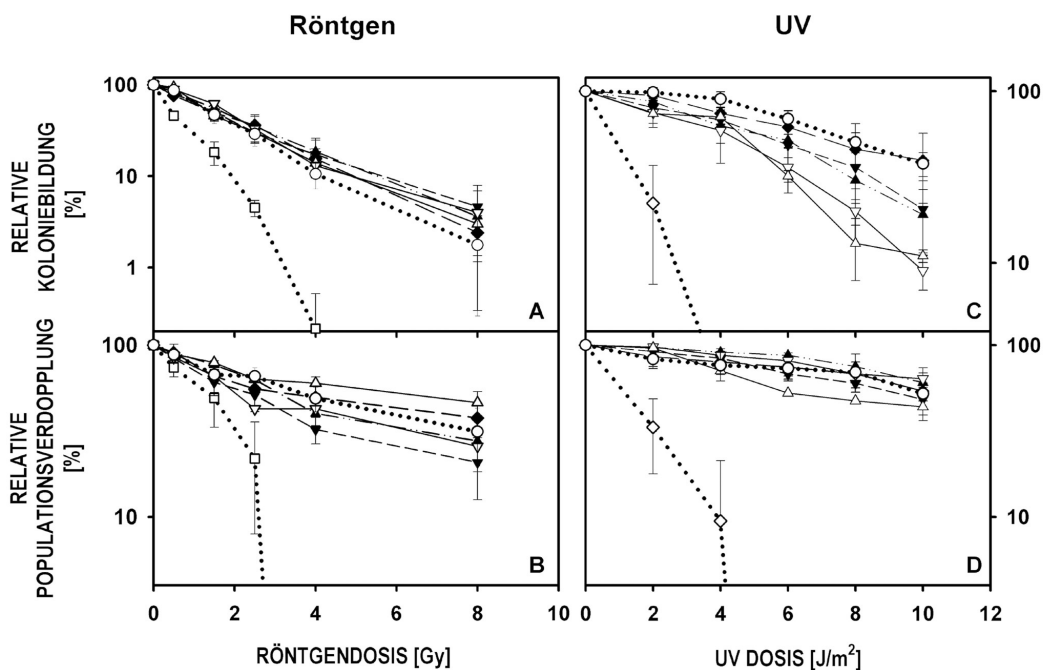


Abb 1-4 Relative Klonierungseffizienz und relatives Zellwachstum von primären FA-Fibroblastenkulturen in Abhängigkeit von Strahlendosis und Genotyp

Koloniebildung (A) und Zellwachstum (B) nach Röntgenbestrahlung;
Koloniebildung (C) und Zellwachstum (D) nach UV-Bestrahlung;

Mittelwerte und Standardabweichungen als Funktion der Strahlendosis der jeweiligen FA-Komplementationsgruppen sind durch unterschiedliche Symbole gekennzeichnet und zur besseren Unterscheidbarkeit durch Linien mit unterschiedlichen Symbolen verbunden. Für jede der Komplementationsgruppen wurden 3-5 Zellkulturen unterschiedlicher Spender getestet:
FA-Komplementationsgruppen: FA-A (Δ), FA-C (\blacklozenge), FA-G (∇);
Symbole der Positivkontrollen: CS (\blacksquare) und AT (\blackleftarrow);
Symbol der Negativkontrollen: (O).
Die Mittelwerte der jeweiligen Kontrollen wurden aus den Einzelwerten von jeweils 3-5 Zellkulturen berechnet und zur besseren Unterscheidung mit gepunkteten Linien verbunden.

Behandlung

Für die Untersuchungen wurden zwei auf Zellwachstum beruhende Testsysteme verwendet, die jeweils entsprechend der Strahlungsquelle modifiziert wurden.

