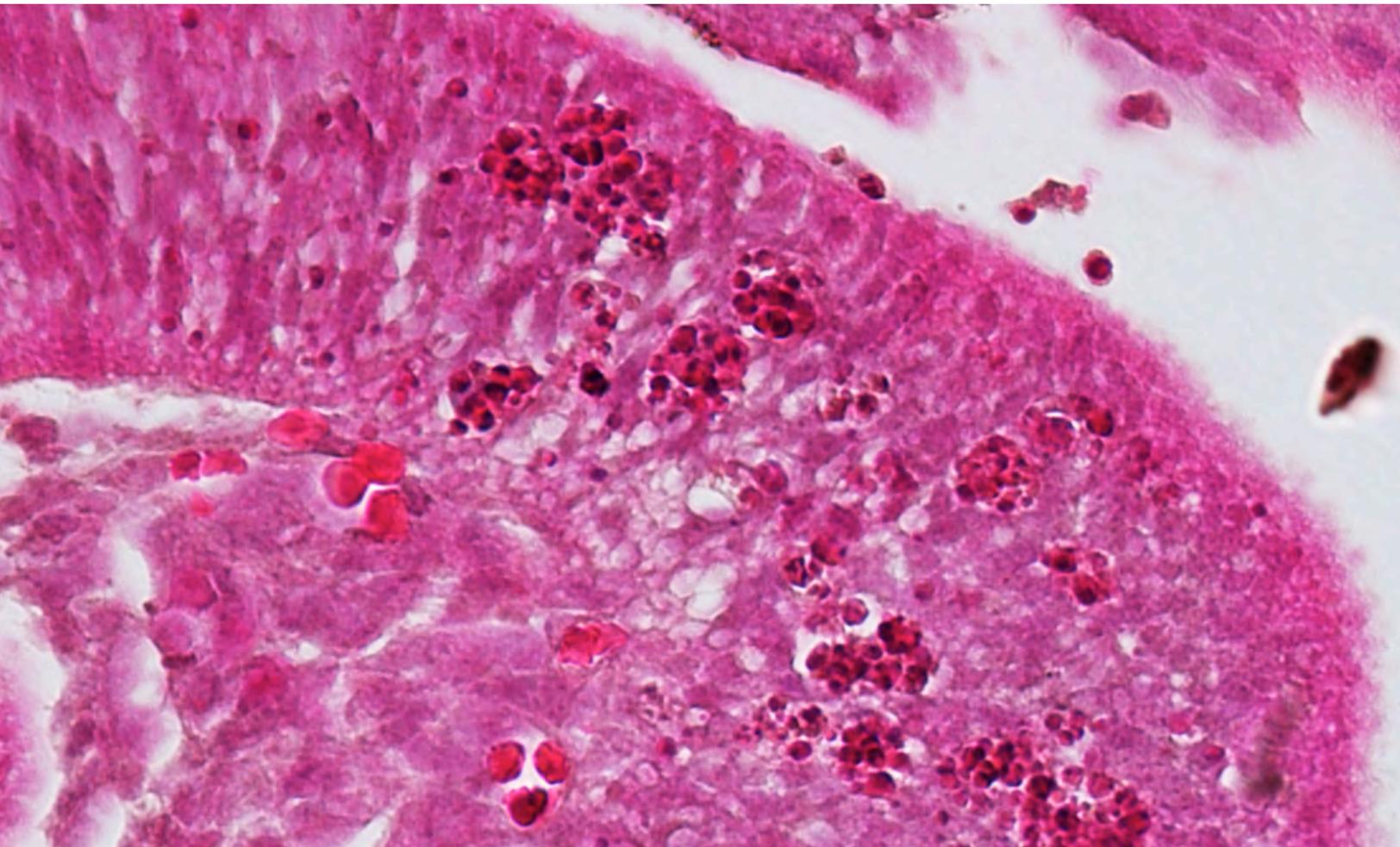




UNIVERSIDAD DE CANTABRIA
DEPARTAMENTO DE ANATOMÍA Y BIOLOGÍA CELULAR
HUMV-IFIMAV

**“ESTUDIO INTEGRADO SOBRE LA ANEMIA DE
FANCONI: APROXIMACIÓN A LAS BASES
MOLECULARES DEL FALLO MEDULAR
Y DE LA MICROFTALMIA”**

INÉS PRIETO REMÓN
TESIS DOCTORAL





**Estudio integrado sobre la Anemia de Fanconi:
Aproximación a las bases moleculares
del fallo medular y de la microftalmia**

Inés Prieto-Remón

Santander, España 2012



Universidad de Cantabria
Facultad de Medicina
Departamento de Anatomía y Biología Celular
HUMV-IFIMAV

**Estudio integrado sobre la Anemia de Fanconi:
Aproximación a las bases moleculares
del fallo medular y de la microftalmia**

Doctorando:
Inés Prieto-Remón

Director: Doctor **Carlos Pipaón González**

Facultad de Medicina

Departamento de Anatomía y Biología Celular

HUMV-IFIMAV

D. Carlos Pipaón González, Doctor en Biología Molecular, CERTIFICO:

Que Dña. Inés Prieto Remón ha realizado, bajo mi dirección, el trabajo titulado: “Estudio integrado sobre la Anemia de Fanconi: aproximación a las bases moleculares del fallo medular y de la microftalmia”.

Considero que este trabajo tiene originalidad y calidad científica suficientes para ser presentado como Tesis para obtener el grado de Doctor.

Avenida Herrera Oria s/n 39011 Santander, Cantabria

La investigación llevada a cabo en esta tesis se desarrolló en el laboratorio de Hematología Molecular del Departamento de Hematología y Hemoterapia, en el Hospital Universitario Marqués de Valdecilla; y en el Departamento de Anatomía y Biología Celular de la Facultad de Medicina, en la Universidad de Cantabria. La investigación fue sufragada con becas del Instituto de Salud Carlos III-Fondo de Investigaciones Sanitarias (PI09/01533).

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis va dedicada a los pacientes con anemia de Fanconi y a sus familias. Con cariño para MGC y su familia. Y a los grupos “Fanconianos” de Barcelona y Madrid, por su apoyo y su afecto.

Desde que finalicé la carrera de Bioquímica en la Universidad del País Vasco tuve claro que quería trabajar en investigación aplicada a la biomedicina. La primera oportunidad me la dio el Dr. Felipe Prósper, en Pamplona, al que siempre le mostraré mi gratitud y cariño. No sólo por darme la oportunidad de comenzar a formarme en la vida del laboratorio donde me “enganché” a la investigación, sino también porque durante mis años allí conocí a gente a la que siempre recordaré con mucho cariño y a la que dedico esta tesis (Bea, Miguel, Maialen, María, Edurne A, Manu, Saray, Tania, Miriam, Goreti, Maitane, Quique, Angelo, Virginia, Lucía, Xabi, Leire, Edurne, Pablo y Amaia).

Mi siguiente destino fue la empresa de biotecnología Proteomika S.L. en el parque tecnológico de Zamudio donde pasé otra muy buena temporada y de la que todavía hoy mantengo muy buenas amistades. Esta tesis se la dedico con todo mi cariño a los PTKs: Itsaso, María U, Nerea T, Javi, Alberto, Saioa, David, Begoña, Eva, Nerea V, Lara, Imanol, Lorena, Manu, Ainhoa, Amagoia e Inma.

Tanto al grupo de Pamplona como al de Zamudio tengo que agradecerles tanto por su amistad, por sus consejos, como por los buenos momentos tanto fuera como dentro de los laboratorios, todo el ánimo que me han transmitido siempre para conseguir empezar y finalizar esta tesis.

Pero fue después de estos dos destinos cuando comencé la tesis. Ésta vez la oportunidad me la dio mi actual director, el Dr. Carlos Pipaón (con el apoyo del IFIMAV), al cual siempre agradeceré su enorme paciencia, el enseñarme a no tirar la toalla en los momentos menos agradecidos de la tesis (que no han sido pocos) y no olvidaré su constante entusiasmo por avanzar en el laboratorio y su buen humor espaciaaal. Aquí también no tengo más que buenas palabras para Dámaso, el técnico currante y buen compañero. Gracias por escuchar mis sesiones de desahogo y poner buena cara en malos momentos. Y también por esos momentos de cancionero popular. Hemmol rules!! :D

Y cómo no, dentro del Departamento de Hematología del HUMV, no me puedo olvidar de muchas personas que con sus sonrisas, palabras de apoyo, simples conversaciones o con sus tartas y bizcochos han alegrado esos días menos amables. Esta tesis también la dedico a todo el personal del servicio, pero con especial cariño a: Eli, Reyes, Mónica, Andrés, Iñigo, Ángela, Loli, Pili, Ana B, Richard, Eulogio, Marta A y Carmen M. Pero en estos años también he salido fuera del hospital. Esta tesis también va con todo mi cariño para Jana A, Lara y Lorena (UGM). Y en la facultad también me he encontrado con gente a la que me gustaría dedicarle esta tesis, por haber influido siempre para bien en ese ánimo tan variable que conlleva la investigación. Mi profundo agradecimiento para el laboratorio de la Dra. Marian Ros: a ella misma por sus buenos consejos y su apoyo, a Patri, Lucía, María Felis, Ana la zamorana, Paula, Marisa, Fede, Endika, Teresa, Carlos y Marian. Y a la Dra. Paola Bovolenta y a su laboratorio, por su gran ayuda con el tema de la microftalmia y su cálida acogida.

Y un agradecimiento muy especial para mis kukis!! Mamen (“mente fría”) y Mar, por todos los buenos momentos vividos juntas, por su amistad y las sesiones de terapia ;) ¿Para cuándo un whiskito cortito? Y porque el trabajo de esta tesis también está hecho gracias a vosotras.

A mi familia: a mi madre Rosa, a mi padre Clemente, a mi hermano Tomás, a mis hermanas Carmina y Lucía, y a mi cuñado David. Gracias por escucharme siempre, por animarme, por entenderme, por darme vuestro cariño, por estar siempre ahí. ¡¡Por todo!!

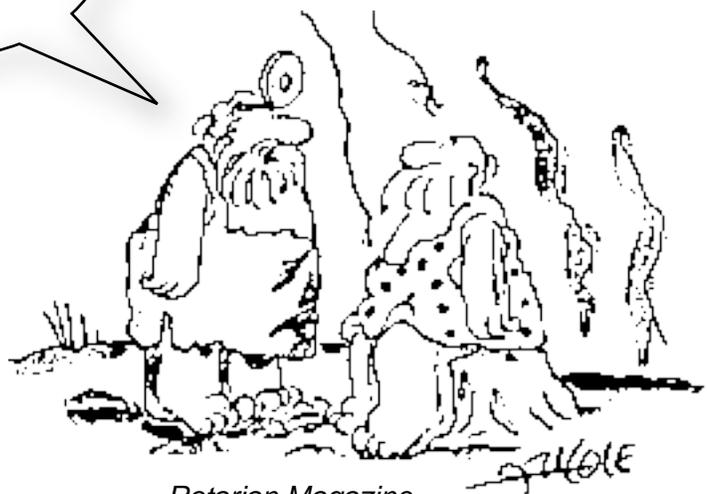
A mi familia de Santander: a Trini, a Txus (padre), a Patri, a Jandro, a Tin. Gracias por quererme como una más, por acogerme y apoyarme, por vuestro cariño, por escuchar mis rollos.

Una dedicatoria muy especial para mis abuelos, mis padrinos y para mi ahijado Clemente.

Y por supuesto a ti, Txus, por querer entenderme siempre, por tu buen humor a prueba de frustración, tu apoyo en los momentos de bajón, por escucharme, por compartir conmigo los momentos de alegría y los de desesperación, por tu cariño (your way), porque sin ti esta tesis no hubiera terminado (literalmente). Gracias mozo!! Y ahora a Indiana!!

Todas estas personas han influido en esta tesis, siempre para bien. Aunque ya lo saben, estén donde estén, quería dejarlo por escrito. Siempre les estaré agradecida y tendrán todo mi cariño.

Aún hay mucho
que no sabemos



Rotarian Magazine,
Diciembre 1988

ÍNDICE

1- INTRODUCCIÓN (*Páginas 17-36*)

1.1- Aspectos clínicos de la Anemia de Fanconi (*Páginas 19-24*)

1.1.1- Epidemiología

1.1.2- Sintomatología

1.1.3- Tratamiento de la aplasia medular

1.1.3.1- Factores de crecimiento, hormonas y
trasplante

1.1.3.2- Terapia génica

1.2- Aspectos moleculares de la Anemia de Fanconi (*Página 24-27*)

1.2.1- Subtipos (grupos de complementación)

1.2.2- La ruta de Fanconi

1.3-Aspectos celulares de la Anemia de Fanconi (*Páginas 28-31*)

1.3.1- Hipersensibilidad a agentes genotóxicos

1.3.2- Producción aberrante de citoquinas
pro-apoptóticas

1.3.3- Elevada sensibilidad a estrés oxidativo

1.3.4- Aplasia medular

1.4- Diagnóstico de la Anemia de Fanconi (*Páginas 32-34*)

1.5- Modelos murinos para el estudio de la Anemia de Fanconi (*Páginas 35-36*)

2- HIPÓTESIS Y OBJETIVOS (*Páginas 37-40*)

3- MATERIALES Y MÉTODOS (*Páginas 41-58*)

3.1- Líneas celulares

3.2- Análisis de la expresión génica mediante RT-PCR y RT-qPCR

3.2.1- Extracción de ARN

3.2.2- Retrotranscripción

3.2.3- Cebadores empleados para PCR y qPCR

3.2.4- RT-PCR y RT-qPCR

- 3.3- Extracción del ADN para genotipado de ratones Fanconi
- 3.4- Análisis de los niveles de proteína mediante Western Blot
- 3.5- Ensayos de viabilidad celular
- 3.6- Análisis de la actividad transcripcional mediante genes reportes con luciferasa
 - 3.6.1- Ensayo de promotor de BIK y DNp73
 - 3.6.2- Ensayo de promotor de STAT1
- 3.7- Análisis de metilación del promotor de BIK
- 3.8- Clonaje de las interferencias frente a STAT1, BIK y FANCC
- 3.9- Estudio de la muerte celular programada mediante tinción con yoduro de propidio
- 3.10- Estudio de la estabilidad del ARNm y de la proteína
- 3.11- Estudios en ratones knock-out para Fancd2
 - 3.11.1- Embriones
 - 3.11.2- Inclusión en parafina
 - 3.11.3- Tinción hematoxilina-eosina de los cortes de las cabezas
 - 3.11.4- Ensayo de TUNEL

4- RESULTADOS (*Páginas 59-97*)

- 4.1-BIK está implicado en la mayor sensibilidad a agentes genotóxicos de las líneas linfoblastoides de Fanconi C (*Páginas 62-76*)
- 4.2-STAT1 está implicado en la mayor sensibilidad a agentes genotóxicos de las líneas linfoblastoides de Fanconi C (*Páginas 77-91*)
- 4.3-La inactivación de Fancd2 en modelo murino induce variadas alteraciones oculares (*Páginas 92-97*)

5- DISCUSIÓN (*Páginas 99-112*)

- 5.1- Implicación de BIK en la mayor sensibilidad a agentes genotóxicos de las líneas linfoblastoides de Fanconi C (*Páginas 101-104*)
- 5.2- Implicación de STAT1 en la mayor sensibilidad a agentes genotóxicos

de las líneas linfoblastoides de Fanconi A (*Páginas 105-109*)

5.3- Alteraciones oculares en el modelo murino KO para Fancd2 (*Páginas 110-112*)

6- CONCLUSIONES (*Páginas 115-118*)

7- BIBLIOGRAFÍA (*Páginas 120-141*)

8- ANEXO: publicaciones del doctorando (*Página 143*)

1) INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

1.1- ASPECTOS CLÍNICOS DE LA ANEMIA DE FANCONI

La anemia de Fanconi (AF) es una enfermedad heterogénea desde el punto de vista clínico causada por la inactivación en homocigosis de al menos uno de los 15 genes que actualmente componen la ruta de Fanconi. Esta enfermedad fue descrita por primera vez en el año 1927 por el pediatra suizo Guido Fanconi, al observar en tres hermanos un fenotipo similar que incluía malformaciones congénitas, infecciones recurrentes y sangrados espontáneos atribuibles al fracaso medular (1). Más tarde, en 1966 se determinó que se trataba de una enfermedad de herencia autosómica (con un subtipo ligado al cromosoma X) (2), con carácter recesivo. Schroeder T.M. comprobó que estos pacientes presentaban alteraciones citogenéticas espontáneas (rupturas cromosómicas y cromosomas radiales) (3). Asociada con esta última observación, Schuler y col. incorporaron como método diagnóstico de la enfermedad la inducción de fragilidad cromosómica mediante la exposición a agentes alquilantes de células de pacientes con AF (4). El diagnóstico prenatal llegó en 1981 gracias a la doctora Auerbach, que también aportó mejoras al test desarrollado por Schuler (5).

Tras estos comienzos se ha ido avanzando a grandes pasos en la investigación de las bases moleculares de la AF con grandes hitos que van desde el descubrimiento de los diferentes genes que forman parte de la ruta AF, hasta la terapia génica en pleno desarrollo actualmente. Estos y otros aspectos se tratarán en más detalle en los siguientes apartados.

1.1.1- EPIDEMIOLOGÍA

La AF es el tipo más frecuente de anemia aplásica congénita en la infancia. Es una enfermedad de las denominadas “raras” aunque en las últimas décadas ha aumentado el número de casos detectados debido a la incorporación de técnicas que estudian la fragilidad cromosómica como método de diagnóstico. Su incidencia se estima en 1-5 afectados por millón de nacimientos, mientras que la frecuencia de portadores es de 1 por cada 200-300, siendo mayor en determinados grupos de población sudafricana y judíos Azkenazi (6,7). Un caso llamativo es el de los individuos de raza gitana en

España que presentan una mutación patológica en el gen FANCA. Dicha mutación representa la mayor prevalencia en una etnia a nivel mundial. La frecuencia estimada de portadores en este grupo es de 1 por cada 64-70 (8). Actualmente, en España, hay 174 casos diagnosticados de anemia de Fanconi en la población general. Es más frecuente en hombres que en mujeres, con una proporción de 3:1. La edad media de diagnóstico es a los 8 años. El 75% de los casos se diagnostica entre los 4 y los 14 años, aunque el rango de diagnóstico es amplio, comenzando desde el nacimiento hasta etapas más maduras (48 años).

1.1.2- SINTOMATOLOGÍA

La AF es una enfermedad con una alta heterogeneidad en las manifestaciones clínicas que presenta cada paciente. Sorprendentemente esta variabilidad ocurre incluso entre gemelos monocigóticos (9). Las características fenotípicas se pueden agrupar en cuatro grandes grupos: 1) defectos o anomalías físicas existentes al nacimiento, 2) endocrinopatías, 3) anomalías hematológicas y 4) aparición de tumores sólidos (Frohmyer L, Frohmyer D. Definition, Characteristics and Diagnosis of Fanconi Anemia. En: FANCONI ANEMIA: A Handbook for Families and Their Physicians. Fanconi Anemia Research Fund, Inc. Industrial Publishing, Inc. Koke Printing. Oregon. Third Ed 2000; 3-19.).

Dentro del primer grupo, las anomalías físicas, las más frecuentes son las que afectan a la pigmentación de la piel (55%), siendo características las llamadas manchas “café con leche” o la hiperpigmentación de la piel. Los defectos del esqueleto, como la aplasia del pulgar o del radio, afectan al 51% del total de estos pacientes. Entre las malformaciones del desarrollo se encuentran la microftalmia (ojos pequeños) y la microcefalia (cabeza pequeña), ambas con una frecuencia del 26%. Problemas renales estructurales, en un 21% de los casos, defectos cardiacos y gastrointestinales, que están representados en el 6 y 5% de los pacientes con AF respectivamente, son otras representaciones clínicas relevantes (Alter B. “Diagnostic evaluation of FA”. In: Owen J, Frohmyer L, Eiler ME, editors. Fanconi anemia standards for clinical care. 2nd edition. London: The Fanconi Anemia Research Fund; 2003. p 3-17) (10).

Las endocrinopatías, tanto en niños como en adultos con AF, comprenden alteraciones hormonales como el déficit de la hormona del crecimiento, lo que conlleva la característica baja estatura de estos pacientes, un metabolismo anómalo de la glucosa y de la insulina, dislipemias, así como trastornos en las gónadas (hipogonadismo) y osteopenia u osteoporosis entre otros (11).

Dentro del tercer grupo, el más característico en pacientes AF, el síntoma más determinante es la aplasia medular progresiva. Ésta aparece prácticamente en la totalidad de los afectados por esta patología con una edad media de comienzo de 7 años, convirtiéndose por tanto en la primera causa de mortalidad antes de alcanzar la pubertad.

Otro problema vital al que se enfrentan los afectados por esta enfermedad, es la elevada propensión al desarrollo de tumores hematológicos (los más frecuentes son la leucemia mieloblástica aguda y los síndromes mielodisplásicos) (12,13) y sólidos, cuya incidencia está marcadamente asociada a la edad (14). Por un lado, como se ha comentado anteriormente, el tratamiento recibido para el acondicionamiento de la médula previo al trasplante suele incrementar el riesgo de padecer dichas neoplasias. Dado el notable aumento en el número de pacientes con AF que sobreviven al trasplante, las causas de la alta incidencia de los diferentes tipos de tumores en los individuos afectados esta cobrando gran interés, tanto desde un punto de vista de la investigación clínica como básica. Dentro del grupo de tumores sólidos, los carcinomas de células escamosas como los de cabeza y cuello, y de la zona genital son los más habituales entre los pacientes Fanconi. Este último grupo de tumores podría tener una relación directa con la mayor sensibilidad de los pacientes a la infección por el virus del papiloma humano (HPV), a través de la interacción de una oncoproteína del virus con proteínas pertenecientes a la ruta de Fanconi (15). En cuanto a su tratamiento, debido a que la terapia habitual no es aplicable a pacientes Fanconi por la mortalidad y toxicidades asociadas a ella incluso con dosis reducidas, es la cirugía, acompañada por terapias especialmente adaptadas a estos pacientes, la principal opción. La detección precoz de las lesiones malignas es clave para el éxito en el tratamiento (16).

1.1.3- TRATAMIENTO DEL FALLO MEDULAR

1.1.3.1- FACTORES DE CRECIMIENTO, HORMONAS Y TRASPLANTE

De forma general, la supervivencia de los pacientes AF está directamente asociada a la aplasia de la médula ósea. Algunos individuos afectados mantienen durante años una situación de fallo medular moderado para el cual no se aplica ningún tratamiento. Sin embargo, existen otros pacientes a los que en muy poco tiempo se les debe administrar compuestos que les permitan mantener la celularidad de la médula, con el fin de retrasar en la medida de lo posible el trasplante. Se suele iniciar el tratamiento escalonado con andrógenos, citoquinas o régimen transfusional, a modo de terapia de apoyo que puede estimular temporalmente los números de células sanguíneas en algunos pacientes con AF. En general, los parámetros que indican la necesidad de iniciar la terapia son la presencia de uno, dos o tres de los siguientes factores: hemoglobina < 8 mg/dL; plaquetas < 50000/mm³ y/o neutrófilos < 500/mm³ (Fanconi Anemia: Standards for Clinical care. Fanconi Anemia Research Fund, Inc; Eugene, OR: 2003).

Los andrógenos son hormonas masculinas que estimulan la producción de células sanguíneas durante un periodo de tiempo determinado. Su efecto predominante es un aumento de la hemoglobina, aunque también se han observado aumentos en plaquetas y neutrófilos (17-19).

Las citoquinas empleadas, generalmente son factores de crecimiento hematopoyético, entre los que destacan el factor estimulante de colonias granulocíticas (G-CSF), el factor estimulante de colonias granulo-monocíticas (GM-CSF), y la eritropoyetina (EPO) que es estimulante de la serie roja. El uso a corto plazo de GM-CSF y G-CSF se ha estudiado en un número reducido de pacientes con AF con resultados beneficiosos en el conteo de células hematopoyéticas, principalmente neutrófilos, aunque también en el número de plaquetas y los niveles de hemoglobina (20,21). La EPO se utiliza en casos en los que falla el uso de andrógenos.

En medida de tercera línea se encuentran las transfusiones, cuando no han resultado eficaces los tratamientos anteriormente comentados.

En cualquier caso, a medio/largo plazo, las medidas de apoyo tienden a no ser eficientes, haciendo necesario como solución última el trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos. El trasplante de células madre hematopoyéticas, a fecha de hoy, es la única terapia que puede corregir las manifestaciones hematológicas de pacientes con AF, aunque tanto la radiación aún empleada en el acondicionamiento pre-trasplante de donante no emparentado como el desarrollo de la enfermedad injerto-contra-huésped aumentan de manera significativa la incidencia de tumores sólidos (22). De hecho, desde la década de los 90 en la que la supervivencia al trasplante de médula era de un escaso 20%, se ha logrado optimizar el protocolo, llegando a conseguir en la actualidad que un 70% de los pacientes con donantes no relacionados y un 90% con donantes relacionados superen este proceso.

1.1.3.2- TERAPIA GÉNICA

Actualmente este campo está siendo objeto de una intensa investigación por parte de numerosos grupos a nivel mundial y todavía se encuentra en proceso de desarrollo. Particularmente este tipo de terapia, que está encaminada exclusivamente al tratamiento de las anomalías hematológicas, es importante para aquellos pacientes que no tienen un donante compatible de médula.

Esta terapia se basa, desde un punto de vista general, en la introducción en las células del individuo afectado, de al menos una copia funcional del gen afectado. El interés sobre este tipo de terapia comenzó al observarse casos clínicos de individuos con AF cuyas células madre hematopoyéticas se auto-corregían y eran capaces de expandirse y restaurar el compartimento medular, fenómeno conocido como mosaicismo somático (23,24). La reversión hematopoyética ocurre cuando, tras un evento genético espontáneo en una célula madre hematopoyética, uno de los alelos del gen Fanconi mutado se corrige, con la consecuente recuperación de la actividad de la proteína y del fenotipo celular. A pesar de ser ésta una situación favorable para el paciente a nivel del fenotipo hematológico, es considerado uno de los principales factores capaces de alterar el diagnóstico de AF. Por el momento, esta terapia se ha llevado a cabo con éxito en reducidos estudios preclínicos con células de pacientes y en modelos murinos

de AF (25-27). Los estudios en células humanas se han realizado en progenitores hematopoyéticos extraídos directamente de pacientes, en líneas celulares con AF de origen linfoide y en progenitores hematopoyéticos sanos obtenidos a partir de fibroblastos de piel de pacientes, desdiferenciando éstos previamente a células madre pluripotentes inducidas (28).

1.2- ASPECTOS MOLECULARES DE LA ANEMIA DE FANCONI

1.2.1- SUBTIPOS

En la actualidad, la AF puede clasificarse en 15 subtipos o grupos de complementación como se puede observar en la **tabla 1**. La pérdida de función en homocigosis en uno solo de esos genes causa la enfermedad.

Grupo de complementación	Gen	Tamaño de la proteína (kDa)
A	FANCA	163
B	FANCB	95
C	FANCC	63
D1	FANCD1=BRCA2	380
D2	FANCD2	155, 162
E	FANCE	60
F	FANCF	42
G	FANCG	68
I	FANCI	150
J	FANCI=BRIP1	130
L	FANCL	52
M	FANCM	232
N	FANCN=PALB2	131
O	FANCO=RAD51C	42
P	FANCP=SLX4	200

Tabla 1. Grupos de complementación de la Anemia de Fanconi

Las mutaciones de los genes FANCA, FANCC y FANCG son las más frecuentes en los humanos, representando más del 80% de los casos en los pacientes con AF (29).

Dentro de estos tres grupos, el grupo de complementación A es el más frecuente, con un 66% de incidencia en todo el mundo. Sorprendentemente, no hay individuos del grupo C en España, el cual es el segundo subtipo de AF prevalente en otros países, por detrás del A.

Los primeros genes descritos en relación con la AF codificaban para proteínas no conocidas anteriormente, por lo que se les denominó proteínas FANC. Sin embargo, otros genes de la vía Fanconi resultaron ser ya ampliamente conocidos al estar implicados en cánceres de tipo hereditario, como es el caso de gen FANCD1 (BRCA2) (30), relacionado con tumores de ovario y mama.

1.2.2- LA RUTA FANCONI

La ruta de señalización Fanconi está principalmente implicada en la reparación de entrecruzamientos del ADN y coordina otros eventos de respuesta a daño en el ADN, resolviendo horquillas de replicación atascadas, y transmitiendo señales a puntos de control del ciclo celular.

La vía de Fanconi está formada por un complejo central de 8 proteínas "FANC" (FANCA, -B, -C, -E, -F, -G, -L, y -M) y 6 factores asociados (FAAP20, FAAP100, FAAP24, HES1, MHF1 y MHF2) (31-35). Dicho complejo es esencial para que ocurra la formación y posterior mono-ubiquitinación del dímero FANCD2-FANCI, siempre en respuesta a un daño en el ADN, activándose así una cascada de reacciones para su reparación (36,37).

Entre las proteínas FANC efectoras de la vía se encuentran FANCD1/BRCA2, FANCI/BRIP1, FANCN/PALB2, FANCO/RAD51C y FANCP/SLX4, junto con otras proteínas asociadas como FAN1, RAD18 y RAD51.

Básicamente, la activación de la vía de Fanconi comienza con la detección del daño en el ADN y puede separarse en 3 eventos: 1) Formación del complejo central, 2) Activación del dímero FANCD2/FANCI y 3) Reclutamiento de proteínas de reparación del ADN a los focos del daño (**Figura 5** Ref. 99).

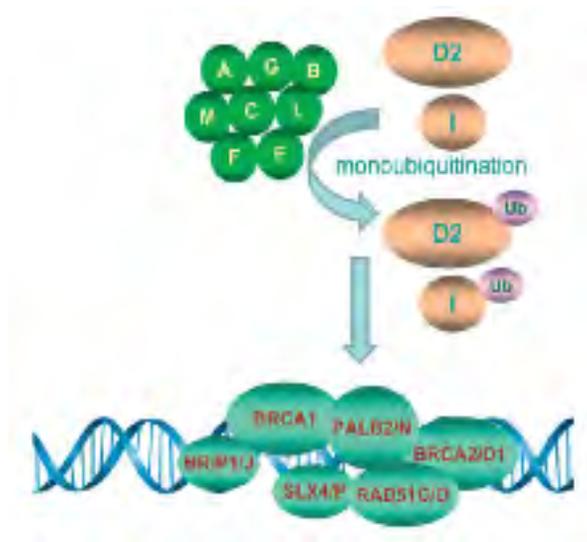


Figura 5. Esquema simplificado del funcionamiento de la ruta FA/BRCA

1.2.3.1- Formación del complejo central

Las interacciones entre proteínas dentro de este complejo central se han establecido a través de estudios de co-inmunoprecipitación y de ensayos de doble híbrido (38) que han permitido identificar que el complejo central está constituido por 8 proteínas (FANCA, B, C, E, F, G, L, M). De dichas proteínas, está FANCM que es una helicasa de ADN y FANCL que posee una subunidad con actividad de E3 ubiquitin ligasa (39), la cual requiere de una enzima conjugadora de ubiquitina (UBE2T) para la posterior monoubiquitinación de FANCD2 (40).