1) Zur Bestrahlung von Fibroblasten mit ionisierender Strahlung (^{60}Co -Quelle) wurden je 55.000 Zellen (1,1 ml) aus einer subkonfluenten Kultur in 1,8 ml Einfrier-Caps überführt. Ein Gefäß wurde als 0-Wert mitgeführt, wogegen die Zellen in den anderen Caps einer Strahlung von 0,5, 1,5, 2,5, 4,0 bzw. 8,0 Gy ausgesetzt wurden. Anschließend wurden diese in 25 cm² Gewebekulturflaschen transferiert, in denen bereits 10 ml Nährmedium vorgelegt waren. Daraus entnommene

Aliquots von 3 x 500 Zellen wurden zur Ermittlung der Klonierungseffizienz in 60 mm Ø Petrischälchen mit 5 ml Medium eingesät. Die in der Flasche verbleibenden 53.500 Zellen wurden für 5 Tage kultiviert und anschließend in einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer gezählt. Die Anzahl der Populationsverdopplungen $P(t)$ wurde mit folgender Formel berechnet:

$$P(t) = (\log A(t) - \log A_0) / \log 2$$

$P(t)$ = Anzahl der Populationsverdopplungen bezogen auf die ursprüngliche eingesäte Anzahl

$A(t)$ = Gesamtzellzahl 5 Tage nach Strahlenexposition

A_0 = Anzahl der eingesäten Zellen

Zur Ermittlung der Klonierungseffizienz, d.h. der Fähigkeit einzelner Zellen Kolonien auszubilden, wurden nach 12-14 Tagen die in den 60 mm Ø Petrischalen gewachsenen Kolonien mit Kristallviolett (1% Kristallviolett, 20% Ethanol) fixiert und angefärbt und durch zwei unabhängige Personen gezählt, wobei die Übereinstimmung zwischen den Zählern über 95% lag. Zur Vermeidung von wachstumsabhängigen Ungenauigkeiten wurde bei der Auswertung für jeden Messwert der Mittelwert aus den drei parallel angelegten Petrischalen verwendet. Die beschriebenen Bedingungen wurden nach Pomp et al. [15] gewählt, da sowohl die Dauer der Kultivierung als auch die Zelldichte beim Einsäen der Zellen ei-

nen Einfluss auf den Test besitzen kann.

- Die Exposition der Zellen mit UV-Licht erfolgte in 60 mm Ø Petrischalen. Dabei wurden 53.500 Zellen zur Ermittlung der Populationsverdopplungen und 500 Zellen zur Bestimmung der Klonierungseffizienz eingesät. Den Zellen wurde die Möglichkeit gewährt, sich über Nacht am Untergrund festzuheften. Anschließend wurde für die Dauer des Bestrahlungsvorganges das Medium vollständig entfernt. Die Bestrahlung erfolgte unter einer UVLA-Lampe (Typ 3.260 002, Schütt, Göttingen), die vor jedem Versuch mit Hilfe eines UV-C Dosimeter (Kuehnast, Waechtersbach) kalibriert wurde, um eine konstante Strahlungsdosis zu gewährleisten. Für die Datenerhebung wurde entsprechend den Röntgenversuchen verfahren.

Für einen numerischen Vergleich des Strahlenverhaltens zwischen den einzelnen Zelllinien wurden die aus Originaldaten erstellten Dosis-Wirkungskurven für die Berechnung der EC50-Werte verwendet. Die EC50 Werte geben die Strahlungsdosis an, bei der noch die Hälfte der eingesäten Zellen zum Zeitpunkt der Messung leben.

Ergebnisse

Sensitivität gegenüber Röntgenstrahlung

Der Vergleich der relativen Kolonienzahl in Abhängigkeit der Röntgendosis (Abb. 1A) zeigt, dass trotz linsenspezifischer Variationen, die bei allen Gruppen auftreten, keine systematischen Unterschiede zwischen den Fanconi-Zellen und den Negativkontrollen existieren. Dies gilt auch für die von uns getesteten FANCD2 Kulturen. Ein grundsätzlich vergleichbares Ergebnis wurde bei der Untersuchung des Wachstumsverhaltens in der Massenkultur erzielt (Abb. 1B). Trotz einer erheblichen Schwankungsbreite zwischen den einzelnen Mittelwerten ist bei allen getesteten Komplementationsgruppen bei 8 Gy noch ein höheres Wachstum zu ver-

zeichnen als bei AT nach einer Strahlungsdosis von 2,5 Gy. Bei den als Positivkontrollen verwendeten AT-Zellen ist bereits bei einer Strahlungsdosis von 4 Gy kein Netto-Wachstum mehr festzustellen, wogegen Fanconi-Zellen noch ein relatives Wachstum von 30 % besitzen.

Sensitivität gegenüber UV-Strahlung

In Abbildung 1C wird die relative Fähigkeit zur Koloniebildung in Abhängigkeit von der UV-Dosis dargestellt. Die Mittelwertskurven von FANCA und FANCG weisen im Verhältnis zur Negativkontrolle eine geringfügig erhöhte Dosisabhängigkeit auf. Die Auswertung der Daten für die einzelnen Zellkulturen ergab eine relativ hohe Variation innerhalb der jeweiligen Komplementationsgruppen, wobei einzelne FANCA- und FANCG-Kulturen eine geringfügig erhöhte UV-Sensitivität zeigten. Ebenso war bei den beiden untersuchten FANCD2 Linien nach UV-Exposition eine verminderte Koloniebildung zu verzeichnen. Keine einzige der FA-Fibroblastenstämmen zeigte jedoch eine vergleichbar hohe UV-Sensitivität wie die Kulturen der CS-Positivkontrollen.

Die entsprechenden Daten zur Populationsverdopplung (Abb. 1D) bestätigen, dass nach einer UV-Exposition kein systematischer Unterschied im Verhalten zwischen Negativkontrollen und FA-Zellen auftritt. Eine FANCD2-Linie zeigte zwar einen erhöhten Abfall bei einer Dosis zwischen 6 und 8 J/m², bei einer Dosis von 10 J/m² stimmt das relative Wachstum jedoch wieder mit der Negativkontrolle überein. Die UV-sensitiven CS-Linien dagegen werden schon bei einer Dosis von 2 J/m² in ihrem Wachstum stark beeinträchtigt; ab einer Dosis von 6 J/m² ist kein Wachstum mehr nachweisbar.

Statistik

Ein statistischer Vergleich der durchschnittlichen EC50-Werte für die Komplementationsgruppen A, C und G, von denen jeweils mehr als drei unabhängige Zellkulturen verfügbar waren, bestätigt die oben beschriebenen Ergebnisse: Bei allen Versuchsansätzen sind die verwendeten

Positivkontrollen signifikant verschieden ($p < 0.01$), wohingegen die Mehrzahl der Fanconi-Linien keine signifikanten Abweichungen von der Positivkontrollen aufweisen. Dies gilt ohne Ausnahme bei den Versuchen mit ionisierender Strahlung. Nach UV-Exposition ergeben sich an Hand der Koloniebildung für die Gruppen FANCA, FANCG und FANCD2 Hinweise auf eine leicht erhöhte Sensitivität. Die durchschnittlichen EC50-Werte für diese Gruppen (EC50 für Koloniebildung nach UV-Bestrahlung: Positivkontrolle $8,19 \pm 0,92$ [J/m²], Negativkontrolle $1,35 \pm 0,24$ [J/m²], FA-A $5,77 \pm 1,06$ [J/m²], FA-C $8,42 \pm 2,46$ [J/m²], FA-G $5,98 \pm 0,87$ [J/m²]) liegen jedoch deutlich über dem der Positivkontrolle. In Massenkultur zeigten sich zwischen den FA-Kulturen und den Negativkontrollen keinerlei Unterschiede im Wachstumsverhalten. Es muss jedoch darauf hingewiesen werden, dass die statistischen Berechnungen auf einer geringen Stichprobenzahl basieren und daher lediglich als Tendenz interpretiert werden können.

Diskussion

Die Bestrahlung von primären Fibroblastenkulturen aller bisher bekannten FA-Komplementationsgruppen mit UV- und Röntgenstrahlung ergab im Vergleich zu den jeweiligen positiven und negativen Kontrollen folgende Ergebnisse:

- Mit AT-Zellen als Positivkontrolle ist unter den gewählten Bedingungen für keine der FA-Komplementationsgruppen eine erhöhte Radiosensitivität feststellbar. Vielmehr folgen die FA-Fibroblasten demselben Dosis-abhängigen Wachstums- und Klonierungsverhalten wie die Negativkontrollen. Ein gewisses Variationsspektrum im Verhalten der Fibroblastenkulturen wird bei allen Untersuchungen dieser Art von Test berichtet [z.B. 16, 17]. Die Variationen beruhen unter anderem auf Unterschieden der ursprünglichen Zellzusammensetzung, dem Zellalter, den Zellkulturbedingungen, und der Mediumzusammensetzung. Darüber hinaus trägt auf der Genotyp des Spenders zur Heterogenität bei [18-20].