La formación de este complejo cataliza la monoubiquitinación y localización en la cromatina del dímero FANCD2/FANCI. Sin embargo, se ha demostrado que no es esa su única función, ya que la sola restauración de esa modificación postraducciona del heterodímero no es suficiente para corregir el defecto en células de algunos grupos de complementación de Fanconi (41), sugiriendo otros posibles mecanismos de actuación para este complejo.

1.2.3.2- Activación del heterodímero FANCD2/FANCI

Es el paso crítico previo necesario para que la vía de Fanconi pueda llevar a cabo su función. La activación principalmente consiste en la monoubiquitinación del dímero formado por FANCD2/FANCI, que posteriormente permitirá a FANCD2 coordinar la reparación de entrecruzamientos entre hebras con otras proteínas de reparación del ADN, localizarse en la cromatina y reclutar el resto de la maquinaria funcional. En este punto de la ruta Fanconi, juega un papel importante una proteasa específica de ubiquitina (USP1), la cual permite el reciclaje de FANCD2 (42), para que ésta pueda volver a actuar en otros puntos de daño en el ADN.

La regulación de este proceso es compleja, y a pesar de su importancia, a día de hoy sigue sin estar esclarecida del todo. Estudios recientes apuntan a p21 como gen clave en la modulación de la activación de la ruta de Fanconi, regulando tanto la monoubiquitinación de FANCD2/FANCI como los niveles transcripcionales de USP1 (43). En este mismo sentido, también se ha descrito RAD18, una ubiquitina ligasa necesaria para la monoubiquitinación y posterior localización del heterodímero en la cromatina (44).

1.2.3.3- Reclutamiento de proteínas de reparación del ADN

Una vez reclutado el heterodímero FANCD2/FANCI, monoubiquitinado y localizado en la cromatina (en los puntos de daño del ADN), son reclutadas otras proteínas FANC (FANCD1/BRCA2, FANCG, FANCI/BRIP1, FANCN/PALB2, FANCO/RAD51C, FANCP/SLX4), así como proteínas implicadas en la reparación del ADN como RAD51 (45), NBS1 (46) y PCNA (47). La consolidación de este macrocomplejo va a permitir la escisión del entrecruzamiento entre ambas hebras del ADN y su reparación mediante la coordinación de diferentes rutas de reparación del daño, como la reparación por escisión de nucleótidos (NER), síntesis de ADN translesión (TLS) y la reparación por recombinación homóloga (HRR) (48,49).

1.3- ASPECTOS CELULARES DE LA ANEMIA DE FANCONI

1.3.1- HIPERSENSIBILIDAD A AGENTES GENOTÓXICOS

El fallo de los mecanismos de reparación condiciona una exacerbada sensibilidad de los pacientes FA a agentes que generan enlaces entre las cadenas del ADN (ICL = *interstrand cross link*), lo que constituye uno de los aspectos característicos de esta patología (50). Estos agentes pueden ser físicos, como las radiaciones ionizantes o la luz UV, o bien químicos, entre los que destacan ciertos compuestos como el cisplatino (CDDP), la mitomicina C (MMC) o el diepoxibutano (DEB), entre otros. De hecho, el aumento de aberraciones cromosómicas inducidas tanto por la MMC como por el DEB a dosis bajas proporciona la base para el test diagnóstico de la AF.

Este tipo de compuestos se caracteriza por reaccionar covalentemente con el ADN induciendo la formación de enlaces entre las hebras complementarias del mismo, impidiendo su separación e inhibiendo de esta forma la replicación del ADN. Sus efectos en las células AF se observan tanto a nivel citogenético, por un aumento en el número aberraciones cromosómicas (rupturas, deleciones, etc.) (51), como a nivel molecular, por la inducción de mecanismos de muerte celular apoptóticos y no apoptóticos (52,53). También se han descrito diferentes vías de señalización implicadas en la respuesta exacerbada a agentes que dañan el ADN y a la radiación UV, como es el caso de la quinasa del extremo N-terminal de Jun (JNK) y del gen EGR-1 (54). Teniendo en cuenta estas observaciones, la inhibición de la ruta FA/BRCA se ha usado como medio para sensibilizar a células tumorales frente a agentes quimioterápicos como el cisplatino (55-57). Como ya se ha mencionado anteriormente, esta elevada sensibilidad a agentes genotóxicos tiene relevantes implicaciones en el tratamiento de los pacientes, al limitar las posibilidades de las terapias disponibles tanto para los trasplantes de médula como para los distintos tipos de tumores asociados.

1.3.2- PRODUCCIÓN ABERRANTE DE CITOQUINAS PRO-APOPTÓTICAS

La hematopoyesis es un proceso dinámico y complejo por el cual se forman en la médula ósea nuevas células sanguíneas (de los linajes mieloide, linfoide y eritroide) y plaquetas a partir de la diferenciación de las células madre hematopoyéticas, las cuales también tienen la capacidad de auto-renovarse. En este proceso están implicadas numerosas citoquinas y factores hematopoyéticos que juegan un papel clave en el mantenimiento de la hematopoyesis basal.

En relación con la pancitopenia característica de la AF, se han descrito numerosas alteraciones en la producción de diversos factores como TNFalfa, IL-6, GM-CSF, el IFNgamma e IL1beta (58-62). Tanto el TNFalfa como el IFNgamma son conocidos inductores de daño en el compartimento de células madre hematopoyéticas en la anemia aplásica idiopática, la cual comparte algunas semejanzas con el fallo medular observado en la AF (63). En el caso del IFNgamma se ha visto que, sumado a su mayor producción, las células deficientes en proteínas FANC, principalmente del grupo de complementación C, presentan una elevada sensibilidad a dicha citoquina, tanto en el caso de células hematopoyéticas como no hematopoyéticas, provocando un incremento en la tasa de apoptosis (64). Esto tiene su explicación en que la proteína FANCC es un mediador clave en la respuesta a IFN gamma, a través de la regulación del factor de transcripción STAT1, con el cual interacciona facilitando su activación (65). Por lo tanto, en ausencia de una proteína FANCC funcional, se impide una correcta activación de STAT1 por IFNgamma, lo que conlleva una respuesta exacerbada a dicha citoquina a través de la activación aberrante de PKR (66). En otras palabras, las evidencias actuales sugieren que la mayor apoptosis producida por IFNgamma en células FANCC -/- es independiente de STAT1. Dicha hipersensibilidad a esta citoquina soluble se ha demostrado tanto "in vitro" como "in vivo" en células de médula ósea de ratón FA-C y de pacientes del mismo grupo de complementación, observándose un fenotipo apoptótico en respuesta a la citada molécula (67).

Sin embargo, y aunque hay claras evidencias de que las células primarias de AF son hipersensibles a IFNgamma, cabe destacar que existe cierta controversia en los trabajos publicados por diferentes autores con líneas celulares de linfoblastos humanos

del mismo grupo de complementación (68, comentario sobre Ref. 69). Hubo un primer estudio en el que no se consiguió observar dicha hipersensibilidad al IFN γ usando como modelo células hematopoyéticas de ratón KO para FANCC (70). Posteriormente, en una segunda aproximación con el mismo modelo, se confirmó el fenotipo que se observa en los pacientes con AF (71). Las diferencias posiblemente radicaron en las condiciones de suministrar la citoquina, ya que ésta se elimina hasta en un 90% a las 8 horas de la inyección, lo que hace necesario un continuo suministro para poder analizar su impacto “in vivo”. Se han realizado también estudios de la regulación de la vía del IFN γ en células hematopoyéticas FA-C y en fibroblastos FA-A, FA-C y FA-G. Sin embargo, los resultados de mayor sensibilidad a la citoquina se han observado en FA-C.

La síntesis de TNF α , citoquina pro-apoptótica, está aumentada en la médula ósea de pacientes con AF (60). Tal es así, que su producción es considerada como uno de los puntos clave en el fallo medular de los pacientes AF. La sobreproducción de esa citoquina condiciona la alteración de determinados procesos celulares, como una activación aberrante de rutas de estrés (72).

Finalmente, la IL-1 β , citoquina pro-inflamatoria detectada en altas cantidades en el suero de estos enfermos, se ha relacionado con otro aspecto del fenotipo clínico de la AF, como es la mayor incidencia de tumores (62).

1.3.3- ELEVADA SENSIBILIDAD AL ESTRÉS OXIDATIVO

El estrés oxidativo, definido como un desequilibrio entre la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y los mecanismos de defensa antioxidantes, está considerado como un factor de patogénesis importante en enfermedades de la médula ósea con predisposición a leucemia, como es el caso de la AF.

Las células hematopoyéticas están expuestas a varias ROS que son generadas durante procesos inflamatorios o metabólicos. Existen varios estudios que sugieren que la vía de Fanconi está directamente implicada en la defensa antioxidante celular (73), lo que provocaría que las células de AF no toleren el estrés oxidativo (74-77) y que presenten disfunciones mitocondriales (78,79). De hecho, se han descrito

relaciones funcionales entre varias de las proteínas FANC con enzimas clave del sistema redox como FANCJ, que es un represor de la hemo-oxigenasa 1 y actúa como sensor del daño oxidativo basal (80); FANCG se encuentra en la mitocondria y reduce la actividad peroxidasa (81); FANCA, FANCC y FANCG interaccionan con procesos relacionados con el citocromo P450 (82); FANCD2 interacciona con FOXO3a (83). Finalmente, en modelos murinos KO para genes FANC se ha estudiado el efecto beneficioso de diferentes agentes antioxidantes como es el caso del tempol, el resveratrol y el quercetin (84,85,86). De hecho, se ha visto que pueden mejorar el fenotipo patológico de la médula ósea así como reducir la tasa de aparición de tumores. Del mismo modo, en modelos celulares *in vitro* también se ha observado un efecto beneficioso de agentes antioxidantes como la N-acetil-cisteína (87,88).

1.3.4- APLASIA MEDULAR

Las características comentadas anteriormente afectan en conjunto al reservorio de células madre hematopoyéticas del individuo enfermo (89), lo que acaba desencadenando el fallo medular precoz descrito previamente. Pero a ellas se suman también evidencias que implican directamente a los genes de la ruta Fanconi en la generación de la población inicial de células madre hematopoyéticas durante el desarrollo embrionario. En este sentido, en experimentos realizados *in vitro*, se han observado alteraciones en la expresión de genes clave implicados en la diferenciación hacia linaje hematopoyético de células embrionarias humanas con la vía de Fanconi inactivada (90). Por otro lado, existen evidencias de defectos en la proliferación de colonias a partir de diferentes progenitores hematopoyéticos en muestras de sangre de cordón umbilical de recién nacidos con anemia de Fanconi (91), lo que implicaría una disminución de la capacidad de renovación de estas células, y consecuentemente una reducción de la población de células CD34+ disponible en este tipo de pacientes. De hecho, un trabajo reciente relaciona la función de ubiquitinación de FANCL con la correcta activación de beta-catenina (92), un gen clave en el mantenimiento de la población de células madre hematopoyéticas. Por lo que este mecanismo se sumaría al

conjunto de defectos descritos en este tipo celular para explicar la progresiva pérdida de progenitores de células sanguíneas, desembocando en la aplasia medular precoz. A esas alteraciones tempranas descritas durante el desarrollo embrionario se suman otras características patológicas de estas células como una reducida capacidad de movilización (93) y una mayor apoptosis por hiper-activación de la vía de p53 (94).

1.4- DIAGNÓSTICO GENÉTICO MOLECULAR DE LA AF

Al tratarse de una enfermedad poco frecuente, sus síntomas pueden tardar en relacionarse con la posibilidad de que el paciente sufra de AF, el cual puede o no mostrar dichos signos al nacer. Este hecho, unido a que un 30% de los pacientes no muestran malformación alguna, hace que acudan al médico cuando los síntomas hematológicos de la enfermedad se manifiestan. De hecho, la mayoría de las personas que presentan este desorden son diagnosticadas entre los 2 y los 15 años de vida. La prueba más común para confirmar la enfermedad se realiza mediante el uso de agentes como el diepoxibutano o la mitomicina C, que inducen enlaces cruzados entre las cadenas del ADN, provocando un número elevado de alteraciones en el cariotipo como son rupturas y figuras radiales de los cromosomas, que las células deficientes en genes FANC no pueden reparar, haciéndose patentes en su cariotipo (**Figura 1** Ref. 95).

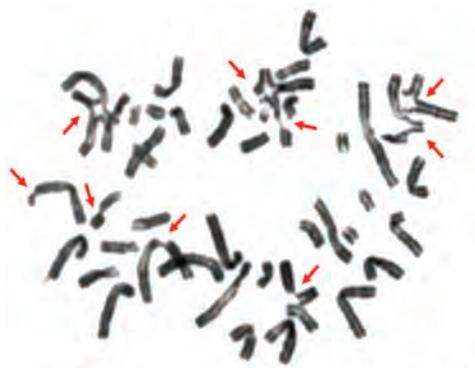


Figura 1. Aberraciones cromosómicas típicas de la anemia de Fanconi

El análisis por citometría de flujo es otro método para valorar al paciente. La mitomicina C induce la detención del ciclo celular en la fase G2 de células deficientes en proteínas FANC y esta parada puede ser fácilmente detectada con el citómetro (**Figura 2** Ref. 95).

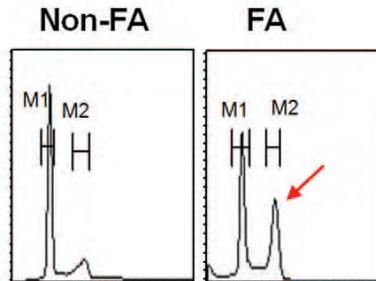


Figura 2. Parada del ciclo celular típica en G2 de células con AF tratadas con MMC

Con la evaluación de la mono-ubiquitinación de FANCD2 mediante western-blot también puede diagnosticarse a pacientes de uno de los grupos de complementación asociado con el complejo central de la vía de Fanconi (96) (**Figura 3** Ref. 95). En caso de no observarse la doble banda, se trataría de un diagnóstico positivo de AF, ya que indicaría la incapacidad del complejo central de la ruta FA/BRCA para monoubiquitinar FANCD2.



Figura 3. En las células con AF tratadas con MMC no se observa la mono-ubiquitinación de FANCD2

Al tratarse de una enfermedad multigénica, es muy importante conocer el grupo de complementación al que pertenece la persona afectada, en otras palabras, cuál es el gen afectado. De hecho se conoce que determinados genotipos se asocian preferentemente con determinadas manifestaciones clínicas, con diferentes grados de severidad o con la edad de aparición (97). Para determinar el gen afectado, se emplea principalmente la complementación con vectores retrovirales (98). Este método se lleva a cabo en células T de sangre periférica y se basa en la reversión de la sensibilidad a la mitomicina C (MMC) de las células Fanconi mediante la transferencia de genes FANC complementarios introducidos en vectores retrovirales. El subtipo de la enfermedad se determina en función del gen Fanconi que consigue aumentar en más de un 20% la supervivencia celular frente a tres concentraciones de MMC, en comparación con otras células tratadas con la misma droga pero trasducidas con vectores control. En este sentido, desde hace ya unos años, los diferentes grupos que forman parte de la red española de AF propusieron un algoritmo (**Figura 4**) para el subtipaje de los pacientes nuevos.

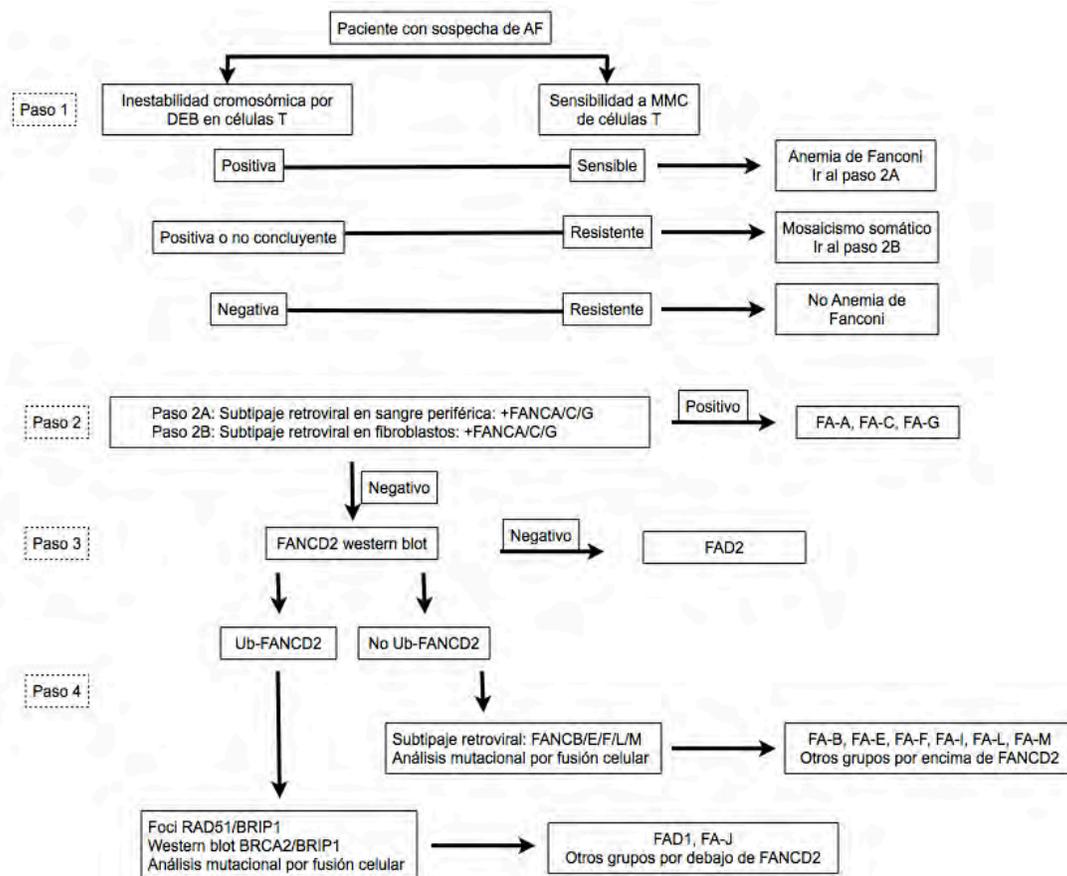


Figura 4. Algoritmo para el subtipaje de la Anemia de Fanconi adaptado de Ref. 35

1.5- MODELOS MURINOS PARA EL ESTUDIO DE LA ANEMIA DE FANCONI

Como en la mayoría de las enfermedades humanas, en el caso de la anemia de Fanconi se han desarrollado diferentes modelos murinos mutantes para varios de los grupos de complementación de la enfermedad, en concreto para 9 de ellos (A, C, D1, D2, G, L, M, N, P) y también dos ratones con mutación doble (A/C y C/G) (99).

En relación con la variabilidad de fenotipos AF observados en modelos murinos, es de destacar la variabilidad inducida *per se* por la cepa del ratón en la que está generada la mutación del gen. Un ejemplo de esta variación se puede observar con el ratón “knockout” (KO) para FANCA, el cual en un background (C57BL/6) reproduce la microftalmia (100) mientras que la misma delección en el fondo genético 129S4, no (101). Esta observación no resulta del todo sorprendente, puesto que en humanos también se ha visto que el fondo genético influye en la severidad del fenotipo (102).

Aunque estos mutantes no consiguen reproducir totalmente el fenotipo observado en humano, como se puede ver en la **tabla 2** (adaptada de Ref. 99), los modelos murinos de diferentes subtipos de la anemia de Fanconi ayudan a comprender aspectos de la patogénesis de la enfermedad y pueden ayudar en el desarrollo de terapias para sustituir la función defectiva del gen mutado y mejorar la calidad de vida de los pacientes.

De hecho estos modelos ya han demostrado ser una herramienta muy útil para el ensayo de compuestos beneficiosos para la homeostasis de la médula ósea (85), de agentes que retrasan el desarrollo de determinados tipos de tumores (84) o para el estudio molecular de defectos del desarrollo como el hipogonadismo o de la microftalmia.

Gen Fanconi	Sensibilidad a agentes entrecruzantes	Anomalías congénitas	Anomalías hematológicas	Predisposición a cáncer
Mutantes simples				
FANCA	Sí	No / Sí (en un background, microftalmia)	No	Linfomas, etc
FANCC	Sí	No	No	No estudiado
FANCD1/BRAC2	Sí	n/a	n/a	n/a
FANCD2	Sí	Microftalmia	No	Tumores epiteliales
FANCG	Sí	No	No	No estudiado
FANCL	No estudiada	No	No	No estudiado
FANCM	Sí	No	No	Linfomas, etc
FANCN/PALB2	Sí	n/a	n/a	n/a
FANCP/SLX4	Sí	Anomalías oculares, hidrocefalia	Leucopenia y menos plaquetas	No estudiado
Mutantes dobles				
FANCA/FANCC	Sí	No	No	No estudiado
FANCC/FANCG	Sí	No	Anemia, celularidad medular disminuida	Tumores de linaje mieloide

Tabla 2. Modelos murinos generados con mutaciones inactivantes de genes de la ruta FA/BRCA.

2) HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

JUSTIFICACIÓN

El estudio del papel de las proteínas FANC en la viabilidad celular y en la sensibilidad a agentes genotóxicos es un área de gran interés científico, no sólo por la implicación que tienen en la aparición y el desarrollo de la anemia de Fanconi, sino por las posibles implicaciones que estos genes pueden tener en otras patologías humanas. Por un lado, este estudio pretende ayudar a conocer los mecanismos moleculares implicados en la alta sensibilidad de las células deficientes en proteínas FANC a agentes genotóxicos y por tanto podría abrir la puerta a la identificación de nuevas dianas terapéuticas que permitan sensibilizar a las células cancerosas a agentes quimioterápicos. Por otro lado, ya que la investigación sobre anemia de Fanconi (AF) se ha centrado principalmente en los problemas hematológicos de los pacientes, se conoce muy poco sobre el papel que estas proteínas tienen en las malformaciones congénitas que habitualmente presentan este tipo de pacientes. En este estudio también se explorará el papel que estas proteínas tienen en el desarrollo de la microftalmia.

HIPÓTESIS

Nuestra hipótesis es que las proteínas FANC no sólo participan en la reparación del daño al ADN, sino que también conectan la detección de este daño con las rutas citoplásmicas que controlan la supervivencia de la célula, coordinando así una respuesta que evita que las alteraciones genéticas sean transmitidas a la progenie. Estas rutas de supervivencia, además, pueden presentar una función clave y poco estudiada en el desarrollo embrionario del ojo.

OBJETIVOS GENERALES

Los objetivos de este trabajo van dirigidos a esclarecer el papel de las proteínas FANC en aspectos del fenotipo de la AF que, en principio, no pueden explicarse completamente por fallos en la maquinaria de reparación del ADN. Para ello utilizamos modelos celulares y animales que reproducen aspectos concretos del fenotipo, para tratar de encontrar puntos comunes, candidatos a ser modulados por la actividad de dichas proteínas.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Identificación de genes mediadores de la propensión a la apoptosis basal e inducida en respuesta tanto a agentes entrecruzantes del ADN como a citoquinas inflamatorias, en células deficientes en proteínas FANC.
2. Análisis de los mecanismos moleculares que median la expresión de dichos genes en células deficientes en proteínas FANC.
3. Caracterización histológica y morfológica de las alteraciones oculares observadas en el modelo murino deficiente en Fancd2.

3) MATERIALES Y MÉTODOS

1. LÍNEAS CELULARES

En los diferentes estudios llevados a cabo durante esta tesis, hemos utilizado diversas líneas celulares que se resumen en la **Tabla 3**, con sus respectivas condiciones de crecimiento.

Código	Descripción	Medio de cultivo
LGV	linfoblastos B AF-A	RPMI+10%FBS+2%PS
LGV+FA	linfoblastos B AF-A corregidos con ADNc FancA	RPMI+10%FBS+2%PS
JUA	linfoblastos B AF-A	RPMI+10%FBS+2%PS
JUA+FA	linfoblastos B AF-A corregidos con ADNc FancA	RPMI+10%FBS+2%PS
EUFA 274	linfoblastos B AF-A	RPMI+10%FBS+2%PS
EUFA 274R	linfoblastos B AF-A corregidos con ADNc FancA	RPMI+10%FBS+2%PS
EUFA 450	linfoblastos B AF-C	RPMI+10%FBS+2%PS
EUFA 450R	linfoblastos B AF-C corregidos con ADNc FancC	RPMI+10%FBS+2%PS
HSC536	linfoblastos B AF-C	RPMI+10%FBS+2%PS
HSC536R	linfoblastos B AF-C corregidos con ADNc FancC	RPMI+10%FBS+2%PS
HCT116+/-	tumoral de colon	RPMI+10%FBS+2%PS
293FT	tumoral de hígado	RPMI+10%FBS+2%PS

Tabla 3. Listado de las líneas celulares utilizadas

2. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA MEDIANTE RT-PCR Y RT-qPCR

2.1. Extracción de ARN

Se realizó a partir de las LCLs (líneas de células linfoblastoides). Todas las centrifugaciones se llevaron a cabo a 4°C.

Tras recoger el volumen de medio con las células del frasco, se centrifuga a 1500 rpm durante 5 minutos. Se retira el sobrenadante, lavando el pellet con 1mL de PBS 1X. Se vuelve a centrifugar durante 1 minuto a 1300 rpm. Se retira el sobrenadante y se añade 1 mL de TriReagent (Molecular Research Center, Cincinnati, EEUU), disgregando mecánicamente el pellet.

A continuación, se añaden 200 µL de la mezcla de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) y se da vórtex a la muestra, mezclando bien los dos componentes.

Una vez homogeneizado, se centrifuga a 1500 rpm durante 20 minutos. Una vez transcurrido ese tiempo, la muestra se habrá separado en 3 fases, siendo la fase acuosa la que contiene el ARN. Ésta es transferida a un nuevo tubo, añadiéndole 500 µl de isopropanol para la precipitación del ARN, invirtiendo la mezcla.

Se deja 10 minutos a temperatura ambiente, para luego centrifugarla 20 minutos a 1500 rpm. El ARN precipitado se observa como un pellet blanquecino. Se retira el sobrenadante, y se procede a lavar el pellet con 1 ml de etanol frío al 80% en agua DEPC, centrifugándola 10 minutos a 1500 rpm.

A continuación, se retira el sobrenadante y se añade el volumen de agua DEPC que se crea conveniente según el tamaño del pellet obtenido (12-20µl), y se coloca en el bloque a 65°C durante 10 minutos con la tapa del tubo abierta para que se evaporen los restos de etanol e isopropanol. Entonces, se resuspende bien el pellet y se cuantifica en el Nanovue, usándolo para la retrotranscripción (RT) o guardándolo directamente a -80°C.

2.2. Retrotranscripción (RT)

Una vez cuantificados los ARNs, se procede a realizar la reacción de retrotranscripción para obtener el ADNc. Para ello se calcula el volumen de la muestra necesario para retrotranscribir 1 µg de ARN, completando hasta 10 µl con agua DEPC. En el termociclador se selecciona el programa para desnaturalizar el ARN, 65°C durante 10 minutos. A continuación se añade en hielo el resto de los componentes de la reacción (tampón 2x, 5mM de DTT, 0.5mM de dNTPs, 12.5 µg/ml de "random primers", 0.25 U/µl de inhibidor de RNAsa, 5 U/µl de retrotranscriptasa) siendo el volumen final de la reacción de 20µl. En el termociclador se selecciona el programa de síntesis de ADNc (25°C 5 minutos, 42°C 1 hora, 95°C 5 minutos). Una vez finalizada la carrera, sino se van a utilizar en el día las muestras, se guardan a -20°C.

2.3. Cebadores empleados para PCR y para qPCR

Para el análisis de la expresión de los diferentes genes de interés mediante RT-PCR o RT-qPCR se diseñan parejas de cebadores que amplifiquen dentro de sus respectivas regiones codificantes, empleando la siguiente carrera: 95°C durante 5 minutos; 30 ciclos de 95°C durante 30 segundos (desnaturalización del ADNc), 57°C durante 30 segundos (anillamiento de los cebadores. Esta temperatura depende de las temperaturas de fusión de los oligos) y 72°C durante 7 minutos y conservar las muestras al finalizar la reacción a 4°C. Los requisitos utilizados para el diseño de los cebadores son a) Tamaño del amplicón entre 140-400 pb; b) Similares temperaturas de fusión de cada pareja de cebadores; c) Cada cebador de una misma pareja debe unirse en un exón diferente del gen, con al menos un intrón en medio; d) No formación de dímeros de cebadores (en el caso de la RT-qPCR) Teniendo presentes los parámetros comentados, los cebadores utilizados se muestran en la **tabla 4**.

*En el caso de las secuencias de los cebadores para el genotipado de los ratones FancD2 se tomaron del artículo Ref. 144.