Auch bei den beiden FA-D2 Fibroblastenkulturen konnte keine erhöhte Radiosensitivität beobachtet werden. Dieses Ergebnis scheint dem ursprünglichen Bericht über die Strahlensensitivität des FANCD2-Genproduktes zu widersprechen, bei dem die SV40-transformierten FANCD2 Fibroblasten Radiosensitivität zeigten [10]. Diese offensichtliche Diskrepanz ist unerwartet, da eine Transformation von humanen diploiden Fibroblasten durch SV40 T-Antigen oder HPV16 E-Gen normalerweise zu einer erniedrigten, nicht aber zu einer erhöhten Radiosensitivität führt [21-24]. Eine mögliche Erklärung dafür wäre, dass die hier vorgelegte Studie die erste ist, die unter hypoxischen Bedingungen durchgeführt wurde, womit der physiologische Sauerstoffpartialdruck *in vivo* nachgeahmt wurde. Hohe O₂-Konzentrationen können bei primären FA-Fibroblasten, nicht aber bei transformierten FA-Zellen, zu einer Störung des Zellzyklus führen [11, 12, 25]. Daher wird auch von einer protektiven Funktion der FA-Genprodukte gegenüber reaktiven Sauerstoff-Species ausgegangen [26]. Die durch IR verursachten Schäden basieren im Wesentlichen auf der Bildung von reaktiven Sauerstoff-Intermediaten [27]. Daher wäre es denkbar, dass bei FA-Zellen keine großen und systematischen Störungen in der Erkennung und/oder Reparatur von IR-induzierten Schäden feststellbar sind, solange diese unter hypoxischen Kulturbedingungen getestet werden und damit der Hintergrund an endogen bedingten Schädigungen niedrig gehalten wird.

Radiosensitivität wird in dieser Arbeit als eine gesteigerte cytotoxische, cytostatische oder anti-proliferierende Reaktion auf IR (oder UV-Licht) interpretiert, was sinngemäß der allgemein üblichen Definition für Sensitivität von Bakterien gegenüber Antibiotika entspricht. Andere Arten von Tests beschreiben die Reaktion auf IR (oder UV) als einen kurzzeitigen biochemischen Effekt, erkenntlich durch DNA-Fragmentierung, Aktivierung der L-Form des FANCD2-Proteins oder durch

die Bildung von nukleären Foci [3, 10]. Insgesamt erscheinen die komplexen Ursachen der zellulären Strahlenantwort durch Messparameter wie eine Comet-Bildung im Comet-Assay, eine fehlende Modifikation eines Proteins wie im Falle von FANCD2, oder die Verringerung von nukleären Foci nur teilweise erfassbar. Die hier vorgelegten Untersuchungen geben also lediglich Hinweise auf Änderungen von Wachstumsverhalten und Klonierungseffizienz nach Strahlenexposition, wie sie unter den gegebenen experimentellen Bedingungen in primären Fibroblastenkulturen als Funktion des jeweiligen Genotyps beobachtet werden.

2) Die Untersuchungen ergaben keinen Hinweis auf eine erhöhte Radiosensitivität von FANCD2 Fibroblasten. Im Hinblick auf UV-Sensitivität findet im Kolonietest bei beiden FANCD2-Linien ein verstärkter Dosis-abhängiger Abfall statt. Zur Bestätigung dieses Verhaltens als ein Charakteristikum von FANCD2-Zellen müssen jedoch weitere, genetisch unabhängige Linien getestet werden, um auszuschließen, dass dieses atypische Verhalten der beiden verfügbaren FANCD2-Linien, die von Geschwistern stammen, nicht durch den speziellen genetischen Background beeinflusst wird. Auch muss die Frage derzeit unbeantwortet bleiben, warum sich die verminderte Klonierungseffizienz nicht in einer Verminderung des Zellwachstums der Massenkultur widerspiegelt. Es kann nur darüber spekuliert werden, dass der hundertfache Unterschied in der Aussaatdichte über einen Mechanismus von metabolischer Kooperation und/oder Bystander-Effekt [31] zu diesen unterschiedlichen Ergebnissen beigetragen hat.

3) Im Vergleich zu CS-Zellen zeigen FA-Fibroblasten keine erhöhte UV-Sensitivität, insbesondere wenn das Wachstum bei höheren Einsatzzellichten als Maßstab herangezogen wird. Die beiden Komplementationsgruppen FA-A und FA-G zeigen jedoch im Verhältnis zu den Negativkontrollen eine leicht er-

niedrigte Klonierungseffizienz bei höherer UV-Dosis, wobei die EC50-Werte nahe an der Signifikanzgrenze liegen. Für FA-A würde allerdings keine Signifikanz mehr bestehen, wenn die FA-H-Linie, die inzwischen der FA-A-Gruppe zugeordnet wurde [7], in die Statistik einbezogen würde. Die hier beobachtete leicht erhöhte UV-Sensitivität von FA-A- und FA-G-Fibroblasten erscheint erwähnenswert, wenn man berücksichtigt, dass FANCG als das menschliche Homolog zu dem Gen isoliert wurde, welches ursprünglich in UV-sensitiven „Chinese hamster ovary (CHO) mutant“-Linien UV40 und NM3 [8,9,28] entdeckt worden war. Die Empfindlichkeit der FANCG-Linien gegenüber UV ist aber eher geringfügig und in keiner Weise mit der von CS-Zellen zu vergleichen. Hinzu kommt, dass eine große Variation zwischen den einzelnen Linien existiert. Einige Linien zeigen eine vollkommen normale Dosis-Antwort. Dies ist konform mit der Erkenntnis, dass die Mehrzahl der DNA-Schäden, die durch UV-Strahlung induziert werden, durch den Mechanismus der Nukleotid-Exzisions-Reparatur behoben werden – ein Prozess der in FA-Zellen normal funktioniert [29]. Auf dem Hefe „two-Hybrid-System“ beruhende Studien zeigen eine stärkere Interaktion zwischen FANCA und FANCG als zwischen den anderen FA-Proteinen. Betrachtet man das UV-Verhalten dieser beiden Komplementationsgruppen unter diesem Aspekt, so ist die gemeinsame leichte Erhöhung der UV-Sensitivität möglicherweise auf eine enge funktionelle Verbundenheit dieser Proteine zurückzuführen.

Abgesehen von kleinen Abweichungen bei FANCA, FANCG und FANCD2 nach UV-Exposition stimmt die zelluläre Reaktion von FA-Fibroblasten nach UV bzw. Röntgenstrahlung mit der von nicht FA-Kontrollen überein. Folglich beeinflusst weder die Art der Mutation noch die Zugehörigkeit zu einer Komplementationsgruppe die Strahlenreaktion der primären Fibroblastenkulturen. Schwankungen zwischen den ein-

zelenen Linien wurden in vielen vergleichbaren Experimenten beobachtet und spiegeln vermutlich die individuelle genetische Ausstattung sowie kleine Unterschiede im Zellwachstum und den Kultivierungsbedingungen wider. In diese Richtung geht auch die eingangs zitierte Studie von Carreau et al. [6], in welcher FA-Lymphoblasten auf eine Sensitivität gegenüber diverser Agenzien sowie gegenüber UV-Strahlung getestet wurden. Dabei zeigte sich, dass generell ein relativ große Schwankungen zwischen den einzelnen Zelllinien auftraten, obgleich keine systematische Differenzen zu erkennen waren. Leichte Unterschiede in der effektiven UV-Dosis können bei Suspensionskulturen auf methodischen Artefakten basieren. Es ist nämlich nur schwer möglich, das Medium vollständig abzunehmen, wodurch eine teilweise Absorption der UV-Strahlung durch Medium, Plastik oder Glas nicht auszuschließen ist. Hinsichtlich der von Carreau et al. [6] beobachteten Sensitivität gegenüber Bleomycin, welches bei einigen Zelllinien auftrat, ist zu berücksichtigen, dass die Wirkung von Klastogenen in Abhängigkeit vom jeweiligen Zelltyp variieren kann. So wurden bereits in früheren Studien [32] von gewebespezifischen Unterschieden bezüglich einer Radiosensitivität zwischen FA-Lymphozyten und Fibroblasten berichtet. Dies wird weiterhin durch eine neuere Untersuchung belegt, in der Unterschiede in Effizienz der DNA-Reparatur von Doppelstrangbrüchen zwischen Fibroblasten und Lymphozyten von FA-Patienten nachgewiesen wurden [33]. Ein anderes Beispiel für Zelltyp-abhängige Reaktionsunterschiede ist die Beobachtung, dass die Zugabe von quervernetzenden Substanzen bei FA-Lymphoblasten zu Apoptose führt, während FA-Fibroblasten im 4C-Stadium liegen bleiben. Ein Teil davon erholt sich wieder und setzt seinen Zellzyklus fort [34]. Noch ungeklärt ist die Frage, ob FA-Lymphoblasten [6, 35] auch unter hypoxischen Bedingungen radiosensitiv sind.