Gen	Cebadores	Tamaño del amplicón (pb)
hBeta2microglobulina	GAGACATGTAAGCAGCATCA (F) AGCAACCTGCTCAGATACAT (R)	216
hStat1	AACAGAAAAATGCTGGCACC (F) AGAGGTCGTCTCGAGGTCAA (R)	125
hIrf1	TCCGGAGCTGGGCCATTAC (F) GCGACAGTGCTGGAGTCAGGG (R)	390
hIrfd11	TGCCAATCAATGAAGTGAA (F) TCTGTTGGAAAATCCCGTTC (R)	299
hp21	GAGGCACTCAGAGGAGGCCCAT (F) CACACGCTCCCAGGCCAAGTC (R)	224
hTNFalfa	CAATGGCGTGGAGCTGAGAG (F) GGCTGATGGTGTGGGTGAGG (R)	131
hIL1beta	TCATTGCTCAAGTGTCTGAAGC (F) TGGTCGGAGATTCGTAGC (R)	189
hp53	GTTCCGAGAGCTGAATGAGG (F) TCTGAGTCAGGCCCTTCTGT (R)	158
hSocs5	CAGGAACAAGACTTGCACGA (F) GGAAAACACAAGCCACAGT (R)	259
hCish1	GCCAGAAGGCACGTTCTTAG (F) GTACAAAGGGCTGCACCAGT (R)	350
hStat3	GCCATCTTGAGCACTAAGCC (F) GCTACCTGGGTCAGCTTCAG (R)	318
hStat5a	GGAGAATTCGACCTGGATGA (F) TGGATGCCATGATCTGAAAA (R)	358
hIrf16	GCTGACCGAAACATGGAGAT (F) CAGATCTCAACTCCCCGGTA (R)	295
hIcam1	GGCTGGAGCTGTTTGAGAAC (F) ACTGTGGGGTTCAACCTCTG (R)	202
hPias1	GCAGCCTTCCAGGTTACCTTCCA (F) AGGGCCCGACACGGAATTGT (R)	364
hMx1	TGTGCAGCCAGTATGAGGAG (F) CCCACAGCCACTCTGGTTAT (R)	442
hBIK	GACCATGGAGGTTCTTGGCA (F) AGGCTCACGTCCATCTCGTC (R)	140
hPuma	ACGACCTCAACGCACAGTACG (F) TGGGTAAGGGCAGGAGTCC (R)	110
hNoxa	AGCTGCGTTTCACCAGGG (F) TCCAGCTACTTGCACTTGTTCCCT (R)	101
hBax	TGGAGCTGCAGAGGATGATTG (F) CCAGTTGAAGTTGCCGTCAGA (R)	101
hBcl2	GGATAACGGAGGCTGGGATGCC (F) TTGGGGCAGGCATGTTGACTTCAC (R)	324
hFancA	GCTCTTCAGGAATCTGTGCTGC (F) TACAGTGAGGTGAGCAGAGG (R)	449
hFancC	GCAATGCTGCATCTTTTTGA (F) GCACTGCGTAAACACCTGAA (R)	207
hBcl-XS	GAGGGAGGCAGGCCGACGAGTTT (F) ATGGCGGCTGGACGGAGGAT (R)	216

Gen	Cebadores	Tamaño del amplicón (pb)
hBcl-XL	GGCAACCCATCCTGGCACCT (F) AGCGTTCCTGGCCCTTTCG (R)	472
D2MG968 *	TCAGCCTCACATGGAGTTTAACG	459
D2MG1008 *	CAGGGATGAAAGGGTCTTACGC	303
D2MG1280 *	GCTACACAGCATTGCCATAAAG	459/303

Tabla 4. Listado de las secuencias de los cebadores utilizados

2.4. RT-PCR y RT-qPCR

Para la reacción de RT-PCR se prepara una mezcla compuesta por tampón 1x, 0.2mM de dNTPs, 2µM de cada cebador, 0.06 U/µl de enzima BioTaq ADN polimerasa (Bioline), 2 µl de DMSO, 2mM de MgCl₂, ajustando con agua estéril hasta 24 µl, junto con 1µl del ADNc.

Las condiciones para la PCR utilizadas son las siguientes: 95°C 5 minutos, 95°C 30 segundos, 60.8°C 30 segundos, 72°C 30 segundos, 72°C 7 minutos, 4°C para conservar la muestra. En función del tamaño del fragmento a amplificar se modifica el tiempo de elongación (1 minuto por 1 kilobase); y según el gen, el número de ciclos. La temperatura de anillamiento calculada para los cebadores utilizados fue de 57°C, con la excepción de los de la PCR para el genotipado de los ratones FancA, que fue de 60.8°C.

Una vez terminada la PCR, se corren 10µl de cada muestra en un gel de agarosa de porcentaje variable según el tamaño del producto de la reacción. Para poder determinar que el tamaño del fragmento amplificado es el correcto, se corren también 2µl de marcador de 1kb.

En el caso de la RT-qPCR, la muestra de ADNc se diluye 20 veces en agua estéril y se prepara la mezcla con 12.5 µl de PerfeCTa SYBER Green SuperMix, ROX (Quanta BioSciences, Inc. Gaithersburg), 4µM de cada cebador, en un volumen final de 20µl, junto con 5µl del ADNc (diluido previamente 20 veces).

Cada muestra va en triplicado en la placa. Una vez rellena la placa, se sella con un film adhesivo compatible con el termociclador para la RT-qPCR modelo 7300 Real Time PCR System. Se inicia el programa: 95°C (5 minutos), 95°C (30 segundos), 57°C (30 segundos), 72°C (1 minuto). Durante 40 ciclos.

El fluoróforo SYBER Green se une específicamente a cadenas de doble hebra de ADN permitiendo que el sistema de PCR a tiempo real detecte la cantidad de fluorescencia producida en cada ciclo de PCR. Cuando termina la carrera, el software de análisis representa dicha fluorescencia gráficamente respecto al número de moléculas de ADN iniciales, de manera que aquellas muestras con mayor expresión del gen, la fluorescencia comienza en ciclos anteriores.

3. EXTRACCIÓN DEL ADN PARA GENOTIPADO DE RATONES FANCONI

Se corta el extremo de las colas de ratones recién destetados (1 mes tras su nacimiento), introduciendo cada una en un tubo etiquetado con el número del ratón al que pertenece, la jaula y la colonia de la que procede. A cada tubo se le añaden 400µl de buffer para extracción de ADN de colas, cuya composición es: 10mM de TrisHCl pH 8, 50mM de EDTA, 100mM de NaCl y 0.5% de SDS; junto con 20µl de proteinasa K (stock: 20mg/ml); dejando las muestras en la estufa a 55°C durante una noche. Al día siguiente, se añaden 330µl del mismo buffer, teniendo así un volumen final de 750µl. Se mezclan las muestras varias veces por inversión y se les añaden 250µl de NaCl 6M, volviéndolas a mezclar. A continuación, se centrifugan durante 10 minutos a 1500 rpm, a RT. Se transfiere el sobrenadante a un tubo nuevo, añadiendo 500µl de isopropanol para precipitar el ADN, invirtiendo la mezcla varias veces. Se vuelven a centrifugar a 1500 rpm durante 10 minutos, a 4°C. Se descarta el sobrenadante, lavando el pellet con 1ml de etanol al 70%, centrifugando a 1500 rpm durante 5 minutos, a 4°C. Se descarta el sobrenadante, dejando secar el pellet, y resuspendiéndolo a continuación en 500µl de agua estéril.

4. ANÁLISIS DE LOS NIVELES DE PROTEÍNA MEDIANTE WESTERN BLOT

Para preparar los lisados de las células, éstas se centrifugan a 1500 rpm durante 5 minutos, y se lavan una vez con PBS 1x, dándoles un pulso en una centrífuga a 4°C. Previamente se ha preparado en hielo el tampón de lisis (50mM Tris-HCl, pH 8; 120mM NaCl; 0.5% Nonidet P-40) con inhibidores de proteasas y fosfatasa (0.2mM ortovanadato sódico, 11.5 µg/ml leupeptina, 11.5 µg/ml aprotinina, 50 µg/ml fluoruro fenilmetilsulfónico, 10mM beta-glicerofosfato, 1mM DTT, 100mM fluoruro sódico).

Se disgrega cada pellet de células con el volumen adecuado de tampón de lisis junto con los inhibidores de proteasas y fosfatasa, en función del tamaño del pellet (100-300µl de buffer de lisis). Se resuspende cada muestra varias veces con la pipeta y se mantienen 10 minutos en hielo, centrifugándolas posteriormente a 1500 rpm a 4°C durante 20 minutos. Entonces, se cuantifica la concentración de la proteína, que se determina por BCA siguiendo las instrucciones del fabricante (Pierce, Rockford, USA) en placas multipocillo en el sistema lector de absorbancia Multiskan FC Microplate Photometer (Thermo Scientific Inc).

Las proteínas (cantidad variable entre 50µg-100µg) desnaturalizadas tras incubarlas durante 5 minutos a 100°C y añadirles el tampón de carga con DTT, se resuelven en un gel desnaturalizante SDS-PAGE del porcentaje de bis-acrilamida adecuado para la correcta migración de la proteína a estudiar, a 150 V.

La transferencia se realiza a una membrana BioTrace PVDF de 0.45 µm (Pall Corporation, Pensacola, Florida) durante 2 horas a 300 mA en un sistema de BioRad.

Una vez transferidas las proteínas, se lava la membrana durante 5 minutos con agua destilada en agitación, y se procede al bloqueo de la misma con la solución Tropic I-Block (Applied Biosystems, Foster City, CA), durante 1 hora. A continuación, se añade el anticuerpo primario diluido en la misma solución de bloqueo usada anteriormente, dejando la membrana en agitación a 4°C durante toda la noche. Los anticuerpos primarios y las diluciones que se han utilizado se nombran en la **Tabla 5**. Al día siguiente, se realizan varios lavados en TBS y se incuba la membrana con el anticuerpo secundario con peroxidasa (HRP) durante 1 hora a temperatura ambiente. Los anticuerpos secundarios se han usado todos a una única dilución 1:10000, y han

variado según la especie del anticuerpo primario, como se detalla en la **Tabla 6**. Seguidamente, se lava la membrana varias veces con TBS y se incuba con el reactivo SuperSignal West Dura (Thermo Scientific) durante 5 minutos, detectando la señal emitida mediante el sistema de análisis de imagen luminiscente automático ImageQuant LAS4000 Mini (General Electric Company).

Anticuerpo primario	Dilución	Especie	Referencia
anti-STAT1 p84/p91	1:3000	rabbit	sc-346 X
anti-pSTAT1 (Tyr 701)	1:250	rabbit	sc-7985-R
anti-GAPDH (FL-335)	1:100	rabbit	sc-25778
anti-p53	1:500	rabbit	sc-6243
anti-BIK (NBK)	1:100	rabbit	sc-10770
anti-FANCA	1:250	rabbit	sc-28215
anti-ERK2	1:500	rabbit	sc-154
anti-pERK (E-4)	1:250	mouse	sc-7383

Tabla 5. Anticuerpos primarios utilizados

Anticuerpo secundario	Referencia
anti-rabbit	sc-2004
anti-mouse	#1858413 Pierce
anti-goat	sc-2768

Tabla 6. Anticuerpos secundarios utilizados

5. ENSAYOS DE VIABILIDAD CELULAR

Para determinar la resistencia celular a determinados tratamientos, se plaquean 50.000 células por pocillo, en triplicados, en una placa de 96 pocillos y se incuban durante 3 días en presencia de los compuestos indicados en la **tabla 7**, en curvas con dosis crecientes. La viabilidad celular se determina usando el kit II de proliferación celular XTT (Roche, Basilea, Suiza) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Compuesto	Rango de dosis
Mitomicina C (MMC)	0.33-10 (μ M)
Cisplatino (CDDP)	0.33-10 (μ M)
Interferón gamma (IFNg)	2, 5, 10, 20, 25, 50 (ng/ml)
Epigallocatequina-3-galato (EGCG)	50, 100 (μ M)
5-aza-deoxicitidina (DCB)	10 (μ M)
U0126	5, 25, 50 (μ M)

Tabla 7. Compuestos y dosis utilizados en ensayos de viabilidad

6. ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD TRANSCRIPCIONAL MEDIANTE GENES REPORTEROS CON LUCIFERASA

ENSAYO DE PROMOTOR DE BIK Y DNp73: Se amplifica un fragmento de 596 pb (-556 al +40, referido al inicio de la transcripción) a partir de la región 5' reguladora del gen Bik usando cebadores específicos y se clona en el vector reportero de luciferasa pGL2basic (Promega, Madison, EEUU). Las delecciones de este constructo se obtienen mediante amplificación usando cebadores específicos y se clonan en pGL2basic. De igual manera, una secuencia de 1 kilobase anterior al punto de inicio de la transcripción de DNp73 correspondiente al segundo promotor del gen p73, se amplifica a partir de ADN genómico humano y se clona en el mismo vector reportero.

Las líneas celulares se cotransfectan con 1µg de cada constructos reporteros, 2µg de los vectores de expresión y 0.2µg de pEF-BOS-βgal, por triplicado, usando Superfect (Qiagen, Düsseldorf, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante. Pasadas 36 horas después de la transfección, se lisan los extractos celulares y se analiza la actividad luciferasa usando un sistema de análisis de este tipo de ensayo (Promega, Madison, EEUU). Los resultados se normalizan respecto a los valores de la actividad de la beta-galactosidasa obtenidos en los mismos extractos.

ENSAYO DE PROMOTOR DE STAT1: Se amplifica un fragmento de ADN genómico de 628 pares de bases (de -588 a +40, relativo al punto de inicio de la transcripción) a partir de la región reguladora 5´ de STAT1 usando cebadores específicos y, a continuación se clona en el vector reportero de luciferasa pGL2basic (Promega, Madison, EEUU). Se cotransfectan las células HEK293T con 2µg del constructo pGL2-STAT1 -588/+40, 1µg de un vector de expresión para hRasV12-S35 (produce una forma constitutivamente activa de ERK1) y 0.2µg de pRSV-βgal, por triplicado, usando Superfect (Qiagen, Düsseldorf, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante. Pasadas 36 horas después de la transfección, se lisan los extractos celulares y se analiza la actividad luciferasa usando un sistema de análisis de este tipo de ensayo (Promega, Madison, EEUU). Los resultados se normalizan respecto a los valores de la actividad de la beta-galactosidasa obtenidos en los mismos extractos.

7. ANÁLISIS DE LA METILACIÓN DEL PROMOTOR DE BIK

Se aísla el ADN genómico de las LCLs 450 y 450R usando DNazol (Invitrogen, Carlsbad, EEUU). Se modifica 1µg de ADN genómico con bisulfito empleando el kit EZ DNA Methylation Gold (Zymo Research, Irvine, EEUU). Se amplifica la región entre -314 y +44 con los cebadores 5´-AAAGGGTTAGATTTTGTATGGAT y 5´-ATACTAACAACGTCTATAAACCACC, y se clona en el plásmido pCR-II por TA-cloning (Invitrogen, Carlsbad, EEUU). Los plásmidos se transforman en las bacterias DH5-alfa y se secuencian 10 colonias de cada línea celular.

Para el análisis de la metilación del segundo promotor de p73 (P2p73), se deja incubando a 37°C durante la noche 1µg de ADN genómico de las líneas indicadas con

3 condiciones diferentes: con HpaI, con MspI y con agua. Al día siguiente, se inactivan las enzimas a 65°C durante 20 minutos. Para analizar la integridad de P2p73 en cada condición, se lleva a cabo por PCR con los primers

5'-GAAAGCAGGCAGGTGGTTTGGG y 5'-TGAATCCAACAACAAAACCCGC, que amplifican 1 kilobase anterior al punto de inicio de la transcripción.

8. CLONAJE DE LAS INTERFERENCIAS (shRNA STAT1, BIK, FANCC)

Los sobrenadantes virales con las interferencias frente a BIK y STAT1 se adquirieron de Sigma (MISSION shRNA Lentiviral Transduction particles). La referencia del shRNA de BIK es NM_001197, y la del shRNA de STAT1 es NM_007315.

En el caso del shRNA de FANCC se usaron los oligos GATCC-CCTGGATACAGGGTGTATTAT-CTCGAG-ATAATACACCCTGTATCCAGG-TTTTAA (Sense) y AGCTTAAAAA-CCTGGATACAGGGTGTATTAT-CTCGAG-ATAATACACCCTGTATCCAGG-G (Antisense) para clonar la interferencia de FANCC en el vector pRNAT entre los sitios BamHI y HindIII.

9. ESTUDIO DE LA MUERTE CELULAR PROGRAMADA MEDIANTE TINCIÓN CON IODURO DE PROPIO

Este protocolo se basa en la alteración en la estructura de la membrana que se da en células en apoptosis y en la capacidad de intercalarse en el ADN del yoduro de propidio. Por lo que aquellas células apoptóticas serán las que incorporen la tinción, pudiéndose analizar su señal mediante citometría de flujo.

Para ello, se lavan las células dos veces con PBS 1x frío y, a continuación, se resuspenden en el "binding buffer" a una concentración aproximada de 1 millón de células por ml. Entonces se transfieren 100 µl de la resuspensión a un tubo de 5 ml para citómetro, añadiendo 5 µl de yoduro de propidio (Cayman Chemical Company). Se agitan suavemente las células y se incuban durante 15 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Una vez pasado ese tiempo, se añaden 400 µl del "binding buffer" a cada tubo y se procede a analizar en el citómetro durante la hora siguiente.

10. ESTUDIO DE LA ESTABILIDAD DEL ARNm Y DE LA PROTEÍNA

La vida media de las proteínas se determina mediante la adición de cicloheximida (Sigma) a los cultivos de las líneas celulares, para inhibir la síntesis proteica. Las células tratadas con 30µM de cicloheximida, se recogen a diferentes tiempos para la extracción de la proteína. Las mismas cantidades de lisados celulares se someten a un protocolo estándar de Western Blot, incubando la membrana con anti-STAT1.

En el análisis de la estabilidad del ARN se emplea la actinomicina D, compuesto que inhibe la transcripción. Se añade a las células en el cultivo a una concentración de 10µM y se recogen a diferentes tiempos para extraer el ARN. Una vez hecha la retrotranscripción para obtener el ADNc, se analizan mediante RT-PCR los niveles del transcrito de interés.

11. ESTUDIOS EN RATONES KNOCK-OUT PARA FANCD2

11.1. EMBRIONES

Los ratones deficientes en Fancd2 utilizados en este proyecto fueron cedidos por el Dr Markus Grompe (Oregon Health & Science University, Portland) y mantenidos en un fondo genético C57/BL6. Las camadas se genotiparon mediante PCR multiplex, una vez extraído el ADN de las colas como se indica en el apartado 3 en el caso de ejemplares de 1 mes o a partir de ADN del saco vitelino en el caso de los embriones de los diferentes estadios (E12.5, E13.5). El día de aparición del tapón vaginal se consideró como estadio 0.5.

11.2. INCLUSIÓN EN PARAFINA

Para las tinciones histológicas y para el estudio de la apoptosis se prepararon de igual manera las cabezas de los embriones, una vez separadas del resto del animal mediante un corte a la altura del cuello.

Las cabezas se fijaron o/n en paraformaldehído 4% en PBS en agitación, añadiendo un volumen de fijador de 2 mL por pieza, manteniéndolos a 4°C.

Al día siguiente, se deshidrataron progresivamente las muestras como se indica en la **tabla 8**, a temperatura ambiente.

Reactivos	Tiempo
PBS 1x	20 minutos
Etanol 25%	20 minutos
Etanol 50%	20 minutos
Etanol 70%	20 minutos
Etanol 96%	20 minutos
Etanol 100% (2 veces)	20 minutos (E12.5-E13.5)
Xilol (2 veces)	20 minutos (E12.5-E13.5)

Tabla 8. Tiempos para deshidratar las muestras (*Son tiempos exactos)

Los cambios tanto del PBS 1x como de las diferentes gradaciones de etanol se realizan en tubos de plástico de 2 mL y en agitación constante. Posterior al tiempo en etanol al 96%, se deja la pieza durante 3 minutos en etanol al 96% con eosina, que colorea el tejido facilitando así la posterior orientación de las cabezas en el bloque de parafina. El paso del xilol hay que realizarlo en campana y en un vial de vidrio, ya que este compuesto digiere el plástico. El xilol vuelve transparente el tejido.

Una vez terminada la deshidratación de la pieza, se transfiere ésta con una pipeta Pasteur a un molde con parafina líquida que se ha introducido previamente en la estufa

de 37°C. En caso de que se haya introducido xilol en el molde, se realizarán los cambios de parafina que sean necesarios para retirar los restos de xilol que puedan quedar. Una vez finalizados estos cambios, y ayudándose de unas agujas previamente calentadas con un mechero, se orienta la cabeza de manera que quede la nuca hacia arriba y el hocico apoyado en la base del molde, para poder así realizar cortes frontales. A continuación, se sumerge lentamente el molde con la pieza ya orientada en un baño de agua enfriada con hielo, dejándolo durante 1 hora.

Una vez incluida y orientada la muestra en el bloque de parafina, se procede a realizar los cortes con el microtomo, en secciones de 7 micras, distribuyéndolos en portas gelatinizados.

Una vez terminada la preparación de los cortes de las cabezas, se pueden llevar a cabo el análisis del patrón de muerte celular mediante ensayo de TUNEL y de la morfología mediante tinción con hematoxilina y eosina, como se detalla en los siguientes apartados.

11.3. Tinción hematoxilina-eosina de los cortes de las cabezas

El primer paso es el de la desparafinación a temperatura ambiente de los cortes en las cubetas de portas. Para ello, se sigue la **tabla 9**, retirando así los restos de parafina y dejando el tejido hidratado.

(*importante posar en papel antes de pasar al etanol 100% para evitar que el xilol residual forme burbujas que puedan alterar los cortes)

Reactivos	Tiempo
Xilol I	10 minutos
Xilol II	5 minutos *
Etanol 100% I	5 minutos
Etanol 100% II	5 minutos

Reactivos	Tiempo
Etanol 96%	5 minutos
Etanol 70%	5 minutos
Etanol 50%	5 minutos
Agua destilada	5 minutos

Tabla 9. Tiempos para rehidratar las muestras

Una vez desparafinado el tejido, se tiñe con hematoxilina al 1% durante 5 minutos. A continuación, se deja los portas lavando durante 50 minutos en agua corriente hasta que adquieran un color azul. Entonces se introducen las muestras en agua destilada durante 5 minutos. Tras este lavado, se procede a teñir el tejido con eosina al 0.5% durante 3 minutos, y se lava rápidamente en agua destilada para eliminar el exceso de colorante. Posteriormente, se posan las cubetas con los portas en papel y se les da un pase rápido de etanol 70% a etanol 96%, dejándolo a continuación durante 3 minutos en el etanol 100% I. Pasado este tiempo, se introduce la cubeta en el etanol 100% II durante 5 minutos. Los pasos por los alcoholes de concentración creciente tienen como objetivo deshidratar las muestras. Y, antes de pasarlo al xilol, se posa en papel por la misma razón ya comentada anteriormente. Entonces se dejan los portas 5 minutos en cada xilol (I y II) para aclarar los tejidos. Una vez que están las muestras en el Xilol II, se montan las preparaciones secando cada porta de manera individual por la parte inferior, depositando varias gotas de medio de montaje (Cytoshild), y colocando el cubre (24x60 mm) previamente introducido en xilol. De esta manera se conservan las muestras.

11.4. Ensayo de TUNEL

Las células apoptóticas se detectaron mediante ensayo TUNEL (Terminal deoxinucleotidyl transferase-mediated deoxyUridine triphosphate-Nick End Labeling),

basado en el marcaje de los extremos 3'OH generados por la fragmentación del ADN durante la apoptosis. El ensayo TUNEL se llevó a cabo con el kit "Apoptag Fluorescein In Situ Apoptosis Detection" (Intergen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los tejidos rehidratados se trataron con proteinasa K (20 µg/ml) y se lavaron con PBS 1x. Las muestras se introdujeron en tampón de equilibrado y se incubaron con la enzima "Working Strength TdT" durante 1 hora y 30 minutos a 37°C en una cámara húmeda. La reacción se paró con el tampón de lavado (Stop/Wash buffer). Entonces, los tejidos se lavaron con PBS 1x y se incubaron con el conjugado anti-digoxigeninfluoresceína durante 30 minutos a temperatura ambiente en una cámara húmeda, en oscuridad. Tras lavarlos de nuevo con PBS 1x, las muestras se prepararon con el medio de montaje Vectashild-DAPI. En esta tesis, esta técnica se ha empleado para analizar la distribución de células apoptóticas en secciones frontales de 7 micras de cabezas de embriones de ratones homocigotos para el gen *Fancd2*.

4) RESULTADOS

RESULTADOS

En este trabajo se han realizado estudios en 3 de los grupos de complementación de la anemia de Fanconi: FA-C, FA-A y FA-D2. En conjunto, se ha tratado de identificar mecanismos moleculares, comunes y divergentes, aberrantemente mantenidos por la ausencia de proteínas FANC funcionales, que puedan explicar los siguientes aspectos: en primer lugar, la mayor sensibilidad a agentes que producen ICL (interstrand crosslinks) en el ADN y a citoquinas inflamatorias (ver apartados 4.1 y 4.2), características que son la base del fallo medular de los pacientes FA; y en segundo lugar, la microftalmia, una de las malformaciones congénitas más comunes en esta patología (ver apartado 4.3).

En el primer apartado (4.1) se persigue la identificación de genes proapoptóticos cuya expresión aberrante en células deficientes en el gen FANCC pueda explicar la propensión a la apoptosis de los progenitores hematopoyéticos de estos pacientes.

En el segundo apartado (4.2) se indaga en la hipersensibilidad de los progenitores hematopoyéticos FA tanto a citoquinas inhibitorias como a drogas genotóxicas, utilizando un modelo de linfoblastos deficientes en el gen FANCA.

En el tercer apartado (4.3) se realiza un estudio descriptivo sobre las alteraciones oculares que presenta el modelo murino con mutación inactivante del gen Fancd2. Éste es un abordaje inédito de la anemia de Fanconi, ya que las anomalías congénitas que padecen los pacientes, como la microftalmia, no han sido prácticamente investigadas. De ahí el interés de esta aproximación.

4.1. “BIK ES UN MEDIADOR DE LA SENSIBILIDAD A AGENTES ENTRECruzANTES DEL ADN DE LAS LÍNEAS CELULARES LINFOBLASTOIDES DE AF-C”

4.1.1. RASTREO DE GENES APOPTÓTICOS EN LÍNEAS CELULARES DE AF DEFICIENTES PARA EL GEN FANCC

Como se ha comentado en la introducción, las células Fanconi presentan una elevada predisposición a la apoptosis, lo que les condiciona a presentar una alta sensibilidad a agentes generadores de enlaces entre las cadenas del ADN (ICL), como es el caso del cisplatino (CDDP) y la mitomicina C (MMC). Basándonos en nuestra hipótesis de que estas células podrían presentar alteraciones moleculares en vías de regulación de muerte celular que podría predisponerlas a tener una mayor sensibilidad a compuestos que dañan el ADN, decidimos analizar los niveles de expresión basales de una serie de genes apoptóticos en una línea celular de linfoblastos deficientes en la proteína FANCC (FA-C) y su homóloga corregida por reversión genética espontánea (EUFA 450 y 450R).

Se analizaron mediante RT-PCR los niveles de expresión de los siguientes genes típicamente asociados a la apoptosis: BIK, NOXA, Mcl-1L, Mcl-1S, Bcl-2, PUMA, Bcl-XL, Bcl-XS, BAX, BIM-L. Como se puede observar en la **figura 5A**, BIK y PUMA presentan una elevada expresión en la línea de linfoblastos de AF-C. Estos resultados fueron confirmados posteriormente mediante RT-qPCR en cuatro de los genes proapoptóticos: BIK, PUMA, NOXA y BAX, tanto en células EUFA450 y EUFA 450R, como en otra línea celular de linfoblastos AF del mismo grupo de complementación y su homóloga corregida mediante transducción del gen FANCC agreste (HSC536 y HSC536+FC) (**Figura 5B y 5C**).

Dado que BIK presentaba las mayores diferencias y más consistentes, centramos nuestros estudios en analizar su expresión. Por un lado, analizamos extractos de proteína total de la línea de LCLs AF-C y su homóloga isogénica corregida (450 y 450R) mediante western blot con un anticuerpo específico para BIK. En la **figura 5D**, queda patente que la mayor expresión del mensajero de BIK se ve reflejada en una mayor producción de su proteína, tanto en condiciones basales como en respuesta a

MMC. Investigamos entonces si esta observación era trasladable a otro modelo celular. Analizamos el nivel de ARNm de BIK en una línea celular de carcinoma de células escamosas control derivada de un paciente FA del grupo de complementación C (EUFA SCC 1331), comparándola con su homóloga corregida mediante la sobreexpresión del gen FANCC (EUFA SCC 1331+FANCC) y con otra línea de SCC derivada de un paciente no Fanconi. Observamos una mayor expresión del mensajero de BIK en las células deficientes en el gen FANCC en comparación con las células corregidas y con las derivadas de individuos sanos (**Figura 5E**).

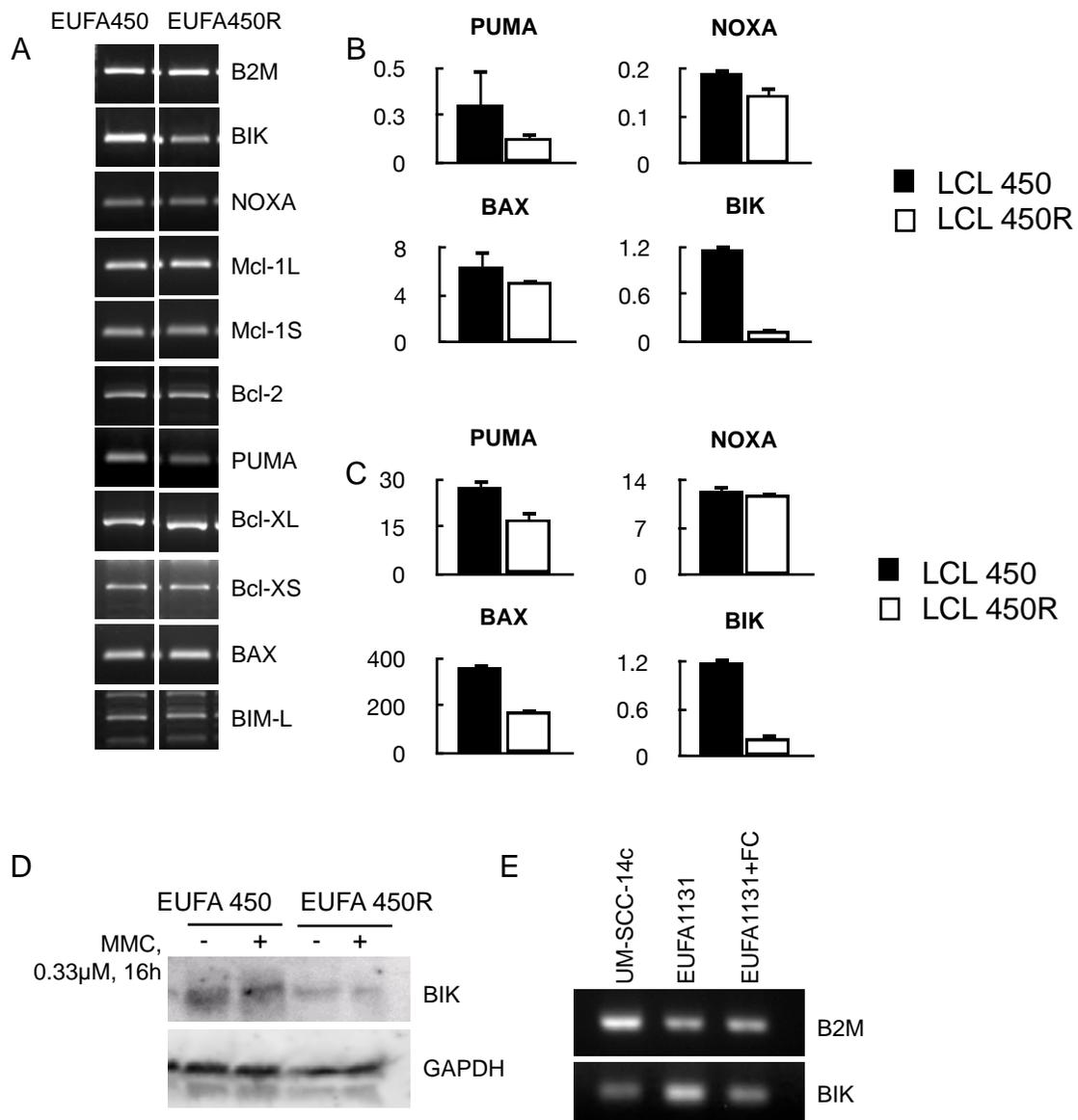


Figura 5. Bik está sobreexpresado en células deficientes en FANCC. A) Análisis mediante RT-PCR de genes relacionados con la apoptosis en una línea celular linfoblastoide del subtipo C de anemia de Fanconi (EUFA 450) y en su homóloga corregida espontáneamente (EUFA 450R). La beta-2-microglobulina se ha usado como control de expresión. B) Análisis mediante RT-qPCR de los niveles transcripcionales de PUMA, NOXA, BAX y BIK en las mismas líneas del apartado A. C) Análisis mediante RT-qPCR de los mismos genes pro-apoptóticos que en el apartado B, pero en otra línea linfoblastoide de Fanconi tipo C (HSC536) y su homóloga corregida (HSC536+FC). D) Extractos de proteína total de cultivos celulares de EUFA 450 y EUFA 450R tratados durante 16 horas con 0.33 μ M de mitomicina C (MMC) se analizan mediante western blot para los niveles de expresión de BIK. GAPDH se control de carga. E) Análisis mediante RT-PCR de los niveles de ARN de BIK en tres líneas celulares de tumores escamosos de cabeza y cuello: una control (UM-SCC-14c), una derivada de un paciente con anemia de Fanconi tipo C (EUFA 1131) y su homóloga corregida mediante sobreexpresión del gen funcional (EUFA 1131+FC). La beta-2-microglobulina se ha usado como control de expresión.