In der radiotherapeutischen Praxis wird im Allgemeinen von einer positiven Korrelation zwischen *in vivo* und *in vitro* Radiosensitivität ausgegangen [37]. Werden Zellen von FA-Patienten *in vitro* auf ihre Empfindlichkeit gegenüber Strahlung oder Klastogenen untersucht, muss berücksichtigt werden, dass ein *in vitro* Test nicht zwangsläufig das *in vivo* Verhalten repräsentiert, so trat beispielsweise während der radiotherapeutischen Behandlung eines FA-Patienten gegen ein Tonsillarkarzinom eine starke Gewebsreaktion auf, die mit den gängigen *in vitro* Tests zur Radiosensitivität nicht nachvollzogen werden konnte [38]. Von 14 FA-Patienten, die wegen Tumorerkrankungen mit ionisierender Strahlung behandelt wurden, zeigten 6 Hinweise auf strahlenbedingte Toxizität [39]. Unterschiedliche Reaktionsweisen in Abhängigkeit von Zelltyp und Testbedingungen komplizieren ohne Zweifel die Interpretation von Strahlensensitivitätstests. Im Falle unserer Studie, bei denen Zellen von Patienten mit bekannter Strahlenempfindlichkeit (AT und CS) als positive Kontrollen herangezogen wurden, steht es außer Zweifel, dass FA-Fibroblasten unabhängig von ihrer jeweiligen Komplementation zugehörigkeit keine vergleichbar hohe UV- oder Röntgen-Sensitivität zeigen. Eine geringfügige Strahlensensitivität, welche weit unterhalb der positiven Kontrollen anzusetzen wäre, kann mit unserem Versuchsansatz nicht ausgeschlossen werden. Kleinere Schwankungen, die in unserer Studie insbesondere nach UV-Exposition beobachtet wurden, sollten in Anbetracht der multiplen endogenen und exogenen Variablen der Strahlenantwort jedoch mit Vorsicht interpretiert werden.

Danksagung

Die Autoren danken Hans Joenje (Amsterdam) und Martin Digweed (Berlin) für die freundliche Überlassung von Fibroblastenkulturen verschiedener Komplementationsgruppen sowie dem Schroeder-Kurth-Fonds und der Deutschen Fanconi-Anämie-Hilfe für finanzielle Unterstützung.

Anmerkung

Michael Dürr und Reinhard Kalb sind Erstautoren dieses Artikels.