4.4.2. EL PROMOTOR DE BIK ES MÁS ACTIVO EN LÍNEAS CELULARES DE AF DEFICIENTES PARA EL GEN FANCC

Con la idea de identificar los mecanismos involucrados en la desregulación de la transcripción de BIK decidimos explorar la actividad transcripcional del promotor de BIK en células LCLs FA-C. Para ello, clonamos las 556 pares de bases del promotor de BIK anteriores al inicio de la transcripción del gen dirigiendo la expresión del gen reportero luciferasa (pGL2basic) y lo introdujimos mediante transfección transitoria en la línea celular de linfoblastos AF-C y su homóloga corregida (EUFA 450 y 450R). Como se puede observar en la **figura 6A**, encontramos que la región promotora estudiada presenta una actividad transcripcional muy superior en LCL deficientes en FANCC.

Con el objetivo de determinar la influencia de FANCC sobre la actividad del promotor de BIK, co-transfectamos de manera transitoria en una línea de carcinoma de colon (HCT116+/+) un shRNA contra FANCC, bloqueando su expresión, y el vector reportero con el fragmento del promotor de BIK (-556/+40). Como se muestra en la **figura 6B**, la inhibición de la expresión del gen FANCC mediante shRNA recapitula los efectos observados en células procedentes de pacientes Fanconi deficientes en FANCC, provocando la activación del promotor de BIK. Por otro lado, realizamos la comprobación inversa en el mismo tipo celular, es decir, co-transfectamos de manera

transitoria el vector reportero con el mismo fragmento del promotor de BIK junto con un vector de expresión de FANCC. Como se observa en la **figura 6C**, la sobreexpresión artificial del gen FANCC en HCT116+/+ reducía notablemente la actividad transcripcional de BIK.

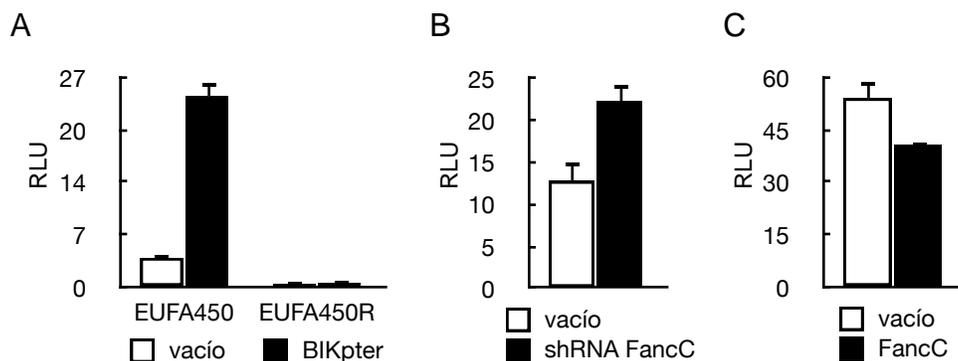


Figura 6. FANCC regula la actividad del promotor de BIK. A) Transfección con un vector reportero luciferasa que contiene las 556 pares de bases previas al sitio de inicio de la transcripción del gen BIK o que contiene una secuencia inespecífica en las líneas linfoblastoides tipo C EUFA 450 y EUFA 450R. En la gráfica se representan la actividad relativa de la luciferasa (RLU) en ambas líneas, correspondiendo las barras blancas a la actividad del vector vacío y las negras, al vector con el fragmento del promotor de BIK. B) Co-transfección de una línea tumoral de cáncer de colon (HCT116+/+) con un vector reportero luciferasa con la región de 556 pares de bases del promotor del gen BIK junto con una construcción de interferencia inespecífica (barra blanca) o con una específica para FANCC (barra negra). Los datos obtenidos se representan en unidades de actividad relativa de la luciferasa (RLU). C) Co-transfección en la línea de carcinoma de colon (HCT116+/+) de la misma región del promotor del gen BIK en un vector reportero luciferasa junto con un vector vacío (barra blanca) o con un vector de expresión de FANCC (barra negra). Los datos obtenidos se representan en unidades de actividad relativa de la luciferasa (RLU).

4.4.3. LA EXPRESIÓN DE BIK SE INDUCE TRAS EL TRATAMIENTO DE LÍNEAS CELULARES AF-C CON AGENTES GENOTÓXICOS

Como se ha comentado anteriormente, la integridad de la ruta de señalización de Fanconi condiciona la sensibilidad a agentes genotóxicos (cisplatino o mitomicina C) de las células. La **figura 7A** muestra una gráfica de viabilidad tipo en respuesta a dosis

crecientes de cisplatino. En este caso, se trata de una línea linfoblastoide de AF-C y su homóloga corregida (EUFA 450 y 450R).

Con el objetivo de determinar si el gen proapoptótico BIK pudiese estar mediando la muerte celular inducida por agentes genotóxicos, decidimos estudiar si la inducción de ICL producía una respuesta en la expresión de este gen. Como se puede observar en la **figura 7B**, un tratamiento de 24 horas con cisplatino en la línea celular de linfoblastos FA-C EUFA 450 y su homóloga corregida, provoca un marcado incremento en la expresión de BIK, siendo el efecto ausente o menos pronunciado en el caso de otros genes pro-apoptóticos analizados en el mismo experimento. Asociado con el incremento del mRNA, observamos una inducción similar de la expresión de la proteína BIK tras un tratamiento con 1µM de MMC durante 24 horas (**Figura 7C**). Resultados similares se observaron al tratar con mitomicina C otra línea celular del mismo grupo de complementación (HSC536 y su homóloga corregida) (**Figura 7D**).

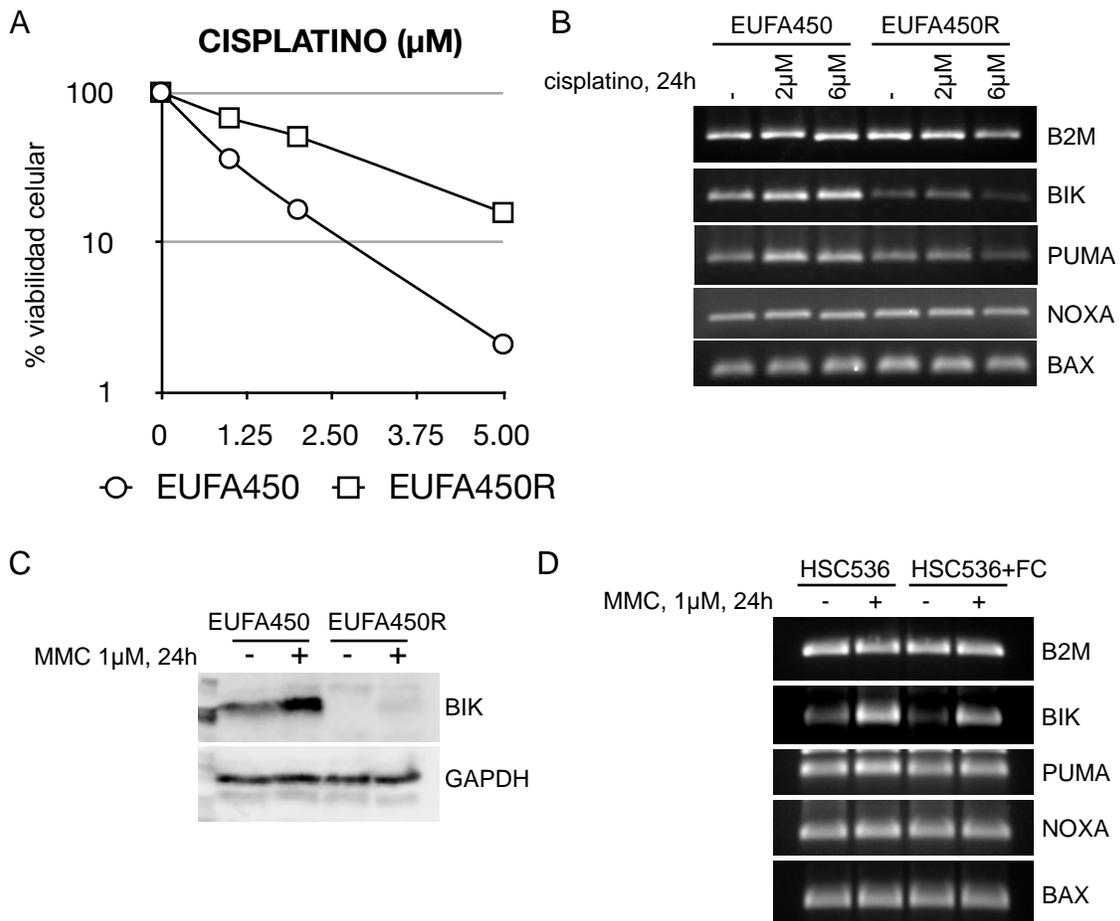


Figura 7. Los niveles tanto del transcrito como de la proteína de BIK son inducidos por agentes entre-cruzantes del ADN. A) Ensayo de viabilidad celular en respuesta a dosis crecientes de cisplatino (CDDP) durante 3 días de exposición de una línea linfoblastoide de Fanconi C (EUFA 450) y su control (EUFA 450R). B) Análisis mediante RT-PCR de los niveles de ARN de BIK, PUMA, NOXA y BAX a partir de extractos celulares recogidos tras un tratamiento de 24 horas con CDDP a 2 y 6 μM de la línea celular de Fanconi C EUFA 450 y de su homóloga corregida EUFA 450R. La beta-2-microglobulina se emplea como control de expresión. C) Análisis mediante western blot de los niveles proteicos de BIK a partir de extractos de proteína total de EUFA 450 y su control expuestas durante 24 horas a una dosis única de 1 μM de mitomicina C (MMC). GAPDH es el control de carga. D) Análisis mediante RT-PCR de los niveles de BIK, PUMA, NOXA y BAX a partir de extractos de ARN de la línea linfoblastoide de Fanconi C (HSC536) y su homóloga corregida (HSC536+FC) previamente incubadas durante 24 horas con una dosis de 1 μM de MMC. La beta-2-microglobulina es el control de expresión.

4.4.4. LA INHIBICIÓN DE LA EXPRESIÓN DE BIK HACE A LAS LÍNEAS CELULARES DE AF DEFICIENTES PARA EL GEN FANCC MÁS RESISTENTES A AGENTES GENOTÓXICOS

Una vez confirmada la inducción de la expresión de BIK por daño en el ADN, decidimos investigar si BIK tiene un papel como mediador de la hipersensibilidad de las células FA-C a agentes genotóxicos. Para ello bloqueamos en las líneas celulares EUFA 450 y 450R, la expresión de BIK usando una construcción de interferencia comercial (shRNA) para analizar posteriormente los cambios que esta reducción en los niveles de BIK tiene en la respuesta celular al tratamiento con cisplatino. En la **figura 8A** se muestra el resultado de la RT-PCR en la que se analiza la eficacia de la interferencia contra BIK. Los niveles de su mensajero se reducían hasta en un 50%. En un segundo paso, exploramos las consecuencias de la reducción de los niveles de BIK sobre la viabilidad celular. Como se puede observar en la **figura 8B**, la reducción de BIK se asocia con una mejoría significativa en la viabilidad celular total, siendo estas células más resistentes al tratamiento con el cisplatino. En esta misma línea y usando el mismo sistema de inhibición de BIK, observamos cómo la reducción en los niveles de este gen provoca una reducción en el porcentaje de células que se encuentran en la fase del

ciclo celular sub-G1 (apoptosis) (**figura 8C**). Por último, cuantificamos el porcentaje de células muertas (EUFA 450 shRNA NT y shRNA BIK) teñidas con yoduro de propidio que habían sido o no tratadas con diferentes dosis de cisplatino (0.33 y 1 μM) durante 24 horas. Como se puede observar en la **figura 8D**, el porcentaje de células EUFA 450R teñidas con yoduro de propidio se veía significativamente reducido en aquellas células con una expresión de BIK reducida.

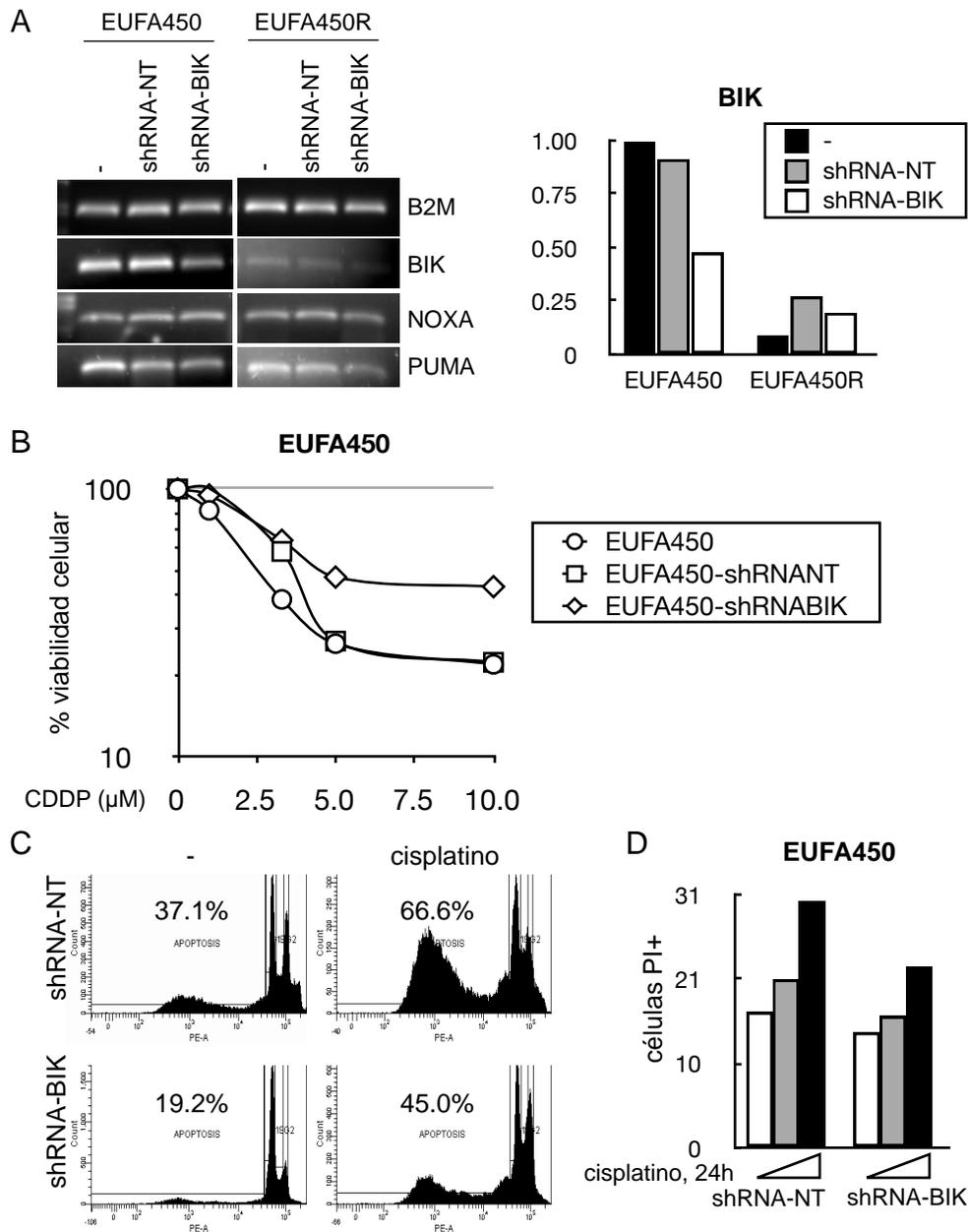


Figura 8. La reducción “in vitro” de los niveles de BIK confiere mayor resistencia a la línea linfoblastoide de Fanconi C frente al cisplatino. A) Análisis mediante RT-PCR de la eficacia y especificidad de la construcción de interferencia contra BIK (shRNA-BIK) respecto a la interferencia sin diana (shRNA-NT) en la línea linfoblastoide de Fanconi C (EUFA 450) y su control (EUFA 450R). Se analizan los niveles de BIK, NOXA y PUMA. La beta-2-microglobulina se ha usado como control de expresión. La gráfica de barras es la cuantificación de las señales de cada banda del nivel de expresión de BIK (barra negra: basal, barra gris: interferencia inespecífica, barra blanca: interferencia contra BIK). B) Ensayo de viabilidad celular en el que se muestran las curvas de respuesta a dosis crecientes de cisplatino durante 3 días de tratamiento de la línea linfoblastoide de Fanconi C (EUFA 450) sin trasducir (círculos), trasducida con la interferencia sin diana (cuadrados) y trasducida con la interferencia contra BIK (rombos). C) Análisis del ciclo celular mediante citometría de la línea linfoblastoide de Fanconi C (EUFA 450) trasducida con la construcción de interferencia inespecífica (shRNA-NT) o con la interferencia contra BIK (shRNA-BIK), sin o con tratamiento de cisplatino a 1 μ M durante 24 horas. En cada gráfica se indica el porcentaje de células en sub-G1 (en apoptosis). D) Análisis del número de células en apoptosis mediante tinción con yoduro de propidio (PI) y posterior citometría. Tanto la línea linfoblastoide de Fanconi C (EUFA 450) trasducida con la interferencia sin diana como con la interferencia contra BIK se han incubado previamente durante 24 horas con cisplatino a 0.33 μ M (barra gris), 1 μ M (barra negra) o sin tratamiento (barra blanca). En la gráfica se ha representado el porcentaje de células teñidas por el yoduro de propidio en cada condición.

4.4.5. LA MAYOR EXPRESIÓN BASAL DE BIK EN LÍNEAS CELULARES DE AF DEFICIENTES PARA EL GEN FANCC NO ESTÁ RELACIONADA CON UNA MAYOR SEÑALIZACIÓN EN VÍAS DE DAÑO EN EL ADN

Dado el papel relevante que los niveles de BIK parecen tener en la respuesta a agentes genotóxicos activando la apoptosis, decidimos explorar los mecanismos que subyacen a la desregulación de este gen en ausencia de FANCC. Comenzamos comprobando si esos mayores niveles basales de BIK observados en nuestro modelo celular de línea linfoblastoide de AF-C podían deberse a una acumulación de daño basal en el ADN. Para ello, inhibimos la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y la activación de la tirosín quinasa c-Abl, ambos mediadores de la señalización de este tipo de daño sobre el ADN, mediante el uso de N-acetil-cisteína (NAC) e imatinib, respectivamente.

En primer lugar, realizamos un pretratamiento durante 24 horas de las LCLs AF-C con un antioxidante, la N-acetil-cisteína (NAC), a 10 μ M, previo a la adición de cisplatino (1

μM). Sin embargo, como se muestra en la **figura 9A**, solamente se observa una bajada de los niveles basales de BIK en las células controles, no así en las Fanconi. Aunque la NAC sí reduce la inducción del gen producida por el cisplatino, en ambos modelos. Esto indica que los ROS no son responsables de la elevada expresión basal de BIK en las células Fanconi, pero se confirma el papel ya descrito de los ROS en el mecanismo de acción del cisplatino. Se analizaron también otros genes de apoptosis (PUMA, BAX y NOXA) pero no se apreciaron variaciones.

En segundo lugar, tratamos a las células con un inhibidor de la tirosín quinasa c-Abl, el Imatinib. Como se muestra en la **figura 9B**, la exposición de las células a este compuesto no redujo los niveles basales del ARNm de BIK en la línea linfoblástide de Fanconi C, por lo que tampoco parece que el c-Abl tenga implicación en la mayor expresión de BIK en las células Fanconi.

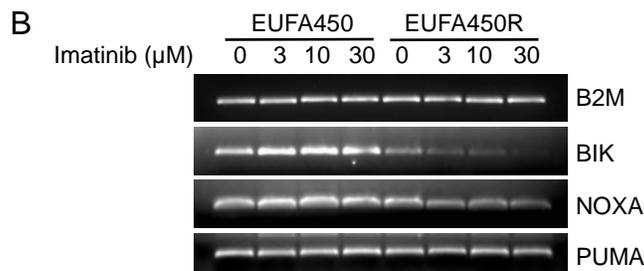
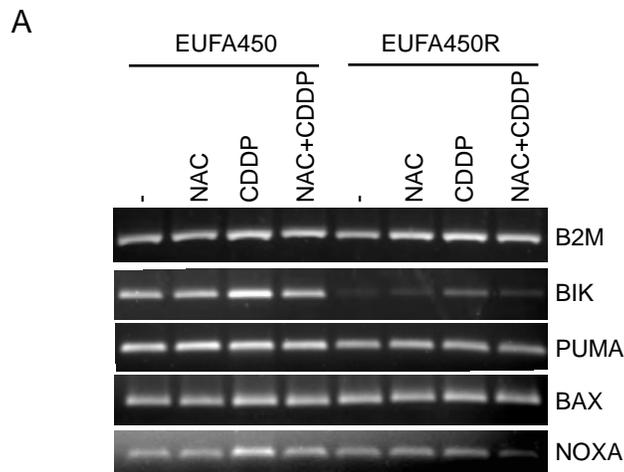


Figura 9. Los mayores niveles basales de transcrito de BIK no están relacionados con una mayor señalización en vías de daño en el ADN. A) Análisis mediante RT-PCR de los niveles de BIK, PUMA, BAX y NOXA a partir de los extractos de la línea linfoblastoide de Fanconi C (EUFA 450) y de su homóloga corregida (EUFA 450R) previamente incubadas con 100 μ M de N-acetil-cisteína (NAC) (compuesto antioxidante), 5 μ M de cisplatino (CDDP), o la combinación de ambos compuestos (NAC+CDDP), durante 24 horas. La beta-2-microglobulina se ha usado como control de expresión. B) Análisis mediante RT-PCR de los niveles de BIK, NOXA y PUMA en extractos de las mismas líneas celulares tratadas con dosis crecientes de imatinib (inhibidor de la quinasa c-abl) durante 24 horas.

4.4.6. LA EXPRESIÓN DE BIK SE INDUCE POR UN AGENTE DESMETILANTE, LA 5-AZA-2´-DEOXCITIDINA, QUE TAMBIÉN SENSIBILIZA A LÍNEAS DE LINFOBLASTOS CONTROL AL EFECTO DE AGENTES ENTRECruzANTES DEL ADN

Basándonos en trabajos previos en los que se describe una regulación de la expresión de BIK por mecanismos epigenéticos, específicamente por metilación del ADN, consideramos la posibilidad de que la ausencia de FANCC funcional indujera de forma indirecta o directa, cambios en el estado de metilación del gen y en consecuencia en sus niveles transcripcionales. Estudiamos así la respuesta del gen al tratamiento con un agente desmetilante, la 5-aza-deoxicitidina (decitabina = DCB). Al analizar mediante RT-PCR los niveles de BIK, observamos una clara inducción de su ARNm (**Figura 10A**). Una vez comprobado qué mecanismos dependientes de metilación podían estar jugando un papel en la expresión de BIK, fuimos a analizar el estado de metilación basal del promotor del gen, en las LCL AF-C. Sorprendentemente, el análisis de 31 sitios CpG susceptibles de metilación localizados entre las posiciones -314 y +44 del promotor proximal del gen BIK demostró que esta secuencia se encontraba marcadamente hipometilada, tanto en células deficientes en FANCC como en sus controles (**Figura 10B**).

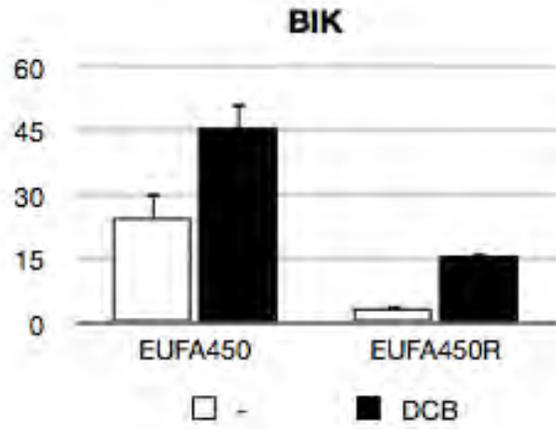
Descartado un cambio en el grado de metilación del promotor de BIK que influyera directamente en la regulación de su expresión, consideramos un mecanismo indirecto de activación de BIK por medio de otros factores inducidos por la decitabina. Como se muestra en las **figuras 10C y 10D**, encontramos que Δ Np73 es inducido tanto por la

decitabina como por la mitomicina C, siguiendo un patrón muy similar al observado para BIK. Sin embargo, otros genes relacionados con este factor, como p73TA o p53, no mostraban cambios en su perfil de expresión en respuesta a la decitabina. Teniendo en cuenta estas observaciones nos planteamos estudiar si Δ Np73 sería capaz de influir en los niveles transcripcionales de BIK. Para ello, realizamos experimentos de co-transfección en la línea celular HEK293FT introduciendo, por un lado, una región del promotor de BIK entre -998 y +40 en relación al sitio de inicio de la transcripción del gen BIK, junto con vectores de expresión de Δ Np73. Como se muestra en la **figura 10E**, Δ Np73 producía un incremento de hasta dos veces en la actividad del promotor de BIK, al contrario que p53, el cual no tenía efecto, demostrando que Δ Np73 es capaz de inducir directamente la transcripción de BIK. De hecho, encontramos que la delección específica de la región localizada entre las posiciones -96 y el sitio de inicio de la transcripción (+1) del promotor de BIK reduce drásticamente tanto la actividad basal del promotor como su inducción por Δ Np73 (**Figura 10F**).

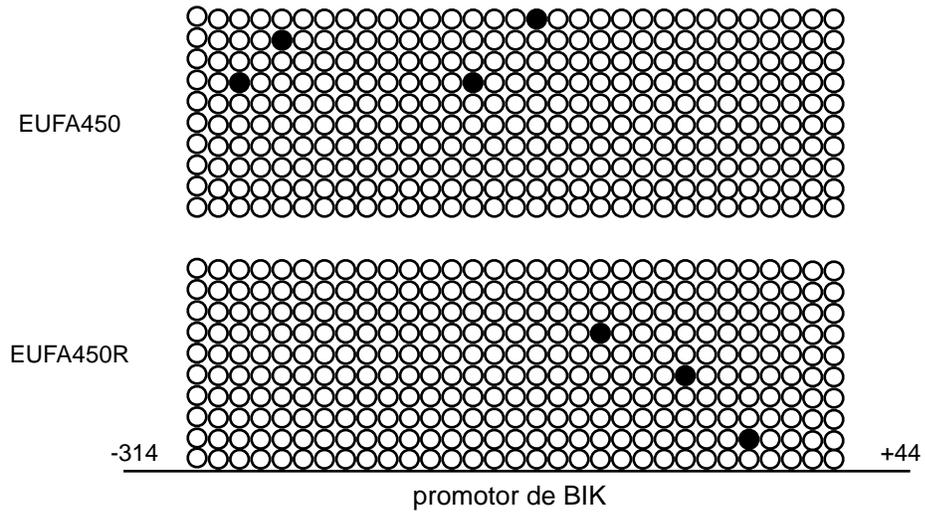
Finalmente, puesto que Δ Np73 aumenta su expresión en respuesta al tratamiento con 5-aza-deoxicitidina, decidimos analizar si cambios en el perfil de metilación de su promotor regulan su expresión en nuestro modelo celular. En la **figura 10G** se puede ver que la región analizada del promotor de Δ Np73 presenta una menor metilación en la línea linfoblastoide de Fanconi C. Este resultado sugiere que el patrón alterado en la metilación de Δ Np73 en células deficientes en FANCC puede estar directamente involucrado en la sobreexpresión basal de BIK que presentan estas células

A la vista de estos resultados sería de esperar que células no deficientes en FANCC tratadas con el agente desmetilante vieran comprometida su viabilidad celular debido al incremento de BIK mediado por Δ Np73. Efectivamente, el tratamiento con el agente desmetilante sensibilizó a LCLs control al tratamiento con MMC, hasta un grado similar al de las células deficientes en FANCC. (**Figure 10H**).