Literaturverzeichnis

- [1] Joenje H, Patel KJ (2001) The emerging genetic and molecular basis of Fanconi anaemia, Nat. Rev. Genet. 2: 446-457
- [2] Guardiola P, Pasquini R, Dokal I, Ortega JJ, van Weel-Sipman M, Marsh JCW, Ball SE, Locatelli F, Vermynen C, Skinner R, Ljungman P, Miniero R, Shaw PJ, Souillet G, Michallet M, Bekassy AN, Krivan G, Di Bartolomeo P, Heilmann C, Zanesco L, Cahn JY, Arcese W, Bacigalupo A, Gluckman E (2000) Outcome of 69 allogeneic stem cell transplantations for Fanconi anemia using HLA-matched unrelated donors: a study on behalf of the European Group for Blood and Marrow Transplantation, Blood 95: 422-429.
- [3] Djuzenova CS, Rothfuss A, Oppitz U, Speit G, Schindler D, Hoehn H, Flentje M (2001) Response to X-irradiation of Fanconi anemia homozygous and heterozygous cells assessed by the single-cell gel electrophoresis (comet) assay, Lab. Invest. 81: 185-192.
- [4] Gluckman E (1990) Radiosensitivity in Fanconi anemia: application to the conditioning for bone marrow transplantation, Radiother. Oncol. 18 Suppl. 1: 88-93.
- [5] MacMillan ML, Auerbach AD, Davies SM, DeFor TE, Gillio A, Giller R, Harris R, Cairo M, Dusenbery K, Hirsch B, Ramsay NKC, Weisdorf DJ, Wagner JE (2000) Haematopoietic cell transplantation in patients with Fanconi anaemia using alternate donors: results of a total body irradiation dose escalation trial, Br. J. Haematol. 109: 121-129.
- [6] Carreau M, Alon N, Bosnoyan-Collins L, Joenje H, Buchwald M (1999) Drug sensitivity spectra in Fanconi anemia lymphoblastoid cell lines of defined complementation groups, Mutat. Res. 435: 103-109.
- [7] Joenje H., Levitus M., Waisfisz Q, D'Andrea A, Garcia-Higuera I, Pearson T, van Berkel CG, Rooimans MA, Morgan N, Mathew CG, Arwert F (2000) Complementation analysis in Fanconi anemia: assignment of the reference FA-H patient to group A, Am. J. Hum. Genet. 67: 759-762.
- [8] Busch DB, Zdzienicka MZ, Natarajan AT, Jones NJ, Overkamp WJ, Collins A, Mitchell DL, Stefanini M, Botta E, Albert RB, Liu N, White DA, van Gool AJ, Thompson LH (1996) A CHO mutant, UV40, that is sensitive to diverse mutagens and represents a new complementation group of mitomycin C sensitivity, Mutat. Res. 363: 209-221.
- [9] Wilson JB, Johnson MA, Stuckert AP, Trueman KL, May S, Bryant PE, Meyn RE, D'Andrea AD, Jones NJ (2001) The Chinese hamster FANCG/XRCC9 mutant NM3 fails to express the monoubiquitinated form of the FANCD2 protein, is hypersensitive to a range of DNA damaging agents and exhibits a normal level of spontaneous sister chromatid exchange, Carcinogenesis 22: 1939-1946.
- [10] Garcia-Higuera I, Taniguchi T, Ganesan S, Meyn MS, Timmers C, Hejna J, Grompe M, D'Andrea AD (2001) Interaction of the Fanconi

anemia proteins and BRCA1 in a common pathway, *Mol. Cell.* 7: 249-262.

[11] Joenje H, Arwert F, Eriksson AW, de Koning H, Oostra AB (1981), Oxygen-dependence of chromosomal aberrations in Fanconi's anaemia, *Nature* 290: 142-143.

[12] Schindler D, Hoehn H (1988) Fanconi anemia mutation causes cellular susceptibility to ambient oxygen, *Am. J. Hum. Genet.* 43: 429-435.

[13] Joenje H, Oostra AB, Wijker M, di Summa FM, van Berkel CGM, Rooimans MA, Ebell W, van Weel L, Pronk JC, Buchwald M, Arwert F (2001) Evidence for at least eight Fanconi anemia genes, *Am. J. Hum. Genet.* 61: 940-924.

[14] Fanconi Anemia Mutation Database, The Rockefeller University, <http://www.rockefeller.edu>.

[15] Pomp J, Wike JL, Ouwerkerk IJM, Hoogstraten C, Davelaar J, Schrier PI, Leer JWH, HD Thames, Brock WA (1996) Cell density dependent plating efficiency affects outcome and interpretation of colony forming assays, *Radiother. Oncol.* 40: 121-125.

[16] Little JB, Nove J, Strong LC, Nichols WW (1998) Survival of human diploid skin fibroblasts from normal individuals after X-irradiation, *Int. J. Radiat. Biol.* 54: 899-910.

[17] Little JB, Nove J (1990) Sensitivity of human diploid fibroblast cell strains from various genetic disorders to acute and protracted radiation exposure, *Radiat. Res.* 123: 87-92.

[18] Nagasawa H, Little JB (1988) Radiosensitivities of ten apparently normal human diploid fibroblast strains to cell killing, G2-phase chromosomal aberrations, and cell cycle delay, *Cancer Res.* 48: 4535-4538.

[19] Ma S, Fang RH, Chang WP (1996) Heterogeneity in radiosensitivity of human diploid fibroblasts from keloids and normal skins, *Cell Biol. Int.* 20: 289-292.

[20] DeSimone JN, Dolezalova H, Redpath JL, Stanbridge EJ (2000) Prolonged cell cycle arrest in irradiated human diploid skin fibroblasts: the role of nutrient deprivation, *Radiat. Res.* 153: 131-143.

[21] L.N. Su, J.B. Little, Transformation and radiosensitivity of human diploid skin fibroblasts transfected with activated ras oncogene and SV40 T-antigen, *Int. J. Radiat. Biol.* 62 (1992) 201-210.