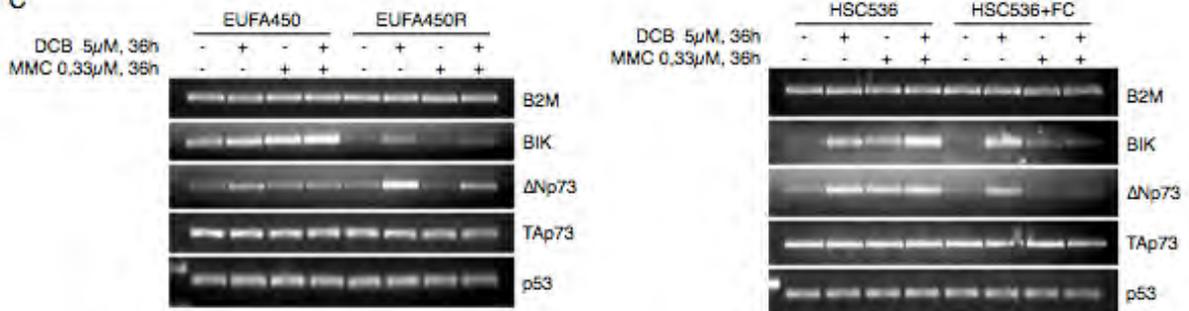
A



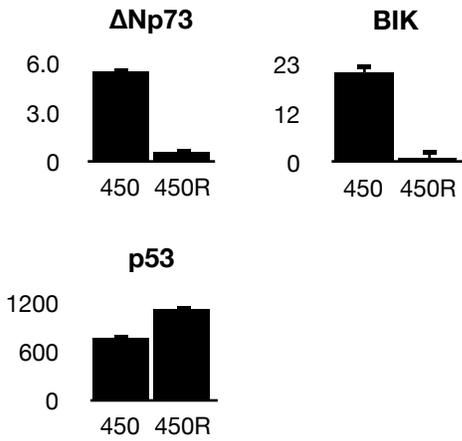
B



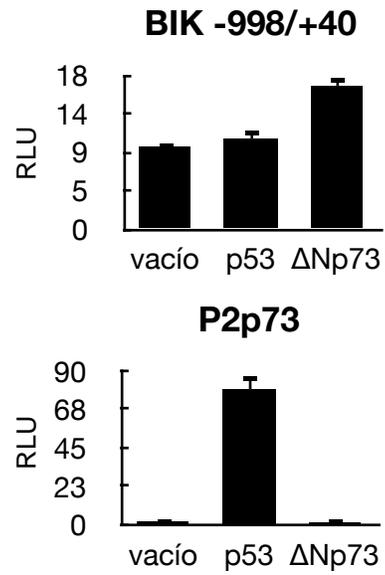
C



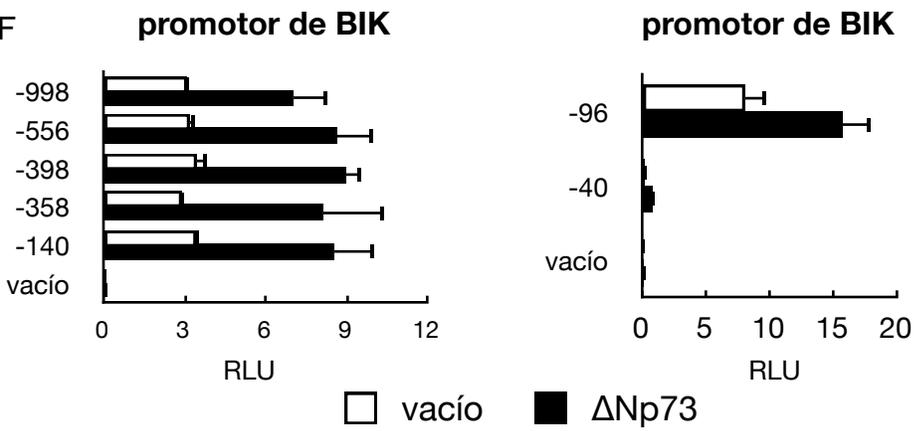
D



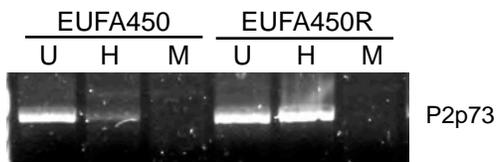
E



F



G



H

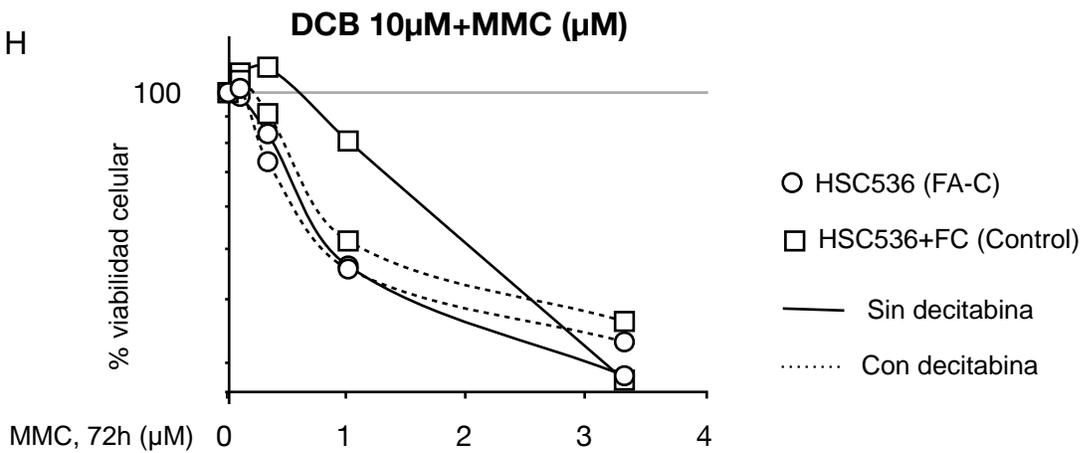


Figura 10. La 5-aza-deoxicitidina (decitabina) induce la expresión de BIK de manera indirecta a través de DNp73 y sensibiliza a las líneas linfoblastoides control frente a agentes entrecruzantes del ADN. A) Análisis mediante RT-qPCR de los niveles de BIK a partir de extractos de líneas linfoblastoides de Fanconi C (EUFA 450) y su control (EUFA 450R) previamente incubadas durante 36 horas con 5 μ M de decitabina. La beta-2-microglobulina se ha usado como control de expresión. B) Patrón de metilación de 31 dímeros CpG entre las posiciones -314 y +44 de BIK (círculo blanco = dímero CpG no metilado) (círculo negro = dímero CpG metilado) C) Análisis por RT-PCR de los niveles de BIK, DNp73, TAp73 y p53 en extractos de dos líneas linfoblastoides de Fanconi C (EUFA 450, HSC536) y sus respectivos controles (EUFA 450R, HSC536+FC) con tratamientos individuales de decitabina a 5 μ M (2^o y 6^o carril), de mitomicina C a 0.33 μ M (3^o y 7^o carril) y de la combinación de ambos (4^o y 8^o carril). El tiempo de duración de cada tratamiento fue de 36 horas. La beta-2-microglobulina se usó como control de expresión. D) Análisis mediante RT-qPCR de los niveles basales de DNp73, BIK y p53 en extractos de la línea linfoblastoide de Fanconi C EUFA 450R y de su homóloga corregida (EUFA 450R). La beta-2-microglobulina se usó como control de expresión. E) Co-transfección de la línea embrionaria humana de riñón HEK293FT con una región del promotor de BIK de -998 a +40 (primera gráfica) o del segundo promotor de p73 (p2p73) (segunda gráfica) previamente clonada en un vector reportero luciferasa junto con un vector de expresión vacío, uno de expresión de p53 u otro de expresión de DNp73. Los datos obtenidos se representan en unidades de actividad relativa de la luciferasa (RLU). F) Análisis en HEK293FT mediante ensayos luciferasa de cotransfección de la actividad de diferentes regiones (delecciones seriadas) del promotor del gen BIK entre la posición +40 y las indicadas en las gráficas relativas al sitio de inicio de la transcripción (-998, -556, -398, -358, -140, -96, -40), junto con vector vacío (barras blancas) o con vector de expresión de DNp73 (barras negras). Los datos obtenidos se representan en unidades de actividad relativa de la luciferasa (RLU). G) Análisis de la metilación del segundo promotor de p73 (p2p73) en la línea linfoblastoide de Fanconi C EUFA 450 y su control EUFA 450R mediante digestión enzimática de extractos de ADN genómico con la enzima HpaII (H) (sensible a metilación), la enzima MspI (M) (no sensible a metilación) o sin enzima (U). Tras la digestión, se amplificó mediante RT-PCR con cebadores específicos una región del promotor de p2p73 de 1 kilobase. H) Análisis de la viabilidad celular mediante ensayo XTT de la línea linfoblastoide de Fanconi C HSC536 (círculos) y su control HSC536+FC (cuadrados) incubadas durante 3 días con dosis crecientes de mitomicina C en presencia (rayas discontinuas) o en ausencia (rayas continuas) de una dosis única de decitabina de 10 μ M.

4.2. “STAT1 ES UN MEDIADOR DE LA SENSIBILIDAD DE LAS LÍNEAS CELULARES LINFOBLASTOIDES DE AF-A A AGENTES ENTRECruzANTES DEL ADN”

4.2.1. STAT1 ESTÁ SOBREEXPRESADO EN LÍNEAS LINFOBLASTOIDES DEFICIENTES PARA FANCA

En un primer paso exploramos los niveles de STAT1 en varias líneas linfoblastoides derivadas de pacientes deficientes en el gen FANCA (AF-A) y de donantes sanos. Sorprendentemente, encontramos que la proteína se acumulaba más en las células deficientes en FANCA (**Figura 11A**). Este patrón fue también observado en muestras de proteína total extraída de médulas de pacientes con AF-A. En la **figura 11C** se puede observar que se detecta mayor expresión de dicha proteína en las muestras de los individuos con la enfermedad.

Con el objetivo de confirmar si esos altos niveles de STAT1 se debían a la ausencia de una proteína FANCA funcional, transdujimos un vector con el ADNc FANCA wild-type en dos líneas linfoblastoides derivadas de dos pacientes FA-A, y analizamos mediante western blot su influencia sobre los niveles de STAT1. Como se muestra en la **figura 11B**, los niveles de STAT1 se reducen en las células en las que la expresión de FANCA ha sido corregida.

Analizamos si la sobreproducción del factor STAT1 en células FA-A se asociaba a una elevación en la producción de su mensajero. Para ello, analizamos mediante RT-qPCR los niveles del mensajero de STAT1 en dos líneas linfoblastoides de Fanconi A, utilizando dos controles: 1) la misma línea revertida espontáneamente y 2) la misma línea transducida con el gen corrector. Estos análisis confirmaron una elevación de hasta dos veces del transcrito de STAT1 en las células Fanconi con respecto a las células en las que esta deficiencia estaba corregida de una u otra manera (**Figura 11D**). De forma paralela, también analizamos los niveles de ARNm de las dos isoformas de STAT1 (la alfa y la beta), y de otros miembros de la familia STAT. Como se muestra en la **figura 11E**, por un lado ambas isoformas se encuentran sobreexpresadas en las líneas linfoblastoides de Fanconi A respecto a sus controles.

Por otro lado, otros miembros de la familia de STAT1, como STAT3, STAT5a o STAT5b no estaban más elevados en las células deficientes en FANCA.

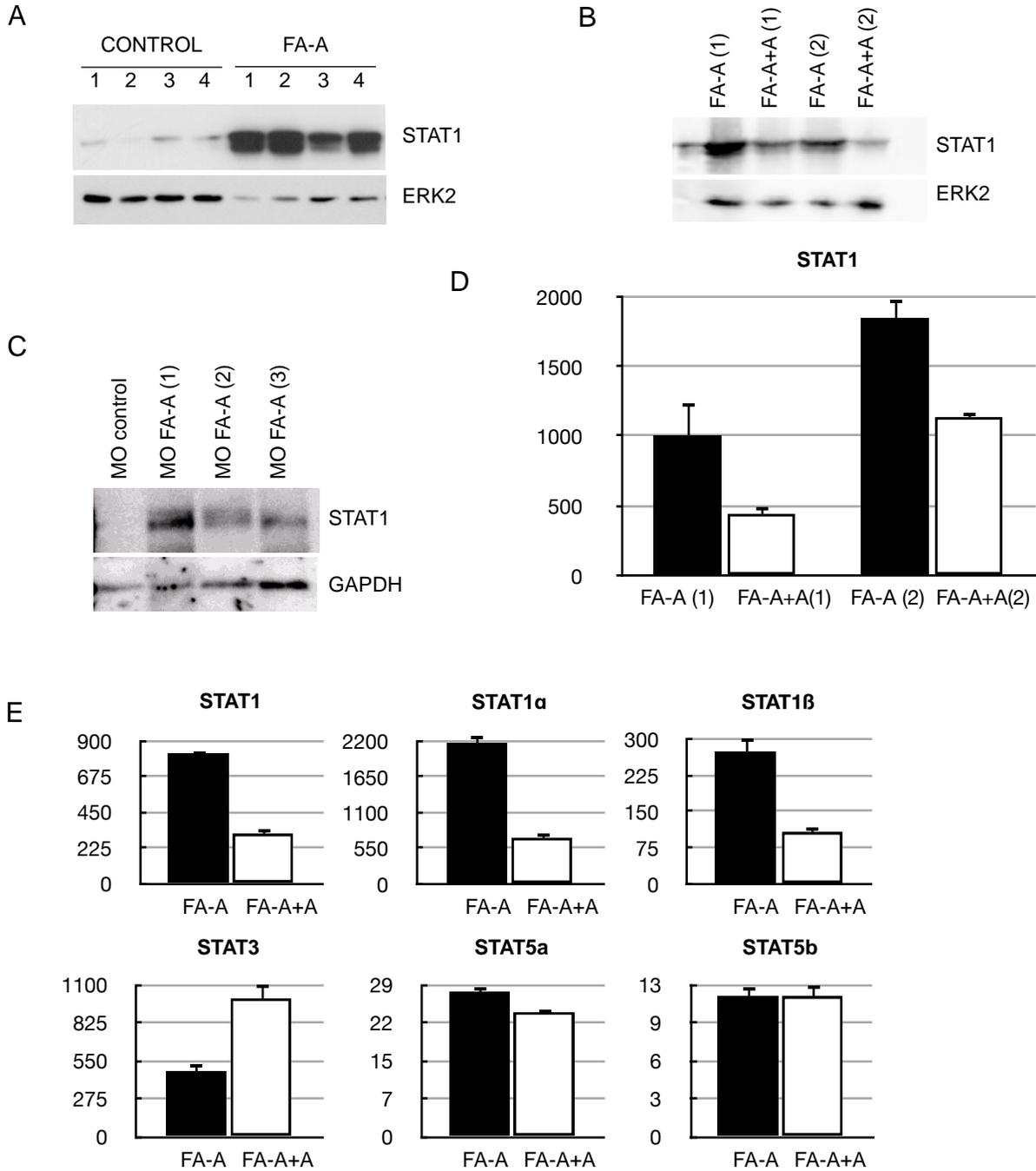


Figura 11. STAT1 está sobreexpresado en líneas linfoblastoides de Fanconi A. A) Análisis mediante western blot a partir de extractos de proteína total de los niveles basales de STAT1 en líneas linfoblastoides derivadas de pacientes Fanconi A (n=4) y de individuos sanos (n=4). ERK2 se usó como control de carga. B) Análisis mediante western blot de los niveles basales de STAT1 en líneas linfoblastoides de Fanconi A (1º y 3º carril) y sus homólogas corregidas (2º y 4º carril). ERK se usó como control de carga. C) Análisis mediante western blot de los niveles basales de STAT1 en extractos de proteína total de muestras primarias de médula ósea de pacientes Fanconi A (n=3) y de individuo sano (n=1). GAPDH se usó como control de carga. D) Análisis mediante RT-qPCR de los niveles basales de STAT1 en dos líneas linfoblastoides de Fanconi A (barras negras) y de sus homólogas corregidas (barras blancas). E) Análisis mediante RT-qPCR de los niveles basales de STAT1, sus isoformas STAT1 α y STAT1 β , STAT3, STAT5a y STAT5b.

4.2.2. LOS MAYORES NIVELES DE STAT1 EN LCL DE FA-A SON DEBIDOS A MECANISMOS TRANSCRIPCIONALES Y POSTRADUCCIONALES

Con la idea de profundizar en los mecanismos involucrados en el aumento de la expresión de STAT1 en células deficientes en FANCA comenzamos analizando si la estabilidad del transcrito estaba comprometida en ausencia/presencia del gen FANCA. Sin embargo, como se observa en la **figura 12A**, el patrón de degradación del ARNm de STAT1 es similar tanto en las células Fanconi A como en los controles. Puesto que la diferencia observada en los niveles transcripcionales de STAT1 parecía no estar en consonancia con las marcadas diferencias encontradas a nivel proteico, analizamos la vida media de esta proteína mediante el uso de la cicloheximida, compuesto que inhibe la síntesis de proteína. Como se observa en la **figura 12B**, la línea linfoblastoide control mantiene los niveles de proteína STAT1 a las 3 horas, pero estos bajan drásticamente entre ese tiempo y las 17 horas. Por el contrario, las células Fanconi A mantienen unos niveles elevados de proteína STAT1 hasta las 17 horas de tratamiento con cicloheximida. Estos resultados indican que las líneas linfoblastoides de Fanconi A presentan una mayor transcripción de STAT1 junto con una mayor vida media de su proteína, lo que explica la mayor acumulación del factor.

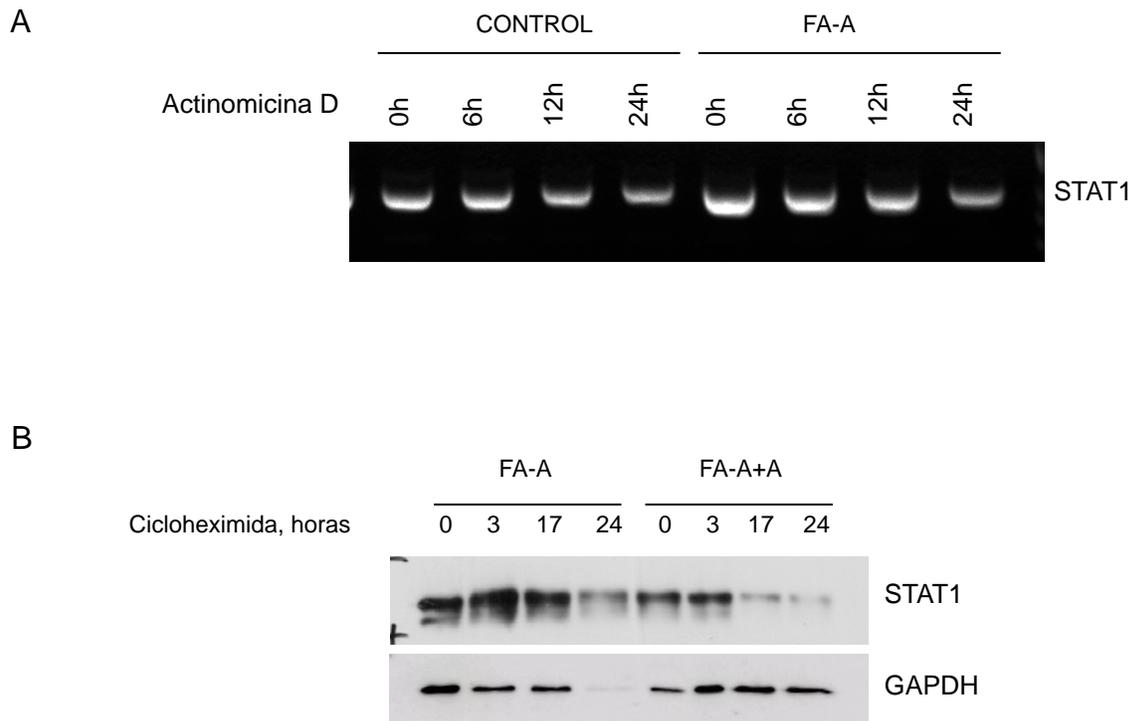


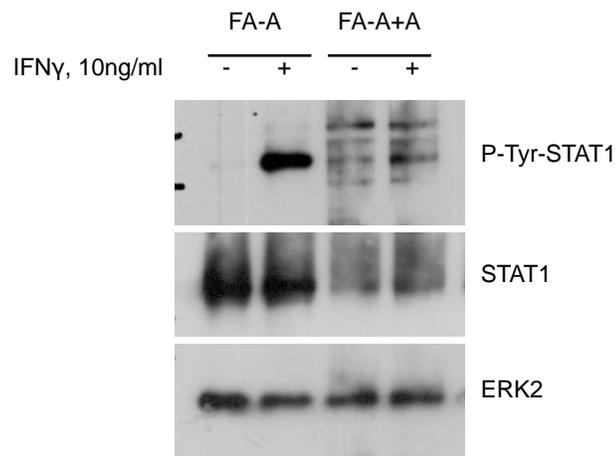
Figura 12. El ARN como la proteína de STAT1 presentan una mayor vida media. A) Análisis mediante RT-PCR de los niveles de STAT1 en extractos de una línea linfoblastoide de Fanconi A y de una control previamente tratadas durante diferentes tiempos (6, 12 y 24 horas) con el inhibidor de la transcripción actinomicina D a una concentración de (10 μ M). B) Western blot para analizar los niveles de STAT1 en extractos de proteína total de una línea linfoblastoide de Fanconi A (FA-A) y de su homóloga corregida (FA-A+A) incubadas durante diferentes tiempos (3, 17 y 24 horas) con una dosis de 30 μ M de cicloheximida, inhibidor de la síntesis proteica. GAPDH se ha usado como control de carga.

4.2.3. LAS CÉLULAS DEFICIENTES EN FANCA SON CAPACES DE FOSFORILAR STAT1 EN RESPUESTA A INTERFERON GAMMA

Para explorar el papel de FANCA en la respuesta a interferón gamma, sometimos a una línea linfoblastoide de Fanconi A y a su homóloga corregida a un tratamiento con interferón gamma, y analizamos los niveles de fosforilación del residuo de tirosina-701 de STAT1. En ausencia de tratamiento, no se detectó fosforilación en ninguna de las líneas celulares exploradas. Sin embargo, como se puede observar en las **figuras 13A**

y **13B**, la adición de interferón gamma provocó un marcado aumento de fosforilación con un máximo a la media hora de tratamiento y que declina hasta las dos horas, en que vuelve a los niveles basales. Las células deficientes en FANCA alcanzan niveles de STAT1 fosforilado mayores que su control, probablemente debido a sus mayores niveles de STAT1 total.

A



B

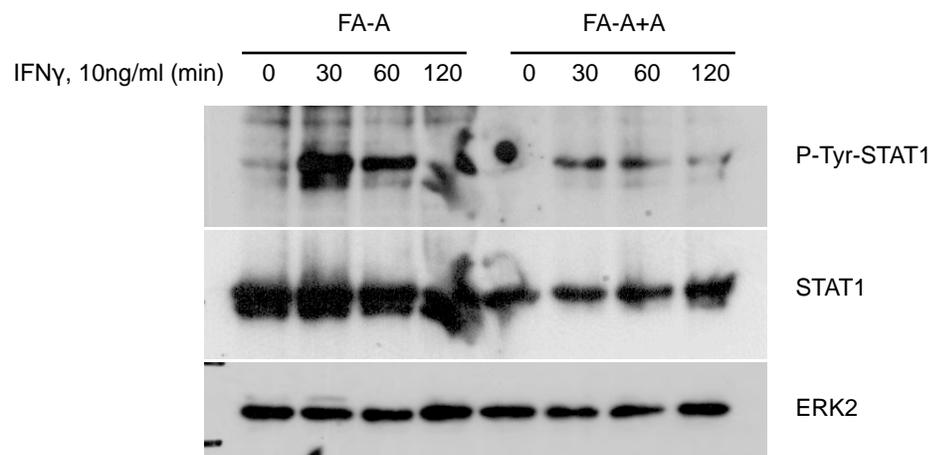


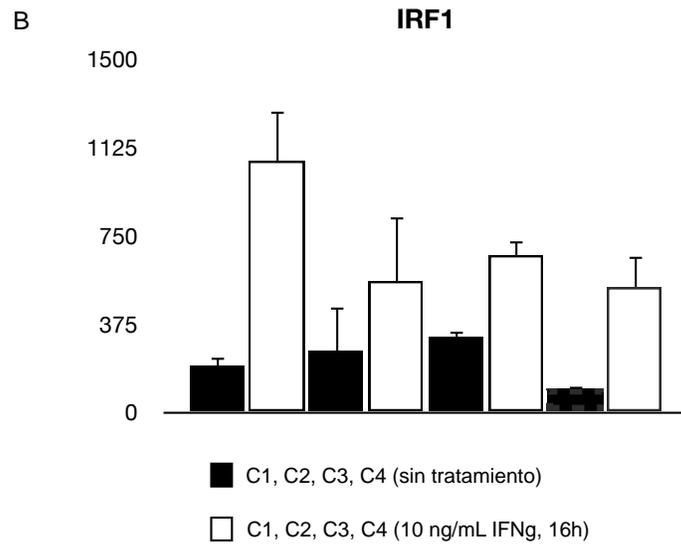
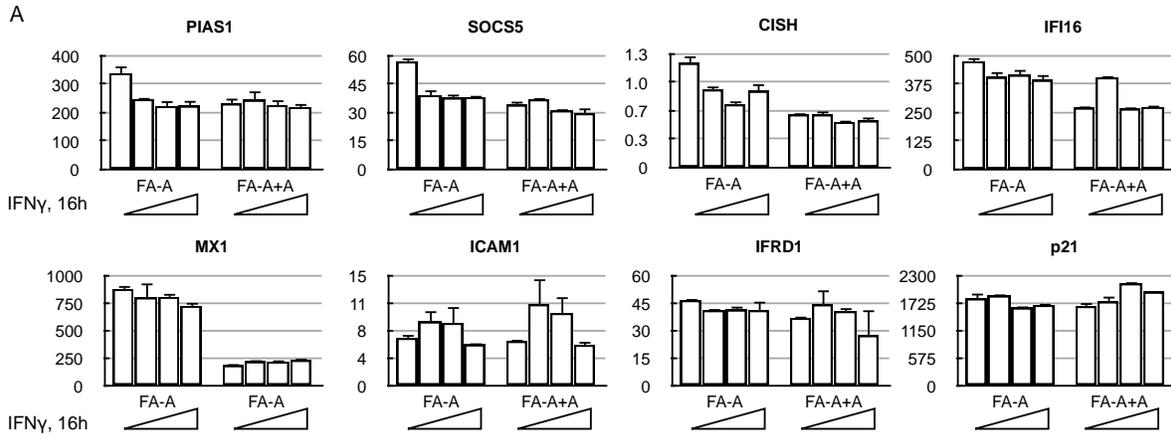
Figura 13. El interferón gamma induce mayores niveles de fosforilación de STAT1 en una línea linfoblastoide de Fanconi A. A) Análisis mediante western blot de los niveles de P-Tyr-STAT1 y de STAT1 en extractos de proteína total de una línea linfoblastoide de Fanconi A (FA-A) y de su línea control (FA-A+A) incubadas en ausencia (1º y 3º carril) o presencia de interferón gamma (10 ng/ml) (2º y 4º carril) durante 30 minutos. ERK2 se usó como control de carga. B) Western blot en el que se han analizado los niveles de P-Tyr-STAT1 y de STAT1 en proteína total de la misma línea linfoblastoide de Fanconi A (FA-A) y de su homóloga corregida (FA-A+A) previamente incubadas con 10 ng/ml de interferón gamma durante diferentes tiempos (30, 60 y 120 minutos). ERK2 se usó como control de carga.

4.2.4. LAS LÍNEAS CELULARES LINFOBLASTOIDES DE FA-A NO PRESENTAN COMPROMETIDA SU VIABILIDAD CELULAR EN RESPUESTA A INTERFERON GAMMA

Como hemos demostrado en el anterior apartado, en las LCLs de Fanconi A STAT1 se fosforila correctamente en respuesta a interfeón gamma, lo que indirectamente demuestra la presencia de receptores funcionales para esta citoquina en las líneas linfoblastoides de Fanconi A. En un siguiente paso, quisimos ver si en nuestro modelo celular se reflejaba la hipersensibilidad característica de células AF a interferón gamma y las posibles implicaciones de la sobreproducción de STAT1.

En primer lugar, analizamos mediante RT-qPCR los niveles de expresión de una serie de genes previamente descritos como dianas de STAT1 en respuesta a interferón gamma. Encontramos diferencias basales en el caso de dos de ellos, MX1 y CISH, que estaban sobreexpresados en las células Fanconi. Sin embargo, no se observó inducción de los niveles de expresión de ninguno de dichos genes tras el tratamiento con IFN gamma (**Figura 14A**). La no inducción de genes diana de STAT1 parece tener relación con el proceso de inmortalización de las células B con el virus Epstein Barr, ya que como se observa en la **figura 14B** el tratamiento de células mononucleares primarias controles con IFN gamma sí que eleva la expresión de IRF1, gen diana de STAT1. A pesar de estos resultados, quisimos comprobar si el interferon gamma afectaba a la viabilidad de las LCLs mediante un ensayo de XTT. Como se puede ver en la **figura 14C**, en ningún caso la viabilidad de las células tanto de las deficientes en

FANCA como en las corregidas se ve afectada por ninguna de las dosis de interferón gamma.



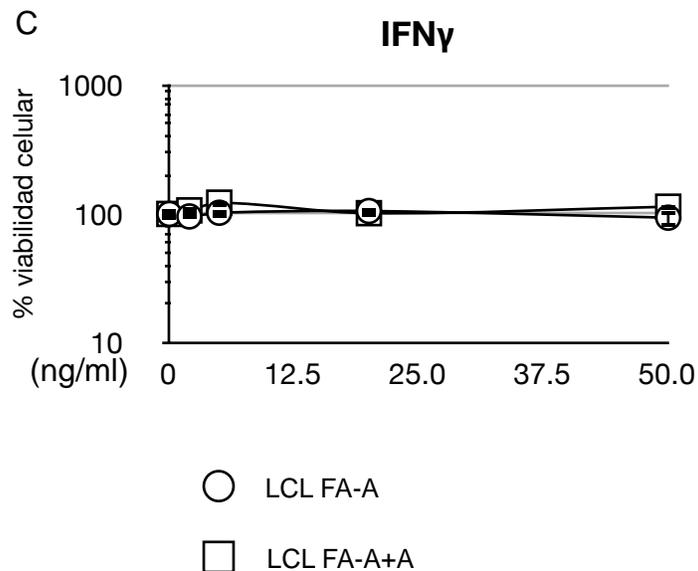


Figura 14. La vía de respuesta a IFN γ está afectada en líneas celulares linfoblásticas. A) Análisis mediante RT-qPCR de los niveles de genes diana de STAT1 (PIAS1, SOCS5, CISH, IFI16, MX1, ICAM1, IFRD1, p21) en extractos de una línea celular de linfoblastos de Fanconi A (FA-A) y de su homóloga corregida (FA-A+A) incubadas en ausencia o en presencia de varias dosis de interferón gamma (5, 20, 50 ng/ml) durante 16 horas. C) Análisis mediante RT-qPCR de IRF1 en extractos de varias muestras primarias de células mononucleares de sangre periférica de controles (C1, C2, C3, C4) en ausencia (barras negras) y en presencia de IFN gamma (barras blancas) a 10 ng/mL durante 16 horas. B) Ensayos de viabilidad exponiendo a una línea linfoblástica de Fanconi A (círculos) y a su control (cuadrados) a dosis crecientes de interferón gamma (2, 5, 20, 50 ng/ml) durante 3 días.

4.2.5. LA SOBREENPRESIÓN DE STAT1 JUEGA UN PAPEL EN LA SENSIBILIDAD A AGENTES ENTRECruzANTES DEL ADN EN LCLs DE AF-A

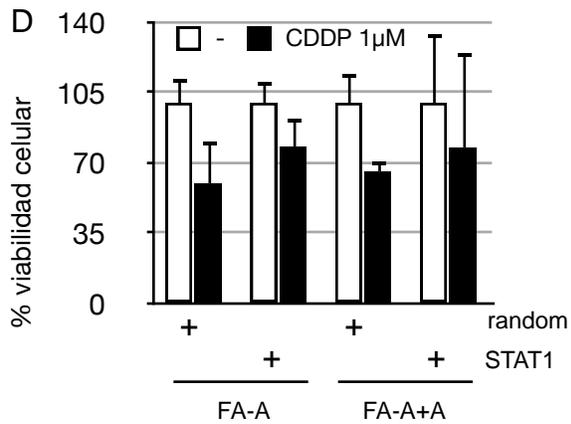
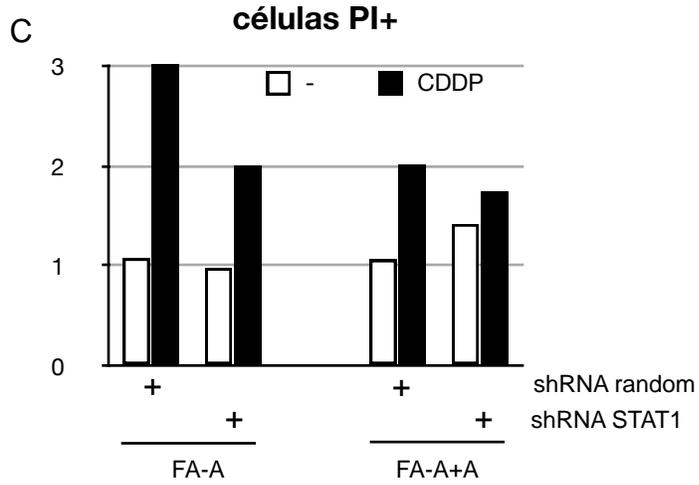
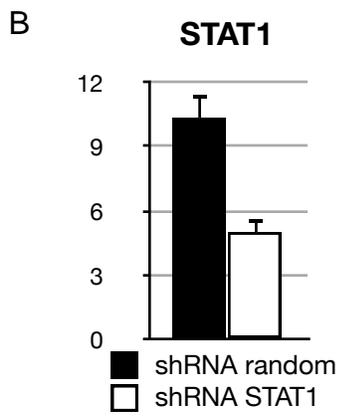
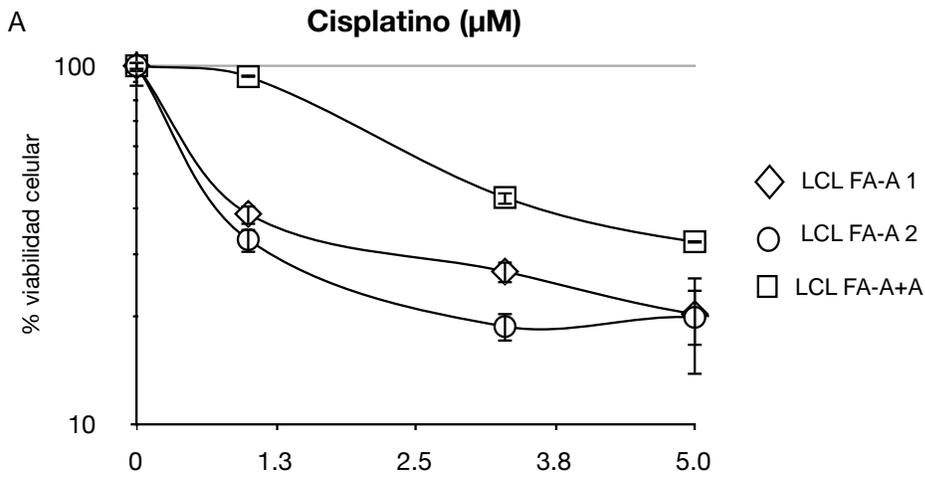
Otro papel que desempeña STAT1 en la biología celular es el relacionado con diferentes formas de muerte celular, entre la que se encuentra la inducida por cisplatino. En la **figura 15A** se muestra una curva típica de viabilidad celular de 2 líneas linfoblásticas de Fanconi A y de 1 control, en respuesta a diferentes dosis de

cisplatino. Basándonos en esta evidencia, quisimos comprobar si el hecho de tener elevados los niveles de STAT1 desempeña un papel en la mayor sensibilidad de células deficientes en FANCA al cisplatino. Para ello, interferimos la expresión de STAT1 mediante transfección con un shRNA específico en las LCLs de Fanconi A y en las homólogas corregidas. Como se ve en la **figura 15B**, esta construcción contra STAT1 era capaz de reducir hasta un 50% los niveles de ARNm del gen, no así la interferencia inespecífica, que no afectaba a los niveles de STAT1.

Estudiamos entonces si la interferencia de STAT1 afectaba a la sensibilidad de los LCL FA a cisplatino. En primer lugar se analizó la viabilidad celular mediante citometría de flujo. En la **figura 15C** se ve que hay un menor número de LCLs PI+ (células muertas) de Fanconi A transfectadas con la construcción contra STAT1 y tratadas con cisplatino que las mismas células con la interferencia inespecífica. En segundo lugar se seleccionaron y aislaron las células que habían integrado el vector de interferencia y se estudió su viabilidad mediante un ensayo de (XTT). En la **figura 15D** se puede ver que las LCLs de Fanconi A transfectadas con el shRNA contra STAT1 pierden en gran medida la sensibilidad a esta droga.

Para apoyar aún más la idea de que STAT1 desempeña un papel en la sensibilidad de las células deficientes en FANCA a agentes que producen enlaces covalentes entre las cadenas del ADN decidimos utilizar un inhibidor químico de STAT1. La epigallocatequina-3-galato (EGCG) es un compuesto derivado del té verde del que se ha descrito que, entre otras funciones, inhibe la activación de STAT1 protegiendo a las células de la apoptosis inducida por cisplatino. En primer lugar, analizamos el efecto de EGCG sobre STAT1. Pudimos comprobar que reducía los niveles del transcrito de STAT1 en las LCLs de Fanconi A hasta niveles cercanos a los observados en las LCLs corregidas (**Figura 15E**), siendo además este efecto específico para STAT1, ya que no se reproducía en otros miembros de la familia.

Una vez demostrado el efecto inhibidor de EGCG sobre STAT1, analizamos su efecto sobre la sensibilidad de las células FA a cisplatino. Como se muestra en la **figura 15F**, las células tratadas con EGCG se vuelven más resistentes al cisplatino, presumiblemente debido a la reducción de los niveles de STAT1. Además, este efecto es dosis dependiente de la EGCG.



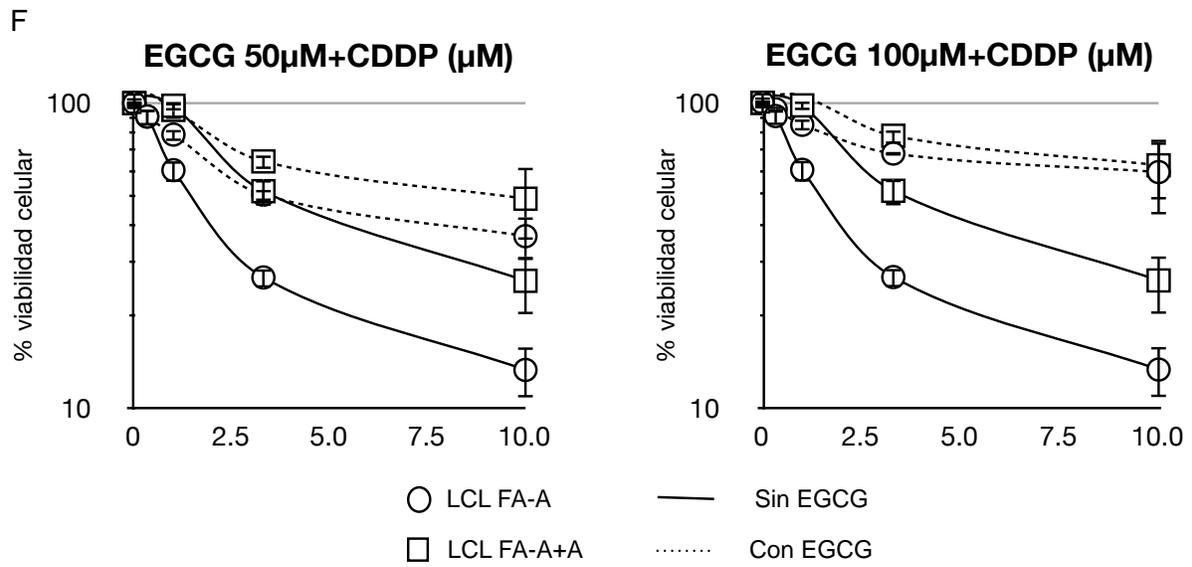
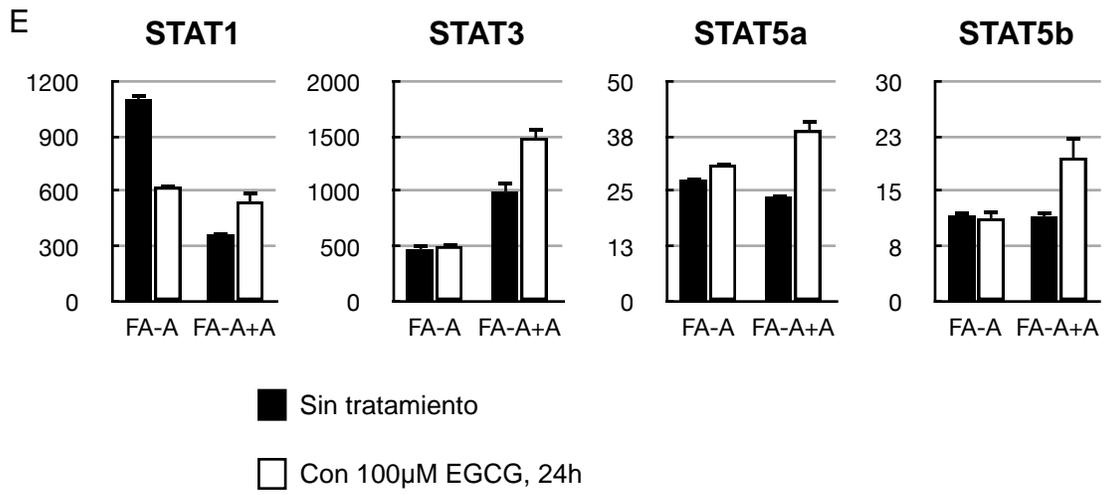


Figura 15. Los elevados niveles de STAT1 contribuyen a la mayor sensibilidad de las líneas linfoblastoides de Fanconi A a agentes entrecruzantes del ADN. A) Ensayo de viabilidad exponiendo a dos líneas linfoblastoides de Fanconi A (círculos y rombos) y a su control (cuadrados) a dosis crecientes de cisplatino durante 3 días. (1, 3.3, 5 μ M). Los datos se representan en porcentaje de viabilidad celular por cada triplicado de pocillos. B) Análisis mediante RT-qPCR de los niveles de STAT1 en una línea linfoblastoide de Fanconi A previamente trasducida con una construcción de shRNA sin diana (barra negra) o con un shRNA contra STAT1 (barra blanca). C) La línea linfoblastoide de Fanconi A y su homóloga corregida trasducidas con un shRNA sin diana o con un shRNA contra STAT1 se incubaron en presencia (barras blancas) o ausencia (barras negras) de 1 μ M de cisplatino durante 24 horas. Tras este tiempo, las células se tiñeron con yoduro de propidio y se cuantificó el número de células teñidas en el citómetro. La gráfica es representativa de 3 experimentos diferentes. D) Se transfectaron de manera transitoria una línea linfoblastoide de Fanconi A (círculos) y su homóloga corregida (cuadrados) con un vector de interferencia sin diana (barras blancas) o contra STAT1 (barras negras), se seleccionaron mediante sorter aquellas células que habían incorporado uno u otro vector (Cherry) y se incubaron durante 3 días con 1 μ M de cisplatino. En la gráfica se representa el porcentaje de viabilidad celular medida mediante ensayo XTT. E) Análisis mediante RT-PCR de los niveles de STAT1, STAT3, STAT5a y STAT5b en extractos de una línea linfoblastoide de Fanconi A y su homóloga corregida incubadas en presencia (barras blancas) o ausencia (barras negras) de 100 μ M de epigallocatequina-3-galato durante 24 horas. F) Ensayos de viabilidad de una línea linfoblastoide de Fanconi A (círculos) y de su control (cuadrados) tratadas con dosis crecientes de cisplatino (1, 3.3, 10 μ M) durante 3 días en presencia (línea discontinua) o en ausencia (línea continua) de 50 μ M (gráfica izquierda) o 100 μ M (gráfica derecha) de epigallocatequina-3-galato.

4.2.6. LA MAYOR ACTIVACIÓN DE ERK EN CÉLULAS DE AF-A ES RESPONSABLE DE LA ACUMULACIÓN DE STAT1 EN LAS LCLs DE AF-A

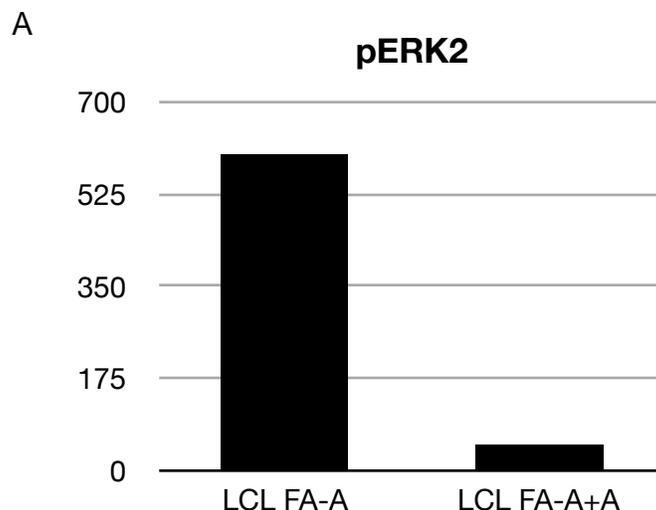
Observaciones previas obtenidas mediante un array de fosfo-proteínas en nuestro grupo (**Figura 16A**) indican que las células Fanconi presentan una activación aberrante de la ruta de MAP quinasas, en concreto, ERK presenta mayor fosforilación basal. Realizamos una serie de experimentos que, además de confirmar esa mayor activación basal de ERK en LCLs de Fanconi A, aportan que se da una mayor estimulación de la fosforilación de ERK por MMC en nuestro modelo celular (**Figura 16B**), lo que sugiere un papel de esta quinasa en la mayor sensibilidad a dicha droga.

Como nuestros datos apoyan el papel de STAT1 en la mayor sensibilidad de las líneas linfoblastoides de Fanconi A a agentes generadores de ICLs, nos preguntamos si esa mayor activación de ERK en las células Fanconi A podría estar relacionada con los

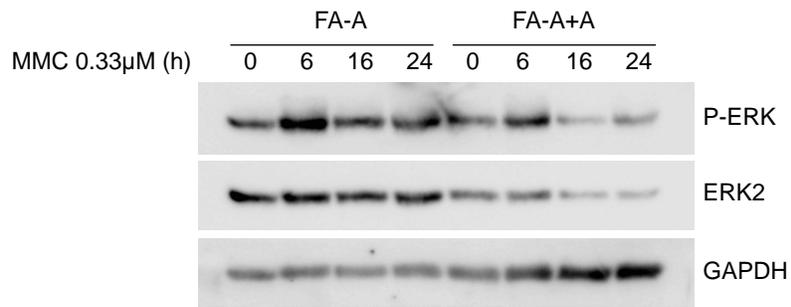
elevados niveles de STAT1 en nuestro modelo. Para ello, tratamos LCLs de Fanconi A con dosis crecientes de U0126, un inhibidor específico de la activación de ERK, y analizamos mediante western blot y RT-qPCR su efecto sobre los niveles de expresión de STAT1, observando que se daba una progresiva bajada tanto de la proteína como del mensajero de STAT1 (**Figuras 16C,16D**).

Por otro lado, en un ensayo de luciferasa en células HEK293FT transfectamos un vector portador de una secuencia del promotor de STAT1 junto con un mutante de Ras (RasV12-S35) constitutivamente activo, que provoca una fosforilación constitutiva de ERK, último efector en la cascada de señalización iniciada por Ras a través de Raf y MEK. Y como se observa en la **figura 16E**, esta construcción induce la actividad del promotor de STAT1. Estos resultados relacionan la mayor expresión de STAT1 en las líneas linfoblastoides de Fanconi A con los mayores niveles de activación de ERK en estas mismas células.

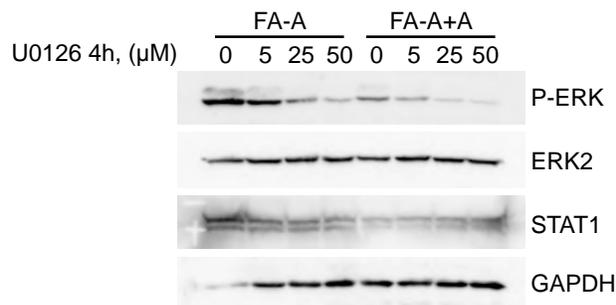
Puesto que nuestros resultados indican que STAT1 desempeña un papel clave en la viabilidad celular en respuesta a cisplatino, y ERK puede influenciar los niveles de STAT1, lo siguiente que nos planteamos fue explorar el efecto de la inhibición de la fosforilación de ERK mediada por el inhibidor U0126 sobre la viabilidad de las células Fanconi A tratadas con cisplatino. Como se muestra en la **figura 16F**, el tratamiento con el inhibidor de la activación de ERK aumenta el número de células viables deficientes en Fanconi A en presencia de cisplatino.



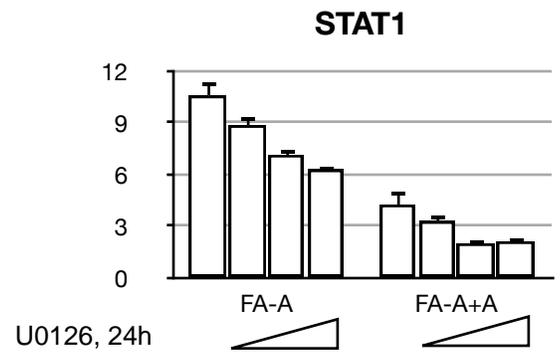
B



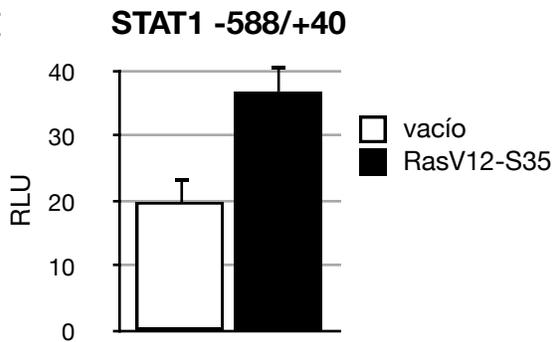
C



D



E



F

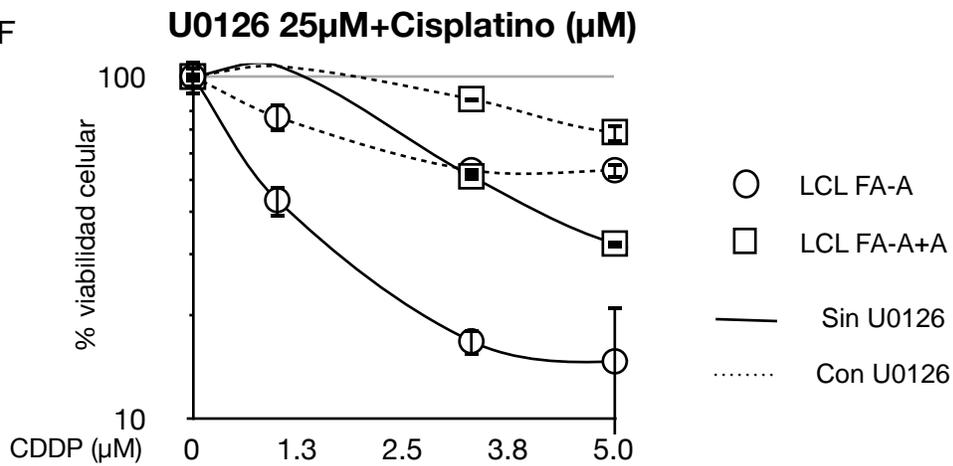


Figura 16. Relación entre la actividad de ERK y los mayores niveles de STAT1 en líneas linfoblastoides de Fanconi A. A) Expresión de pERK2 obtenida mediante array de fosfo-proteínas a partir del análisis de extractos de proteína total de una línea linfoblastoide de Fanconi A y su control. B) Western blot para el análisis de p-ERK y ERK2 en extractos de proteína total de una línea linfoblastoide de Fanconi A (FA-A) y su homóloga corregida (FA-A+A) tratadas con 0.33 μ M de mitomicina C durante diferentes tiempos (6, 12 y 24 horas). GAPDH se usó como control de carga. C) Análisis mediante western blot de los niveles de p-ERK, ERK2 y STAT1 en la proteína total extraída de una línea linfoblastoide de Fanconi A y su control previamente incubadas durante 4 horas con diferentes dosis del inhibidor de la actividad de ERK, el U0126 (5, 25 y 50 μ M). D) Análisis mediante RT-qPCR de los niveles de ARN de STAT1 en una línea linfoblastoide de Fanconi A y en su homóloga corregida tras ser ambas expuestas durante 24 horas a dosis crecientes de U0126 (5, 25 y 50 μ M). E) Ensayo de co-trasfección en células HEK293FT de un vector reportero luciferasa con una región del promotor de STAT1 (-588/+40) junto con un vector vacío (barra blanca) o con un vector de expresión de una forma constitutivamente activa de ERK (barra negra). Los resultados obtenidos se expresan en unidades relativas de luminiscencia (RLU). F) Ensayo de viabilidad en el que se han expuesto tanto una línea linfoblastoide de Fanconi A (círculos) como su control (cuadrados) durante 3 días a dosis crecientes de cisplatino (1, 3.3, 5 μ M) en presencia de una única dosis de U0126 (25 μ M) (líneas discontinuas) o en ausencia del inhibidor (líneas continuas). Los datos obtenidos se han representado en viabilidad celular relativa.

4.3. “ESTUDIO DESCRIPTIVO DEL FENOTIPO OCULAR ABERRANTE OBSERVADO EN LOS RATONES KO PARA Fancd2”

4.3.1. LOS RATONES HOMOZIGOTOS PARA Fancd2 PRESENTAN ALTERACIONES OCULARES DE ALTA VARIABILIDAD EN LA PENETRANCIA Y CON FRECUENTE ASIMETRÍA BILATERAL

En este estudio se utilizaron ratones knock-out (KO) para el gen FANCD2. Como se puede observar en la **figura 17**, nuestro estudio demuestra que existe cierta variabilidad en la presencia de alteraciones en el desarrollo del ojo. De hecho, no todos los ratones analizados presentaron alteraciones de la misma severidad en el desarrollo de ambos ojos, indicando que este fenotipo tiene una penetrancia variable. En la mayoría de los casos, observamos un claro fenotipo asimétrico.

Los fenotipos aberrantes fueron evidentes desde un estadio temprano del desarrollo (E12.5 y E13.5), perdurando en el tiempo hasta el momento del nacimiento (P0) y extendiéndose hasta etapas adultas del ratón (8 meses). Cabe destacar que se observan variaciones tanto en la presencia o ausencia de las alteraciones oculares como en la penetrancia de las mismas, encontrándose tanto ratones con microftalmia (tamaño reducido del globo ocular) como con anoftalmia (ausencia completa del ojo), pudiendo ocurrir en ambos casos de forma unilateral como bilateral.

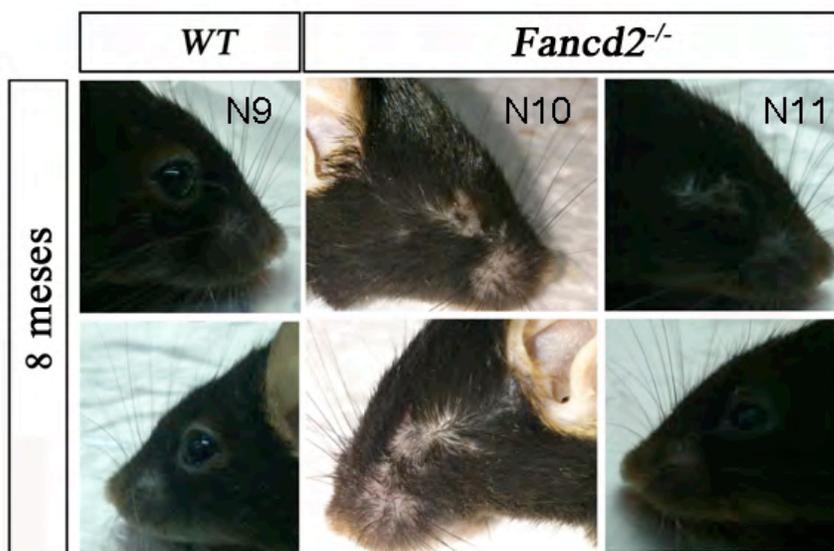
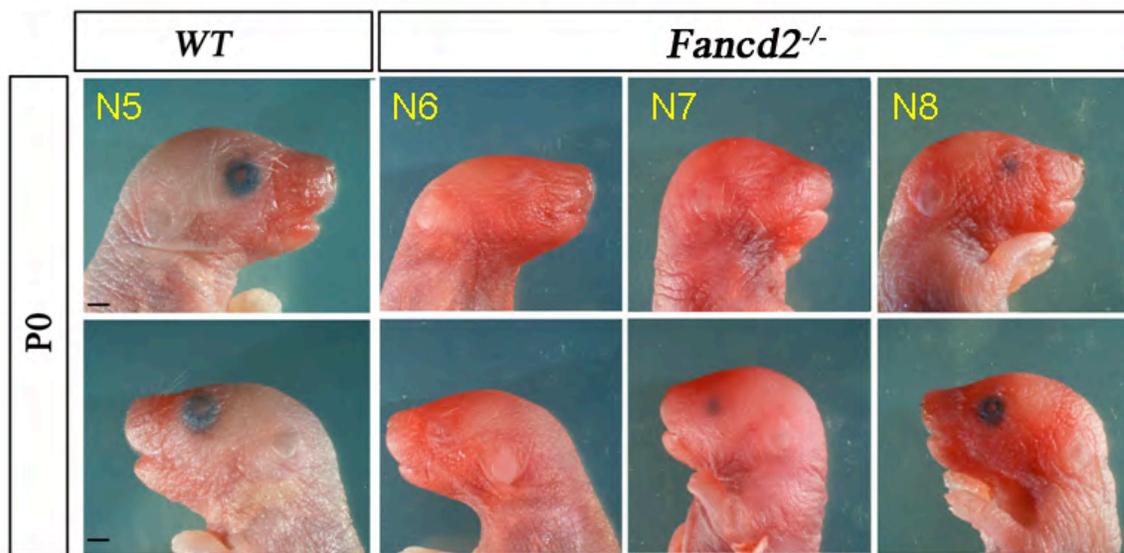
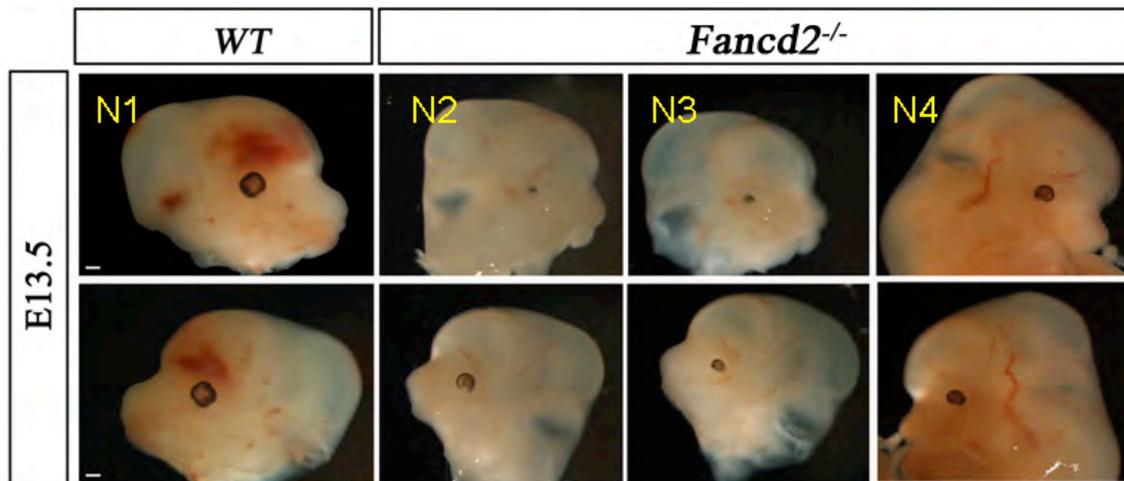


Figura 17. Penetrancia variable en el fenotipo ocular aberrante de los ratones mutantes para el gen *Fancd2*. A) Los embriones del N1 al N4 son de estadio 13.5 del desarrollo embrionario. El ejemplar N1 representa al ratón control. Los nombrados como N2 (anoftalmia unilateral), N3 (anoftalmia bilateral) y N4 (microftalmia) son homocigotos para *Fancd2*. B) Desde el N5 al N8 son recién nacidos (P0). El N5 es el ratón control. Los nombrados como N6 (anoftalmia bilateral), N7 (anoftalmia bilateral) y N8 (anoftalmia unilateral) son *Fancd2*^{-/-}. C) Los 3 son ratones adultos (8 meses). El N9 es el ratón control. Los ratones mutantes son el N10 (anoftalmia bilateral) y el N11 (anoftalmia unilateral). En todos los casos mostrados en esta figura, las fotos superiores de cada etapa del desarrollo corresponden al lado derecho, y las inferiores al lado izquierdo.

4.3.2. ALTERACIONES ESTRUCTURALES Y APOPTOSIS ANORMAL EN EL DESARROLLO OCULAR EN RATONES *FANCD2*^{-/-}

En un segundo paso nos centramos en explorar de forma somera las causas subyacentes al desarrollo aberrante del ojo en ratones deficientes en la proteína *Fancd2*. En comparación con la estructura del embrión de E12.5 control (**Figura 18**), el estudio de los cortes frontales teñidos con hematoxilina-eosina (H&E) (**Figura 19A-G**) reveló la presencia de graves alteraciones morfológicas en ratones *Fancd2*^{-/-}. Las más características y recurrentes están recogidas en la **tabla 10**.



Figura 18. Sección frontal del ojo derecho de un embrión control de E12.5. En esta tinción con H&E se pueden diferenciar la lente (1), la neuroretina (2), el epitelio pigmentado (3) y la fisura óptica (4).