[22] Su LN, Little JB (1992) Transformation and radiosensitivity of human diploid skin fibroblasts transfected with SV40 T-antigen mutants defective in RB and P53 binding domains, *Int. J. Radiat. Biol.* 62: 461-468.

[23] Tsang NM, Nagasawa H, Li C, Little JB (1995) Abrogation of p53 function by transfection of HPV16 E6 gene enhances the resistance of human diploid fibroblasts to ionizing radiation, *Oncogene* 10: 2403-2408.

[24] Kuehl BL, Brezden CB, Traver RD, Siegel D, Ross D, Renzing J, Rauth AM (1996) Immortalisation of a human diploid fibroblast cell strain: a DT-diaphorase paradox, *Br. J. Cancer* 27: Suppl S19-22.

[25] Saito H, Hammond AT, Moses RE (1993) Hypersensitivity to oxygen is a uniform and secondary defect in Fanconi anemia cells, *Mutat. Res.* 294: 255-262.

[26] Futaki M, Igarashi T, Watanabe S, Kajigaya S, Tatsuguchi A, Wang J, Liu JM (2002) The FANCG Fanconi anemia protein interacts with CYP2E1: possible role in protection against oxidative DNA damage, *Carcinogenesis* 23: 67-72.

[27] Iyer R, Lehnert BE (2000) Effects of ionizing radiation in targeted and nontargeted cells, *Arch. Biochem. Biophys.* 376: 14-25.

[28] de Winter JP, Waisfisz Q, Rooimans MA, van Berkel CGM, Bosnoyan-Collins L, Noa Alon, Carreau M, Bender O, Demuth I, Schindler D, Pronk JC, Arwert F, Hoehn H, Digweed M, Buchwald M, Joenje H (1998) The Fanconi anaemia group G gene FANCG is identical with XRCC9, *Nat. Genet.* 20: 281-283.

[29] Hansson J, Keyse SM, Lindahl T, Wood RD (1991) DNA excision repair in cell extracts from human cell lines exhibiting hypersensitivity to DNA-damaging agents, *Cancer Res.* 51: 3384-3390.

[30] Reuter T, Herterich S, Bernhard O, Hoehn H, Gross HJ (2000) Strong FANCA/FANCG but weak FANCA/FANCC interaction in the yeast 2-hybrid system, *Blood* 95: 719-720.

[31] Ward JF (2002), The radiation-induced lesions which trigger the bystander effect, *Mutat Res* 499: 151-154.

[32] Duckworth-Rysiecki G, Taylor AM (1985) Effects of ionizing radiation on cells from Fanconi's anemia patients, *Cancer Res.* 45: 416-420.

[33] Donahue SL, Lundberg R, Campbell C (2001) Deficient *in vivo* DNA end-joining in Fanconi anemia fibroblasts, *Am. J. Hum. Genet.* 69: Suppl 216.

[34] Akkari YMN, Bateman RL, Reifsteck CA, D'Andrea AD, Olsen SB, Grompe M (2001) The 4N cell cycle delay in Fanconi anemia reflects growth arrest in late S phase, *Mol. Genet. Metabol.* 74: 403-412.

[35] Gatti RA (2001) The inherited basis of human radiosensitivity, *Acta Oncol.* 40: 702-711.

[36] Koomen M, Cheng NC, van de Vrugt HJ, Godthelp BC, van der Valk MA, Oostra AB, MZ Zdzienicka, Joenje H, Arwert F (2002) Reduced fertility and hypersensitivity to mitomycin C characterize Fancg/Xrcc9 null mice, *Hum. Mol. Genet.* 11: 273-281.

[37] Loeffler JS, Harris JR, Dahlberg WK, Little JB (1990) In vitro radiosensitivity of human diploid fibroblasts derived from women with unusually sensitive clinical responses to definitive radiation therapy for breast cancer, *Radiat. Res.* 121: 227-231.

[38] Marcoua Y, D'Andrea A, Jeggo PA, Plowman PN (2001) Normal cellular radiosensitivity in an adult Fanconi anaemia patient with marked clinical radiosensitivity, *Radiother. Oncol.* 60: 75-79.

[39] Alter B Radiosensitivity in Fanconi's anemia patients. *Radiother Oncol* 62:345.