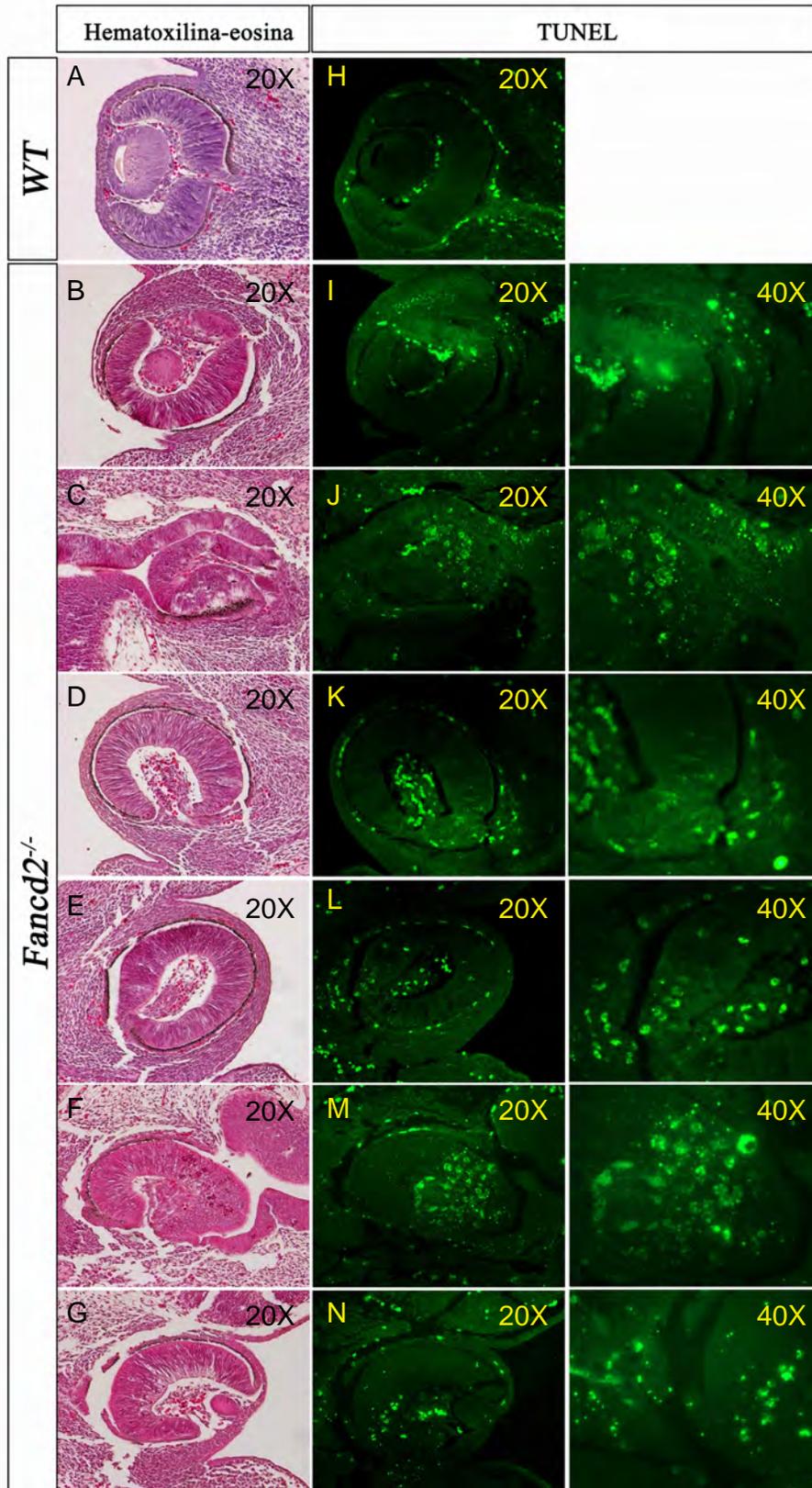


Figura 19. Histomorfología y TUNEL de los ojos de ratones KO para Fancd2^{-/-}. A-G) Imágenes tomadas a 20X de secciones frontales con tinción de H&E. A) Ojo izquierdo de embrión wildtype (N1) de E12.5. B-C) Ojo izquierdo y derecho del embrión N2 de E13.5. D-E) Ojo izquierdo y derecho del embrión N4 de E13.5. F-G) Ojo izquierdo y derecho de embrión Fancd2^{-/-} de E12.5. H-N) Imágenes tomadas a 20X y 40X de secciones frontales de ensayo TUNEL. H) Ojo izquierdo de embrión wildtype (N1) de E12.5. I-J) Ojo izquierdo y derecho del embrión N2 de E13.5 (20X y 40X). K-L) Ojo izquierdo y derecho del embrión N4 de E13.5 (20X y 40X). M-N) Ojo izquierdo y derecho de embrión Fancd2^{-/-} de E12.5 (20X y 40X)

EMBRIÓN	ESTADIO	LENTE	RETINA	FISURA ÓPTICA	Observaciones
Fig 19-B (izqda)	E13.5	SÍ	células en roseta	SÍ: orientación anómala	
Fig 19-C (dcha)	E13.5	NO	células en roseta	NO	Anoftalmia unilateral
Fig 19-D (izqda)	E13.5	NO	células en roseta	SÍ: orientación anómala y abertura excesiva (coloboma)	Invasión por células mesenquimáticas del espacio de la lente
Fig 19-E (dcha)	E13.5	NO	células en roseta	SÍ: orientación anómala y abertura excesiva (coloboma)	Invasión por células mesenquimáticas del espacio de la lente
Fig 19-F (izqda)	E12.5	NO	células en roseta	NO	Anoftalmia unilateral
Fig 19-G (dcha)	E12.5	SÍ	células en roseta	SÍ: orientación anómala	Lente pequeña

Tabla 10. Descripción morfológica de las alteraciones observadas en los cortes frontales teñidos con H&E de los diferentes embriones Fancd2^{-/-}.

Entre las anomalías descritas merece la pena mencionar los acúmulos de células en roseta en la zona de la retina, como se puede observar en la **figura 20**.

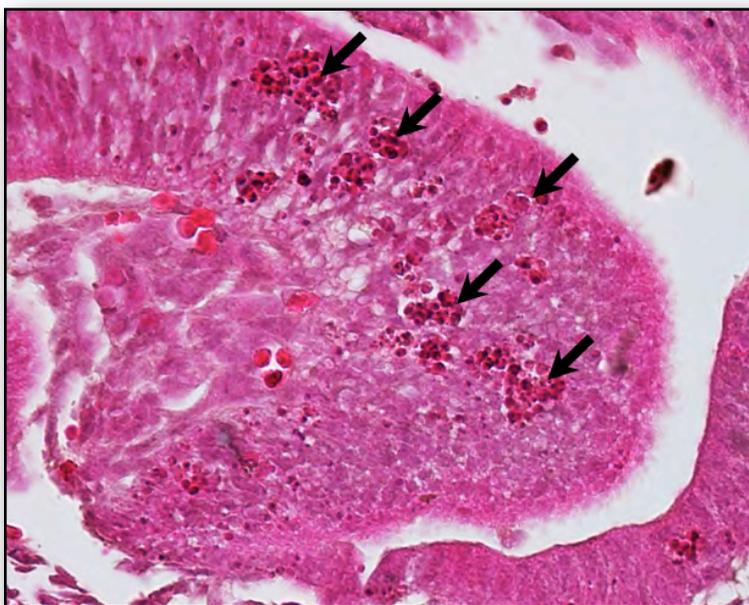


Figura 20. Detalle de sección frontal del ojo izquierdo (40X) del embrión N5. En esta tinción con H&E se señalan con flechas las células en roseta.

Por otro lado, teniendo en cuenta la predisposición a apoptosis producida por la ausencia de una ruta de FA/BRCA funcional, exploramos mediante TUNEL la posible existencia de zonas de muerte celular aberrante en los ojos de los embriones KO para *Fancd2*. Como se observa en la **figura 19H-N**, el análisis de las tinciones con TUNEL mostraron un mayor grado de apoptosis en las estructuras oculares de los ratones *Fancd2*^{-/-}. Principalmente, la apoptosis se localizó en la retina coincidiendo con la región de acumulación de células en roseta. En la **figura 21** se puede ver la tinción del TUNEL correspondiente a la figura 20.

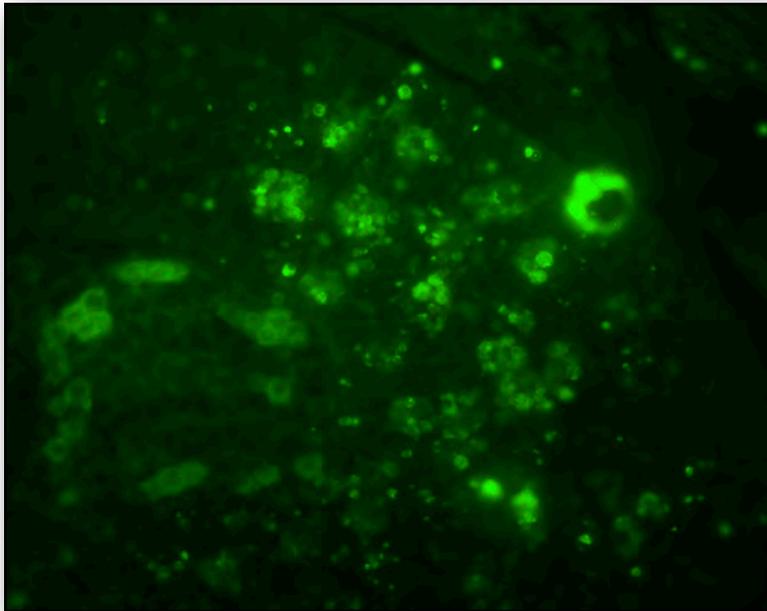


Figura 21. Ensayo de TUNEL sobre una sección frontal del ojo izquierdo (40X) del embrión N5 con tinción TUNE. En esta imagen se aprecian con claridad los restos de células apoptóticas.

5) DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

5.1. “IMPLICACIÓN DE BIK EN LA MAYOR SENSIBILIDAD EN LA MAYOR SENSIBILIDAD A AGENTES GENOTÓXICOS DE LAS LÍNEAS LINFOBLASTOIDES DE FANCONI C”

La muerte celular programada o apoptosis está considerada un aspecto clave de varios procesos biológicos, como el correcto desarrollo y funcionamiento del sistema inmune, el desarrollo embrionario o la homeostasis de diferentes tejidos. De hecho, la apoptosis aberrante (en exceso o defecto) es un factor causante de varias patologías en humanos, como las enfermedades autoinmunes, neurodegenerativas, etc. (103)

En el caso del sistema hematopoyético, debido a su alta tasa de renovación celular, la apoptosis desempeña un papel crítico. De hecho se sabe que la homeostasis de la médula ósea precisa de un delicado equilibrio entre la supervivencia y la muerte celular. (104). En este sentido, los factores de crecimiento hematopoyéticos, aparte de estimular la proliferación de las células madre del sistema hematológico y de los precursores comprometidos, también actúan como factores de supervivencia protegiendo a estas células de las señales de apoptosis.

La anemia de Fanconi se caracteriza, entre otros fenotipos celulares, por presentar patrones aberrantes de apoptosis a nivel basal (105), los cuales se han estudiado principalmente en el sistema hematopoyético (94,106), y a los que se han responsabilizado del fallo medular precoz que sufren los pacientes en sus primeros diez años de vida. Con el objetivo de esclarecer alguno de los mecanismos involucrados en este efecto, se analizó el perfil de expresión de una serie de genes implicados en procesos de muerte celular programada en líneas celulares linfoblastoides de AF-C. En esta primera aproximación, se observó que el gen pro-apoptótico BIK presentaba niveles mayores de transcripción en las células de Fanconi C. BIK es el primer miembro que se describió de la familia de proteínas pro-apoptóticas “sólo BH3” (BID, NOXA, PUMA, BIM, BAD) (107). La proteína para la que codifica este gen activa a otros miembros de la misma familia, llamados BAX y BAK. Las proteínas “sólo BH3” pueden dividirse en aquellas que activan directamente BAX y BAK, y aquellas que sensibilizan a las células mediante su liberación de los dímeros que forman con proteínas antiapoptóticas relacionadas con Bcl2 (108). BIK pertenece a

este último grupo. Por esto, la sobreexpresión de BIK parece estar relacionada con la sensibilidad de la línea linfoblastoide de AF-C frente a agentes entrecruzantes del ADN. En esta línea, observamos que los niveles de este gen se inducían en respuesta a tratamientos de las células linfoblastoides de AF-C con diferentes dosis de varios agentes entrecruzantes del ADN (cisplatino, mitomicina C) que típicamente reducen la viabilidad celular. Apoyando el papel de este gen en estos procesos, la interferencia específica de BIK en dichas líneas celulares mostró un efecto protector frente al tratamiento con cisplatino, como se deduce de la disminución de células muertas y el aumento de viabilidad tras el tratamiento con estas drogas. En conjunto, estos resultados apoyan la idea de que BIK podría estar implicado en la mayor sensibilidad de células de Fanconi C a dichos compuestos genotóxicos.

Se conoce que BIK es un iniciador de la apoptosis mitocondrial, y su expresión está inducida por señales proapoptóticas, incluyendo el daño en el ADN (109,110), el cual es muy marcado en las células Fanconi. Sin embargo, en nuestro modelo celular de Fanconi C no parece que la acumulación de daño en el ADN pueda explicar la mayor expresión de BIK, ya que la inhibición de rutas implicadas en la señalización del daño al ADN no tuvo ningún efecto sobre los niveles de ARNm basales del gen.

BIK también es un supresor de tumores en varios tejidos y uno de los mecanismos por los que se silencia su expresión en las células tumorales es mediante mecanismos epigenéticos, específicamente por metilación del ADN (111). De forma general, se considera que la metilación del ADN es un represor muy eficiente de la transcripción génica. De esta forma, un alto grado de metilación se asocia generalmente con un bajo nivel de expresión, y viceversa. La metilación en humanos únicamente ocurre en islas CpG, que son regiones del ADN ricas en citosinas precedidas por guaninas (sitios CpG). Tal es así, que estas regiones son capaces de modular la expresión de determinados genes variando su estado de metilación (112). Interesantemente, se sabe que la región promotora de BIK tiene una isla CpG cuyo grado de metilación influye directamente sobre sus niveles de expresión (113). Curiosamente, esta región aparece totalmente desmetilada tanto en líneas deficientes en FANCC como en líneas control. Sin embargo nosotros observamos que los niveles de expresión de este gen aumentan al tratar las células con un agente desmetilante, que provoca una desmetilación global

en el genoma de las células. Por ello, nos planteamos la existencia de un mecanismo dependiente de metilación, pero indirecto, que influyera sobre la regulación epigenética de BIK. De hecho, encontramos factores de transcripción relacionados con la regulación de la apoptosis que eran inducidos mediante el tratamiento con decitabina, como era el caso de p73 DeltaN. Esta isoforma de p73 carece del dominio de transactivación N-terminal y su transcripción está dirigida por un segundo promotor situado en una región del tercer exón del gen (114), el cual presenta una metilación reducida en nuestro modelo celular de Fanconi C si lo comparamos con las células control. Esta observación además está en consonancia con los mayores niveles de esta proteína encontrados en células deficientes en FANCC. Así, estudiamos una posible regulación transcripcional de BIK por parte de p73DN. Observamos que esta isoforma del gen p73 inducía consistentemente y de manera significativa la transcripción a través del promotor de BIK en ensayos de luciferasa, siendo la región situada entre -96 y -40 pares de bases previas al sitio de inicio de la transcripción del gen donde parece localizarse la secuencia diana. De hecho, en dicha parte del promotor del BIK hay varios elementos de unión para SP1, por lo que no podemos descartar algún tipo de cooperación entre $\Delta Np73$ y SP1 en la regulación de BIK (115,116).

A la vista de estas observaciones nuestros resultados sugieren que en ausencia de FANCC ocurre una metilación aberrante en el promotor de p73DN que provoca un incremento en sus niveles de expresión. Presumiblemente, este incremento de p73DN provocaría un aumento en la actividad transcripcional del promotor de BIK y consecuentemente una mayor expresión y síntesis proteica del gen. Posteriormente, estos niveles elevados de BIK podrían ser los responsables de una mayor sensibilidad a agentes genotóxicos, así como de una reducción en la viabilidad basal de estas células. Sin embargo, es importante mencionar que el modelo murino con inactivación de la variante de p73 estudiada en este trabajo presenta mayor sensibilidad al daño en el ADN que el ratón control (117), con lo que no podemos descartar que existan otros mecanismos además del sugerido por nuestros experimentos, implicados en la desregulación del gen BIK en ausencia de un gen FANCC funcional.

Por otro lado, estos datos sugieren una influencia de las proteínas FANC sobre los procesos de metilación del ADN. De hecho, se sabe que las ADN metiltransferasas (DNMT1, DNMT3A y DNMT3B) desempeñan una importante función en el mantenimiento de la estabilidad del genoma (118), generalmente a través del mantenimiento de la metilación en regiones exónicas e intergénicas del ADN. Además, existen cada vez mayores evidencias de un nexo directo entre la metilación y las rutas de reparación del daño en el ADN. De ahí que tenga gran interés estudiar una posible relación entre la función de las proteínas de la ruta FA/BRCA y las DNMTs.

Por otro lado, el hecho de que $\Delta Np73$ carezca de la región de la proteína TAp73 donde se localiza el dominio de transactivación sumado al hecho de que puede dimerizarse tanto con p73 y p53, hace que esta proteína actúe como dominante negativa de estas últimas y de hecho se han encontrado elevados niveles de esta isoforma en determinados tumores (119). Nuestras observaciones, en cambio, muestran que $\Delta Np73$ puede también mediar la acción de p53, ya que p53 activa su transcripción y, a su vez, $\Delta Np73$ activa genes efectores, como sería el caso de BIK. En este sentido, cabe destacar que en nuestros ensayos luciferasa no pudimos demostrar una activación directa del promotor de BIK ni por p53, ni por p73, lo que apoya el papel mediador de $\Delta Np73$ en este modelo. Su acción como dominante negativo, además, aportaría un control de esta cascada mediante retroalimentación negativa. Es decir, en nuestro modelo celular parece que $\Delta Np73$ podría estar regulando la expresión de BIK de manera p53-dependiente. Aunque este mecanismo debe ser caracterizado en mayor profundidad para conocer, entre otros aspectos, a través de qué elemento de unión en el promotor de BIK está actuando $\Delta Np73$. Nuestra observación, a pesar de ser novedosa, está en consonancia con observaciones previas en las que se describe la regulación transcripcional mediada por esta isoforma de p73 (120,121). Sería interesante comprobar si $\Delta Np73$ regula la expresión de más genes en las células FA.

5.2. “IMPLICACIÓN DE STAT1 EN LA MAYOR SENSIBILIDAD A AGENTES GENOTÓXICOS DE LAS LÍNEAS LINFOBLASTOIDES DE FANCONI”

Uno de los aspectos del fenotipo celular de la Anemia de Fanconi más establecidos es la mayor sensibilidad a citoquinas inflamatorias como el interferón (IFN) gamma. De hecho, se sabe que el interferon gamma coordina toda una serie de programas celulares modulando los niveles transcripcionales de genes esenciales para el correcto funcionamiento del sistema inmune, especialmente los relacionados con la respuesta de macrófagos a infecciones (122). Uno de los principales efectores del IFN gamma en la célula es STAT1 (*Signal Transducer and Activator of Transcription 1*), factor de transcripción que una vez fosforilado en el citoplasma, es transportado al núcleo donde se une a regiones promotoras en el ADN de sus genes diana (123). Interesantemente, en el caso de la anemia de Fanconi se ha observado una elevada producción de esta citoquina soluble (60), así como una exacerbada respuesta del organismo a ella. Esto es especialmente evidente en la médula ósea, donde se sabe que el IFN gamma tiene un papel clave en la aparición y desarrollo del fallo medular precoz que sufre el paciente AF en sus primeros 10 años de vida.

Hasta el momento, todos los estudios llevados a cabo en relación al IFN gamma y su rol en este síndrome congénito se han realizado casi exclusivamente en modelos celulares, modelos murinos y en pacientes del grupo de complementación C, es decir, aquellos que presentan mutaciones inactivantes del gen FANCC. Sin embargo, se sabe muy poco sobre la respuesta a este agente en otros grupos de complementación. En este sentido nuestros resultados aportan algo de luz sobre las consecuencias moleculares y funcionales que tiene la ausencia del gen FANCA en la respuesta a interferón gamma. De hecho, demostramos que la ausencia de una proteína FANCA funcional causa, bien de forma directa o indirecta, un aumento de los niveles transcripcionales y proteicos de STAT1. Cabe destacar que estos datos fueron confirmados en pacientes, aumentando su consistencia y relevancia. De hecho, esta

última observación está en sintonía con trabajos previos que describen una respuesta exacerbada al interferón gamma que contribuye al fallo medular en FA-C (64,67).

Además, nuestros resultados muestran que existe una mayor expresión transcripcional de STAT1 alfa respecto a la beta. STAT1alfa y STAT1beta son dos isoformas del gen STAT1 que se producen por “splicing” alternativo del RNA mensajero, siendo la alfa la forma activa y la beta la que actúa como dominante negativo (124). La relevancia funcional de la descompensación encontrada entre las dos isoformas de este gen es por el momento desconocida, de hecho no existen evidencias que relacionen una mayor producción de STAT1alfa con una señalización aberrante en la vía del interferon gamma. Sin embargo, sí está demostrado que STAT1 alfa está relacionado con mayores niveles de apoptosis en células B inducida por fludarabina (125). También encontramos que otros miembros de la familia de STAT1, como STAT5A y STAT5B no presentaban diferencias en su expresión respecto a células control, sugiriendo que el efecto derivado de la ausencia de FANCA es específico para STAT1. Sin embargo, resultan llamativos los bajos niveles de STAT3 observados en las células Fanconi, ya que existen trabajos previos en los que se relaciona a este gen con la regulación de la respuesta a daño en el ADN (126,127). Estos datos apuntan a la posibilidad de que STAT3 pueda tener un papel también relevante en la respuesta aberrante a agentes que dañan el ADN en las células Fanconi.

A pesar de que tanto los niveles transcripcionales de STAT1 como su síntesis proteica estaban marcadamente aumentados en células deficientes en FANCA, las diferencias encontradas a nivel proteico eran llamativamente más evidentes que las observadas a nivel de ARNm, lo que sugería la posibilidad de que los mecanismos de estabilidad de proteína pudieran estar involucrados en las diferencias observadas. De hecho, no se encontraron diferencias en la estabilidad de los transcritos de STAT1. Sin embargo, sí observamos que la vida media de la proteína STAT1 era significativamente mayor en las células FA-A que en las controles. Estos resultados invitan a pensar que la sobreexpresión y acumulación aberrante de STAT1 puede ser debida a un doble mecanismo: por un lado, un incremento de los niveles transcripcionales y por otro lado, una alteración de los mecanismos que afectan a la estabilidad de esta proteína. Por otro lado, las células Fanconi presentan una activación constitutiva de varias rutas de

MAP quinasas (72). De hecho, confirmamos la mayor activación de ERK en células de Fanconi A. Puesto que existen evidencias de que la vía de ERK desempeña un papel en la acumulación de STAT1 en líneas celulares de leucemia mieloide (134), decidimos explorar el posible papel de ERK en la regulación de STAT1 en nuestro modelo.

Apoyando la posibilidad de que ERK esté involucrado en la regulación de los niveles de expresión de STAT1, la inhibición de la activación de ERK mediante el uso de U0126, inhibidor específico de la fosforilación de ERK, redujo la expresión de STAT1, tanto a nivel proteico como a nivel transcripcional. Además, como sugieren los experimentos realizados con el promotor de STAT1 y la activación específica de ERK a través de un mutante de Ras, la actividad transcripcional del promotor de STAT1 puede ser dirigida por mecanismos dependientes de ERK.

Existen claras evidencias que describen alteraciones en la ruta de respuesta a IFN gamma en células Fanconi C (65,68,128). Sin embargo el estado de la vía de respuesta al interferon gamma en células de Fanconi deficientes en FANCA apenas ha sido explorado. En este mismo sentido, se sabe que STAT1 es un gen clave en la respuesta al interferon gamma, ya que una vez fosforilado es el encargado de transportar la señal al núcleo. Teniendo en cuenta la sobreexpresión de esta proteína detectada en nuestros estudios, parecía razonable pensar que células deficientes en FANCA pudieran también presentar una respuesta aberrante a IFN gamma. En primer lugar, observamos que STAT1 se fosforilaba tras el tratamiento con IFN gamma, tanto en la línea celular linfoblastoide de Fanconi A como en su homóloga corregida con el gen FANCA. Sin embargo, la cantidad de proteína fosforilada era marcadamente mayor en las LCLs FA-A. Estas observaciones sugieren que la maquinaria de la vía de respuesta IFN gamma está intacta, desde la unión del ligando a los receptores de membrana (IFNGR1 e IFNGR2) hasta las sucesivas fosforilaciones de JAK1 y JAK2. De esta manera, las diferencias en la cantidad de proteína fosforilada probablemente se deban al hecho de que en condiciones basales existen mayores niveles de proteína STAT1 total en LCLs-FA.

Para aclarar si esos niveles incrementados de STAT1 fosforilado tenían alguna relevancia funcional, analizamos la expresión de una serie de genes descritos como dianas de STAT1 en respuesta a interferon gamma, como son PIAS1, SOCS5, CISH,

IFI16, MX1, ICAM1, IFRD1 y p21. Encontramos que algunos de ellos estaban basalmente más elevados en las células Fanconi que en las controles, como ya se había descrito previamente para Mx1 (129). En contra de lo esperado, no se observó inducción en los niveles transcripcionales de ninguno de los 8 genes analizados en respuesta a interferón gamma, ni en las células deficientes en el gen FANCA ni en las corregidas con el gen sano. Del mismo modo, la viabilidad de las células en respuesta a IFNgamma no se vio comprometida. Una posible explicación a estos resultados podría ser que el propio proceso de immortalización con el virus Epstein Barr estuviera afectando, en algún punto de la vía, la respuesta a interferón gamma en estas células. De hecho, apoyando esta hipótesis, el tratamiento de células mononucleares de sangre periférica de personas sanas con esta citoquina sí que produce la inducción de genes diana de STAT1 como es el caso de IRF1. Además, ya se ha descrito como una proteína temprana del virus Epstein Barr impide tanto la inducción de genes diana de STAT1 como su fosforilación en respuesta a interferon gamma (130). De hecho, es posible que en estas circunstancias también esté comprometido el transporte al núcleo del homodímero de STAT1 fosforilado o su capacidad de unión a las secuencias consenso de sus genes diana. En este sentido, sería interesante analizar mediante técnicas de inmunodetección la localización nuclear de la forma fosforilada de STAT1 tanto en células B transformadas como en primarias. En base a las evidencias descritas y a las encontradas en este estudio, es posible que las líneas celulares linfoblastoides immortalizadas con el virus Epstein-Barr no sean un buen modelo para estudiar la ruta del interferon gamma.

Por otro lado, STAT1 no parece ser únicamente un mediador clave en la respuesta a interferón gamma. Trabajos previos sugieren que la sobreexpresión de STAT1 en determinados tumores induce una mayor sensibilidad a cisplatino (131) y en consecuencia puede ser un factor determinante para la hipersensibilidad a esta droga que típicamente presentan las células deficientes en Fanconi. En este sentido, observamos que la interferencia contra STAT1, en presencia de cisplatino, reducía de manera significativa el número de células apoptóticas. Apoyando esta idea, decidimos explorar el efecto de la epigallocatequina-3-galato (EGCG), catequina principal del té verde capaz de inhibir la actividad de STAT1 (132,133) sobre la viabilidad celular. Tras

exponer tanto a las células Fanconi como a sus respectivos controles a diferentes dosis de cisplatino junto con una dosis única de EGCG, comprobamos que ésta conseguía de manera significativa disminuir el efecto negativo del cisplatino sobre la viabilidad celular, siendo este cambio más marcado en las células deficientes en FANCA. Además, en consonancia con lo descrito en otros trabajos, este efecto sobre la viabilidad inducido por EGCG parece estar mediado a través de STAT1, puesto que el tratamiento con EGCG disminuye específicamente la expresión de STAT1 en las células Fanconi sin modificar los niveles transcripcionales de otros miembros de la familia de STAT1. A la vista de los resultados obtenidos en la viabilidad celular, resultaría de gran interés llevar a cabo una mayor caracterización del efecto que la EGCG pueda tener en células Fanconi, especialmente respecto a la hipersensibilidad mostrada a agentes quimioterápicos, con el objetivo de evaluar los posibles beneficios de incorporar esta sustancia a la práctica clínica.

En conjunto, estos datos muestran de una forma directa que existe una relación entre los mayores niveles de STAT1 observados en las células linfoblastoides de Fanconi A con su elevada sensibilidad al cisplatino.

5.3. “ALTERACIONES OCULARES EN EL MODELO MURINO KO PARA Fancd2”

La microftalmia (ojos pequeños) presenta una frecuencia en la población general española del 0.021% (21.34/10.000 nacimientos), incluyendo también dentro de este porcentaje los casos de anoftalmia (ausencia total de uno o de ambos ojos) (135). La microftalmia en humanos es frecuentemente bilateral, afectando a ambos ojos, pero habitualmente asimétrica en severidad, viéndose uno de los dos ojos más afectado que el otro. Puede presentarse como síntoma aislado o en combinación con otros defectos congénitos (136). Gracias al uso de diferentes modelos murinos se ha logrado identificar algunos de los genes cuya mutación está implicada en el desarrollo de la microftalmia y la anoftalmia, como CHX10, PAX6 o SOX2. (137-139).

En el caso de la anemia de Fanconi, se han descrito un variado rango de alteraciones oculares que están presentes en el 38% de los pacientes (140-144), siendo la microftalmia la de más frecuencia, ya que se da en un 26% de los individuos afectados. El estudio de esta anomalía se antoja complicado en humanos si tenemos en cuenta los aspectos éticos y la disponibilidad de muestras. Al igual que en muchas otras enfermedades humanas, existen modelos murinos que nos permiten explorar el efecto que la alteración de un solo gen tiene sobre la fisiología del ratón. De hecho existen actualmente algunos modelos que reproducen en mayor o menor medida diferentes fenotipos típicamente asociados a la Anemia de Fanconi. Principalmente, se han generado mutaciones inactivantes para varios de los genes de la ruta FA/BRCA, como los comentados en la introducción (100,145,146). En el caso concreto de la microftalmia, este fenotipo sólo se reproduce en los mutantes para los genes FANCA, FANCC, FANCD2 y FANCP, de hecho en este último se describen también alteraciones oculares adicionales, como la anoftalmia (ausencia de ojo) y la opacidad corneal (99, 147). Merece la pena mencionar que diferentes autores han demostrado que la presencia/ausencia del fenotipo microftálmico en estos modelos murinos no sólo es debida a la mutación del gen, sino que depende en gran medida de las características genéticas de la cepa en la que se ha generado la mutación. Este es el caso de los ratones con el gen FANCA inactivado. En las cepas 129S4 y FVB/N no se reproduce la microftalmia, sin embargo, la misma mutación provocada en la cepa C57BL/6 sí

provoca la aparición de este fenotipo hasta en un 30.3% de los ratones. (100,101). En este sentido hay que remarcar que los ratones no mutantes de dicha cepa presentan ya de por sí una cierta predisposición genética (2%) a desarrollar este fenotipo aberrante. Esto invita a pensar que deficiencias en la ruta FA/BRCA pueden aumentar significativamente la aparición de dicha anomalía. Sin embargo, el papel de las proteínas FANC, así como los mecanismos involucrados en la aparición y el desarrollo de la microftalmia están todavía lejos de ser conocidos.

En este estudio hemos realizado una aproximación de carácter descriptivo sobre la microftalmia en ratones knockout para FANCD2, en la cepa C57BL/6. Nuestros datos sugieren que este fenotipo ocular presenta una alta variabilidad en la penetrancia. Además, las alteraciones encontradas también son variables, ya que además de microftalmia hemos sido capaces de identificar embriones con anoftalmia tanto unilateral como bilateral, entre otras anomalías no clasificables.

A nivel morfológico e histológico se observan un amplio rango de anomalías estructurales que van desde la ausencia completa de la lente, una excesiva abertura de la fisura óptica (coloboma), que además suele presentar una orientación anómala y una marcada presencia de células en roseta, principalmente localizadas en la zona de la retina, que no se observó en ninguno de los ratones control analizados.

Durante el desarrollo del ojo, tiene lugar una apoptosis fisiológica en diferentes estadios y determinadas regiones del ojo en formación (148,149). Teniendo en cuenta esto y que la inactivación de la ruta de señalización FA/BRCA conduce a la acumulación de errores en las células, tanto inducidos por agentes exógenos como endógenos y consecuentemente a patrones aberrantes de apoptosis, nos planteamos la hipótesis de que el desarrollo aberrante del ojo en ratones deficientes en FANCD2 estuviera relacionado con una alteración de la apoptosis de las células presentes en este tejido. En este sentido, nuestros datos indican que hay una clara tendencia a que la apoptosis de determinados tipos celulares esté alterada. De hecho, las tinciones tipo TUNEL, que detectan ADN fragmentado, muestran cómo hay un mayor número de células apoptóticas en la retina de los embriones *Fancd2*^{-/-} a E12.5 y E13.5. Esto indica un patrón aberrante de muerte celular en esta zona del ojo, puesto que la apoptosis

fisiológica en la retina del ratón tiene lugar principalmente a E10.5, siendo residual a E12.5 y E13.5. (150,151).

Aún así, la apoptosis que observamos localizada en la retina es poco probable que explique todas las alteraciones encontradas (ausencia de lente, coloboma, etc.). Parece, más bien, que en nuestro análisis estamos viendo principalmente las consecuencias de alteraciones previas. A la vista de estos datos, sería interesante estudiar los patrones de apoptosis en estadios previos a los explorados en este trabajo, haciendo hincapié en identificar el estadio en el que se manifiestan estos cambios, así como las células y regiones oculares principalmente afectadas.

De forma general nuestros datos, aunque preliminares en su gran mayoría, sugieren que la ruta de FA/BRCA y en concreto su papel en la reparación de los errores en el ADN en replicación y en la apoptosis, podría estar directamente relacionada con la manifestación de alteraciones en el desarrollo del ojo que llevan a la aparición de diferentes alteraciones oculares como la microftalmia y la anoftalmia. Sin embargo, se necesitan más estudios para esclarecer los mecanismos moleculares que determinan la aparición de microftalmia en paciente con AF y la variabilidad de este fenómeno, tanto en la penetrancia del fenotipo como la asimetría del mismo.

DISCUSIÓN INTEGRADA

En líneas generales los datos presentados en este trabajo aportan una visión integradora de la anemia de Fanconi a partir del estudio realizado en diferentes subtipos de la enfermedad y en modelos murino y celular. En conjunto, hemos demostrado que las células B derivadas de pacientes con anemia de Fanconi presentan una serie de alteraciones moleculares que en último término provocan un aumento en la expresión de genes íntimamente relacionados con la muerte celular, ya se trate del grupo de complementación A o C. Curiosamente, los genes afectados no coinciden en ambos subtipos de AF, lo que apoyaría que tanto FANCA como FANCC son proteínas con funciones independientes de la ruta FA/BRCA, como ya se ha descrito anteriormente (152).

Además, hemos realizado una serie de observaciones preliminares en el modelo murino KO para Fancd2 que indican que la ausencia de una ruta FA/BRCA funcional induce una apoptosis secundaria aberrante en la retina de estos ratones en estadios tempranos del desarrollo embrionario. Esto apunta también a que la inactivación de genes Fanconi altera los patrones fisiológicos de apoptosis en el ojo en desarrollo. Aunque en su gran mayoría simplemente se tratan de observaciones puntuales, nuestros datos pueden servir de base para profundizar y entender el papel que pueden tener estos genes en la aparición de alteraciones oculares de pacientes deficientes en Fanconi.

Nuestras observaciones, además, desvelan varias rutas intracelulares de regulación de la expresión génica que en principio no parecen inducidas por el fallo de los mecanismos de reparación del ADN y que son moduladas por la falta de proteínas FANC funcionales. Estas rutas son diana de moléculas, en algunos casos conocidas, que pueden ser utilizadas para corregir aspectos del fenotipo FA de una manera más sencilla y general. Éste es el caso de la epigallocatequina-3-galato o de U0126, capaces de revertir la hipersensibilidad de células FA a agentes generadores de enlaces entre las cadenas del ADN. Son necesarios, sin embargo, estudios preclínicos detallados que permitan valorar la utilidad de estas drogas en el tratamiento del fallo medular o de la propensión a la malignización de los pacientes FA.

6) CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

6.1. La expresión de **BIK** en líneas celulares linfoblastoides deficientes en FANCC está marcadamente aumentada. Además su expresión se ve llamativamente inducida en respuesta a agentes genotóxicos como la mitomicina C y el cisplatino.

6.2. La inhibición de la expresión de BIK mediante shRNA aumenta la viabilidad celular de las líneas linfoblastoides deficientes en FANCC tratadas con cisplatino. Por el contrario, el aumento en la expresión de BIK inducido por el tratamiento con agentes desmetilantes sensibiliza a células control frente al cisplatino, equiparando su respuesta a este agente a la observada en células deficientes en FANCC.

6.3. La isla CpG presente en el promotor del gen DNp73 está marcadamente más desmetilada en células deficientes en FANCC que en sus controles. Este cambio provoca que sus niveles de expresión sean mayores en estas células. DNp73 es capaz de inducir la actividad transcripcional del promotor de BIK.

6.4. De forma general, nuestros datos sugieren que los mayores niveles basales de BIK pueden estar relacionados con la mayor sensibilidad que las células deficientes en FANCC presentan al cisplatino. Además la desregulación de este gen parece estar mediada por mecanismos dependientes de metilación, presumiblemente a través de cambios en la metilación de la región reguladora de DNp73.

6.5. La expresión de **STAT1** está llamativamente aumentada tanto en líneas celulares linfoblastoides como en muestras primarias de médula ósea procedentes de pacientes con deficiencias en el gen FANCA. Este aumento en la expresión se explica a través de un incremento en los niveles transcripcionales de este gen y un incremento en la estabilidad de la proteína.

6.6. En contra de lo esperado, el tratamiento con **interferón gamma** de líneas celulares linfoblastoides deficientes en FANCA no afecta a la viabilidad celular ni a la expresión de genes diana típicamente modulados por esta citoquina vía STAT1.

6.7. El proceso de inmortalización de líneas celulares linfoblastoides con el virus **Epstein Barr** puede influir en la correcta activación de esta vía. En este sentido las líneas linfoblastoides no parecen ser un modelo válido para el estudio de la ruta de respuesta a interferón gamma.

6.8. El bloqueo de la función de STAT1 aumenta la tasa de viabilidad celular en respuesta al cisplatino. En este mismo sentido, la **epigallocatequina-3-galato** (EGCG) muestra un efecto protector frente a la apoptosis inducida por cisplatino. Este efecto es mediado en parte por la reducción de los niveles de STAT1.

La reducción en la expresión de STAT1 mediada por la inhibición de la actividad de ERK disminuye la sensibilidad de las células deficientes en FANCA al tratamiento con cisplatino.

6.9. De forma general, nuestros datos sugieren que los mayores niveles basales de STAT1 parecen estar relacionados con la mayor sensibilidad que las células deficientes en FANCA presentan al cisplatino.

6.10. El modelo murino estudiado en este trabajo reproduce la microftalmia observada en pacientes con Anemia de Fanconi. El fenotipo encontrado presenta una alta variabilidad en la penetrancia y frecuente asimetría bilateral en su presentación.

6.11. El análisis de la apoptosis en los ojos afectados en estadios E12.5 y E13.5 revela la presencia de zonas de apoptosis aberrante en la retina con acumulación de células con morfología anómala (en roseta).

6.12. En general nuestros resultados demuestran que el modelo murino usado en este estudio, *Fancd2*^{-/-} C57BL/6, puede ser útil para el estudio de los mecanismos involucrados en la aparición y desarrollo de microftalmia asociados a la Anemia de Fanconi. Los datos obtenidos con este modelo invitan a pensar que la ausencia de *Fancd2* puede estar modificando la tasa y localización de la apoptosis durante el desarrollo ocular.

7) BIBLIOGRAFÍA

1. Lobitz S, Velleuer E. Guido Fanconi (1892-1979): a jack of all trades. *Nat. Rev. Cancer*. noviembre de 2006;6(11):893-8.
2. Meetei AR, Levitus M, Xue Y, Medhurst AL, Zwaan M, Ling C, et al. X-linked inheritance of Fanconi anemia complementation group B. *Nat. Genet.* noviembre de 2004;36(11):1219-24.
3. Schroeder TM. [Cytogenetic and cytologic findings in enzymopenic panmyelopathies and pancytopenias. Familial myelopathy of Fanconi, glutathione-reductase deficiency anemia and megaloblastic B12 deficiency anemia]. *Humangenetik.* 1966;2(3):287-316.
4. Schuler D, Kiss A, Fábíán F. Chromosomal peculiarities and «in vitro» examinations in Fanconi's anaemia. *Humangenetik.* 1969;7(4):314-22.
5. Auerbach AD, Adler B, Chaganti RS. Prenatal and postnatal diagnosis and carrier detection of Fanconi anemia by a cytogenetic method. *Pediatrics.* enero de 1981;67(1):128-35.
6. Kutler DI, Auerbach AD. Fanconi anemia in Ashkenazi Jews. *Fam. Cancer.* 2004;3(3-4):241-8.
7. Tipping AJ, Pearson T, Morgan NV, Gibson RA, Kuyt LP, Havenga C, et al. Molecular and genealogical evidence for a founder effect in Fanconi anemia families of the Afrikaner population of South Africa. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 8 de mayo de 2001;98(10):5734-9.
8. Callén E, Casado JA, Tischkowitz MD, Bueren JA, Creus A, Marcos R, et al. A common founder mutation in FANCA underlies the world's highest prevalence of Fanconi anemia in Gypsy families from Spain. *Blood.* 1 de marzo de 2005;105(5):1946-9.

9. Mankad A, Taniguchi T, Cox B, Akkari Y, Rathbun RK, Lucas L, et al. Natural gene therapy in monozygotic twins with Fanconi anemia. *Blood*. 15 de abril de 2006;107(8):3084-90.
10. Glanz A, Fraser FC. Spectrum of anomalies in Fanconi anaemia. *J Med Genet*. diciembre de 1982;19(6):412-6.
11. Giri N, Batista DL, Alter BP, Stratakis CA. Endocrine abnormalities in patients with Fanconi anemia. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* julio de 2007;92(7):2624-31.
12. Du W, Li X-E, Sipple J, Pang Q. Overexpression of IL-3R α on CD34+CD38- stem cells defines leukemia-initiating cells in Fanconi anemia AML. *Blood*. 21 de abril de 2011;117(16):4243-52.
13. Quentin S, Cucchini W, Ceccaldi R, Nibourel O, Pondarre C, Pagès M-P, et al. Myelodysplasia and leukemia of Fanconi anemia are associated with a specific pattern of genomic abnormalities that includes cryptic RUNX1/AML1 lesions. *Blood*. 14 de abril de 2011;117(15):e161-170.
14. Rosenberg PS, Greene MH, Alter BP. Cancer incidence in persons with Fanconi anemia. *Blood*. 1 de febrero de 2003;101(3):822-6.
15. Park JW, Pitot HC, Strati K, Spardy N, Duensing S, Grompe M, et al. Deficiencies in the Fanconi anemia DNA damage response pathway increase sensitivity to HPV-associated head and neck cancer. *Cancer Res*. 1 de diciembre de 2010;70(23):9959-68.
16. Scheckenbach K, Wagenmann M, Freund M, Schipper J, Hanenberg H. Squamous cell carcinomas of the head and neck in Fanconi anemia: risk, prevention, therapy, and the need for guidelines. *Klin Padiatr*. abril de 2012;224(3):132-8.

17. Shahidi NT, Diamond LK. Testosterone-induced remission in aplastic anemia of both acquired and congenital types. Further observations in 24 cases. *N. Engl. J. Med.* 11 de mayo de 1961;264:953-67.
18. Diamond LK, Shahidi NT. Treatment of aplastic anemia in children. *Semin. Hematol.* julio de 1967;4(3):278-88.
19. Scheckenbach K, Morgan M, Filger-Brillinger J, Sandmann M, Strimling B, Scheurlen W, et al. Treatment of the bone marrow failure in Fanconi anemia patients with danazol. *Blood Cells Mol. Dis.* 15 de febrero de 2012;48(2):128-31.
20. Guinan EC, Lopez KD, Huhn RD, Felser JM, Nathan DG. Evaluation of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor for treatment of pancytopenia in children with fanconi anemia. *J. Pediatr.* enero de 1994;124(1):144-50.
21. Rackoff WR, Orazi A, Robinson CA, Cooper RJ, Alter BP, Freedman MH, et al. Prolonged administration of granulocyte colony-stimulating factor (filgrastim) to patients with Fanconi anemia: a pilot study. *Blood.* 1 de septiembre de 1996;88(5):1588-93.
22. Masserot C, Peffault de Latour R, Rocha V, Leblanc T, Rigolet A, Pascal F, et al. Head and neck squamous cell carcinoma in 13 patients with Fanconi anemia after hematopoietic stem cell transplantation. *Cancer.* 15 de diciembre de 2008;113(12):3315-22.
23. Gregory JJ Jr, Wagner JE, Verlander PC, Levran O, Batish SD, Eide CR, et al. Somatic mosaicism in Fanconi anemia: evidence of genotypic reversion in lymphohematopoietic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 27 de febrero de 2001;98(5):2532-7.
24. Gross M, Hanenberg H, Lobitz S, Friedl R, Herterich S, Dietrich R, et al. Reverse mosaicism in Fanconi anemia: natural gene therapy via molecular self-correction. *Cytogenet. Genome Res.* 2002;98(2-3):126-35.

25. Galimi F, Noll M, Kanazawa Y, Lax T, Chen C, Grompe M, et al. Gene therapy of Fanconi anemia: preclinical efficacy using lentiviral vectors. *Blood*. 15 de octubre de 2002;100(8):2732-6.
26. Müller LUW, Milsom MD, Kim M-O, Schambach A, Schuesler T, Williams DA. Rapid lentiviral transduction preserves the engraftment potential of Fanca(-/-) hematopoietic stem cells. *Mol. Ther.* junio de 2008;16(6):1154-60.
27. Becker PS, Taylor JA, Trobridge GD, Zhao X, Beard BC, Chien S, et al. Preclinical correction of human Fanconi anemia complementation group A bone marrow cells using a safety-modified lentiviral vector. *Gene Ther.* octubre de 2010;17(10):1244-52.
28. Raya A, Rodríguez-Pizà I, Guenechea G, Vassena R, Navarro S, Barrero MJ, et al. Disease-corrected haematopoietic progenitors from Fanconi anaemia induced pluripotent stem cells. *Nature*. 2 de julio de 2009;460(7251):53-9.
29. Kutler DI, Singh B, Satagopan J, Batish SD, Berwick M, Giampietro PF, et al. A 20-year perspective on the International Fanconi Anemia Registry (IFAR). *Blood*. 15 de febrero de 2003;101(4):1249-56.
30. Howlett NG, Taniguchi T, Olson S, Cox B, Waisfisz Q, De Die-Smulders C, et al. Biallelic inactivation of BRCA2 in Fanconi anemia. *Science*. 26 de julio de 2002;297(5581):606-9.
31. Ciccia A, Ling C, Coulthard R, Yan Z, Xue Y, Meetei AR, et al. Identification of FAAP24, a Fanconi anemia core complex protein that interacts with FANCM. *Mol. Cell*. 9 de febrero de 2007;25(3):331-43.
32. Ling C, Ishiai M, Ali AM, Medhurst AL, Neveling K, Kalb R, et al. FAAP100 is essential for activation of the Fanconi anemia-associated DNA damage response pathway. *EMBO J.* 18 de abril de 2007;26(8):2104-14.

33. Tremblay CS, Huang FF, Habi O, Huard CC, Godin C, Lévesque G, et al. HES1 is a novel interactor of the Fanconi anemia core complex. *Blood*. 1 de septiembre de 2008;112(5):2062-70.
34. Singh TR, Saro D, Ali AM, Zheng X-F, Du C, Killen MW, et al. MHF1-MHF2, a histone-fold-containing protein complex, participates in the Fanconi anemia pathway via FANCM. *Mol. Cell*. 26 de marzo de 2010;37(6):879-86.
35. Ali AM, Pradhan A, Singh TR, Du C, Li J, Wahengbam K, et al. FAAP20: a novel ubiquitin-binding FA nuclear core-complex protein required for functional integrity of the FA-BRCA DNA repair pathway. *Blood*. 5 de abril de 2012;119(14):3285-94.
36. Deans AJ, West SC. DNA interstrand crosslink repair and cancer. *Nat. Rev. Cancer*. julio de 2011;11(7):467-80.
37. Kee Y, D'Andrea AD. Expanded roles of the Fanconi anemia pathway in preserving genomic stability. *Genes Dev*. 15 de agosto de 2010;24(16):1680-94.
38. Gordon SM, Buchwald M. Fanconi anemia protein complex: mapping protein interactions in the yeast 2- and 3-hybrid systems. *Blood*. 1 de julio de 2003;102(1):136-41.
39. Meetei AR, De Winter JP, Medhurst AL, Wallisch M, Waisfisz Q, Van de Vrugt HJ, et al. A novel ubiquitin ligase is deficient in Fanconi anemia. *Nat. Genet*. octubre de 2003;35(2):165-70.
40. Machida YJ, Machida Y, Chen Y, Gurtan AM, Kupfer GM, D'Andrea AD, et al. UBE2T is the E2 in the Fanconi anemia pathway and undergoes negative autoregulation. *Mol. Cell*. agosto de 2006;23(4):589-96.
41. Matsushita N, Kitao H, Ishiai M, Nagashima N, Hirano S, Okawa K, et al. A FancD2-monoubiquitin fusion reveals hidden functions of Fanconi anemia core complex in DNA repair. *Mol. Cell*. 16 de septiembre de 2005;19(6):841-7.

42. Nijman SMB, Huang TT, Dirac AMG, Brummelkamp TR, Kerkhoven RM, D'Andrea AD, et al. The deubiquitinating enzyme USP1 regulates the Fanconi anemia pathway. *Mol. Cell.* 4 de febrero de 2005;17(3):331-9.
43. Rego MA, Harney JA, Mauro M, Shen M, Howlett NG. Regulation of the activation of the Fanconi anemia pathway by the p21 cyclin-dependent kinase inhibitor. *Oncogene.* 19 de enero de 2012;31(3):366-75.
44. Williams SA, Longerich S, Sung P, Vaziri C, Kupfer GM. The E3 ubiquitin ligase RAD18 regulates ubiquitylation and chromatin loading of FANCD2 and FANCI. *Blood.* 12 de mayo de 2011;117(19):5078-87.
45. Hussain S, Wilson JB, Medhurst AL, Hejna J, Witt E, Ananth S, et al. Direct interaction of FANCD2 with BRCA2 in DNA damage response pathways. *Hum. Mol. Genet.* 15 de junio de 2004;13(12):1241-8.
46. Nakanishi K, Taniguchi T, Ranganathan V, New HV, Moreau LA, Stotsky M, et al. Interaction of FANCD2 and NBS1 in the DNA damage response. *Nat. Cell Biol.* diciembre de 2002;4(12):913-20.
47. Howlett NG, Taniguchi T, Durkin SG, D'Andrea AD, Glover TW. The Fanconi anemia pathway is required for the DNA replication stress response and for the regulation of common fragile site stability. *Hum. Mol. Genet.* 1 de marzo de 2005;14(5):693-701.
48. Surrallés J, Jackson SP, Jasin M, Kastan MB, West SC, Joenje H. Molecular cross-talk among chromosome fragility syndromes. *Genes Dev.* 15 de junio de 2004;18(12):1359-70.
49. Niedernhofer LJ, Odijk H, Budzowska M, Van Drunen E, Maas A, Theil AF, et al. The structure-specific endonuclease Ercc1-Xpf is required to resolve DNA interstrand cross-link-induced double-strand breaks. *Mol. Cell. Biol.* julio de 2004;24(13):5776-87.

50. Kalb R, Neveling K, Nanda I, Schindler D, Hoehn H. Fanconi anemia: causes and consequences of genetic instability. *Genome Dyn.* 2006;1:218-42.
51. Joksic I, Vujic D, Guc-Scekic M, Leskovac A, Petrovic S, Ojani M, et al. Dysfunctional telomeres in primary cells from Fanconi anemia FANCD2 patients. *Genome Integr.* 14 de septiembre de 2012;3(1):6.
52. Ferrer M, Izeboud T, Ferreira CG, Span SW, Giaccone G, Kruyt FAE. Cisplatin triggers apoptotic or nonapoptotic cell death in Fanconi anemia lymphoblasts in a concentration-dependent manner. *Exp. Cell Res.* 10 de junio de 2003;286(2):381-95.
53. Clarke AA, Gibson FM, Scott J, Myatt N, Rutherford TR. Fanconi's anemia cell lines show distinct mechanisms of cell death in response to mitomycin C or agonistic anti-Fas antibodies. *Haematologica.* enero de 2004;89(1):11-20.
54. Pipaon C, Casado JA, Bueren JA, Fernandez-Luna JL. Jun N-terminal kinase activity and early growth-response factor-1 gene expression are down-regulated in Fanconi anemia group A lymphoblasts. *Blood.* 1 de enero de 2004;103(1):128-32.
55. Chirnomas D, Taniguchi T, De la Vega M, Vaidya AP, Vasserman M, Hartman A-R, et al. Chemosensitization to cisplatin by inhibitors of the Fanconi anemia/BRCA pathway. *Mol. Cancer Ther.* abril de 2006;5(4):952-61.
56. Jacquemont C, Simon JA, D'Andrea AD, Taniguchi T. Non-specific chemical inhibition of the Fanconi anemia pathway sensitizes cancer cells to cisplatin. *Mol. Cancer.* 2012;11:26.
57. Burkitt K, Ljungman M. Phenylbutyrate interferes with the Fanconi anemia and BRCA pathway and sensitizes head and neck cancer cells to cisplatin. *Mol. Cancer.* 2008;7:24.

58. Rosselli F, Sanceau J, Wietzerbin J, Moustacchi E. Abnormal lymphokine production: a novel feature of the genetic disease Fanconi anemia. I. Involvement of interleukin-6. *Hum. Genet.* abril de 1992;89(1):42-8.
59. Schultz JC, Shahidi NT. Tumor necrosis factor-alpha overproduction in Fanconi's anemia. *Am. J. Hematol.* febrero de 1993;42(2):196-201.
60. Dufour C, Corcione A, Svahn J, Haupt R, Poggi V, Béka'ssy AN, et al. TNF-alpha and IFN-gamma are overexpressed in the bone marrow of Fanconi anemia patients and TNF-alpha suppresses erythropoiesis in vitro. *Blood.* 15 de septiembre de 2003;102(6):2053-9.
61. Bagnara GP, Bonsi L, Strippoli P, Ramenghi U, Timeus F, Bonifazi F, et al. Production of interleukin 6, leukemia inhibitory factor and granulocyte-macrophage colony stimulating factor by peripheral blood mononuclear cells in Fanconi's anemia. *Stem Cells.* julio de 1993;11 Suppl 2:137-43.
62. Ibáñez A, Río P, Casado JA, Bueren JA, Fernández-Luna JL, Pipaón C. Elevated levels of IL-1beta in Fanconi anaemia group A patients due to a constitutively active phosphoinositide 3-kinase-Akt pathway are capable of promoting tumour cell proliferation. *Biochem. J.* 15 de agosto de 2009;422(1):161-70.
63. Nisticò A, Young NS. gamma-Interferon gene expression in the bone marrow of patients with aplastic anemia. *Ann. Intern. Med.* 15 de marzo de 1994;120(6):463-9.
64. Rathbun RK, Faulkner GR, Ostroski MH, Christianson TA, Hughes G, Jones G, et al. Inactivation of the Fanconi anemia group C gene augments interferon-gamma-induced apoptotic responses in hematopoietic cells. *Blood.* 1 de agosto de 1997;90(3):974-85.
65. Pang Q, Fagerlie S, Christianson TA, Keeble W, Faulkner G, Diaz J, et al. The Fanconi anemia protein FANCC binds to and facilitates the activation of STAT1 by

- gamma interferon and hematopoietic growth factors. *Mol. Cell. Biol.* julio de 2000;20(13):4724-35.
66. Pang Q, Keeble W, Diaz J, Christianson TA, Fagerlie S, Rathbun K, et al. Role of double-stranded RNA-dependent protein kinase in mediating hypersensitivity of Fanconi anemia complementation group C cells to interferon gamma, tumor necrosis factor-alpha, and double-stranded RNA. *Blood.* 15 de marzo de 2001;97(6):1644-52.
 67. Whitney MA, Royle G, Low MJ, Kelly MA, Axthelm MK, Reifsteck C, et al. Germ cell defects and hematopoietic hypersensitivity to gamma-interferon in mice with a targeted disruption of the Fanconi anemia C gene. *Blood.* 1 de julio de 1996;88(1):49-58.
 68. Rathbun RK, Christianson TA, Faulkner GR, Jones G, Keeble W, O'Dwyer M, et al. Interferon-gamma-induced apoptotic responses of Fanconi anemia group C hematopoietic progenitor cells involve caspase 8-dependent activation of caspase 3 family members. *Blood.* 15 de diciembre de 2000;96(13):4204-11.
 69. Rutherford TR, Myatt NE, Gibson FM, Clarke AA. The Fanconi anemia cell line HSC536N is not sensitive to interferon-gamma and does not cleave PARP in response to FAS-mediated cell killing. *Blood.* 1 de abril de 2002;99(7):2627-2628; author reply 2629-2630.
 70. Kurre P, Anandakumar P, Grompe M, Kiem HP. In vivo administration of interferon gamma does not cause marrow aplasia in mice with a targeted disruption of FANCC. *Exp. Hematol.* noviembre de 2002;30(11):1257-62.
 71. Li X, Yang Y, Yuan J, Hong P, Freie B, Orazi A, et al. Continuous in vivo infusion of interferon-gamma (IFN-gamma) preferentially reduces myeloid progenitor numbers and enhances engraftment of syngeneic wild-type cells in Fancc^{-/-} mice. *Blood.* 15 de agosto de 2004;104(4):1204-9.

72. Briot D, Macé-Aimé G, Subra F, Rosselli F. Aberrant activation of stress-response pathways leads to TNF-alpha oversecretion in Fanconi anemia. *Blood*. 15 de febrero de 2008;111(4):1913-23.
73. Du W, Rani R, Sipple J, Schick J, Myers KC, Mehta P, et al. The FA pathway counteracts oxidative stress through selective protection of antioxidant defense gene promoters. *Blood*. 3 de mayo de 2012;119(18):4142-51.
74. Joenje H, Arwert F, Eriksson AW, De Koning H, Oostra AB. Oxygen-dependence of chromosomal aberrations in Fanconi's anaemia. *Nature*. 12 de marzo de 1981;290(5802):142-3.
75. Schindler D, Hoehn H. Fanconi anemia mutation causes cellular susceptibility to ambient oxygen. *Am. J. Hum. Genet.* octubre de 1988;43(4):429-35.
76. Pagano G, Degan P, D' Ischia M, Kelly FJ, Nobili B, Pallardó FV, et al. Oxidative stress as a multiple effector in Fanconi anaemia clinical phenotype. *Eur. J. Haematol.* agosto de 2005;75(2):93-100.
77. Uziel O, Reshef H, Ravid A, Fabian I, Halperin D, Ram R, et al. Oxidative stress causes telomere damage in Fanconi anaemia cells - a possible predisposition for malignant transformation. *Br. J. Haematol.* julio de 2008;142(1):82-93.
78. Mukhopadhyay SS, Leung KS, Hicks MJ, Hastings PJ, Youssoufian H, Plon SE. Defective mitochondrial peroxiredoxin-3 results in sensitivity to oxidative stress in Fanconi anemia. *J. Cell Biol.* 23 de octubre de 2006;175(2):225-35.
79. Rousset S, Nocentini S, Rouillard D, Baroche C, Moustacchi E. Mitochondrial alterations in fanconi anemia fibroblasts following ultraviolet A or psoralen photoactivation. *Photochem. Photobiol.* febrero de 2002;75(2):159-66.
80. Suhasini AN, Sommers JA, Mason AC, Voloshin ON, Camerini-Otero RD, Wold MS, et al. FANCI helicase uniquely senses oxidative base damage in either strand of duplex DNA and is stimulated by replication protein A to unwind the

- damaged DNA substrate in a strand-specific manner. *J. Biol. Chem.* 3 de julio de 2009;284(27):18458-70.
81. Futaki M, Igarashi T, Watanabe S, Kajigaya S, Tatsuguchi A, Wang J, et al. The FANCG Fanconi anemia protein interacts with CYP2E1: possible role in protection against oxidative DNA damage. *Carcinogenesis.* enero de 2002;23(1):67-72.
 82. Kruyt FA, Hoshino T, Liu JM, Joseph P, Jaiswal AK, Youssoufian H. Abnormal microsomal detoxification implicated in Fanconi anemia group C by interaction of the FAC protein with NADPH cytochrome P450 reductase. *Blood.* 1 de noviembre de 1998;92(9):3050-6.
 83. Li J, Du W, Maynard S, Andreassen PR, Pang Q. Oxidative stress-specific interaction between FANCD2 and FOXO3a. *Blood.* 25 de febrero de 2010;115(8):1545-8.
 84. Zhang Q-S, Eaton L, Snyder ER, Houghtaling S, Mitchell JB, Finegold M, et al. Tempol protects against oxidative damage and delays epithelial tumor onset in Fanconi anemia mice. *Cancer Res.* 1 de marzo de 2008;68(5):1601-8.
 85. Zhang Q-S, Marquez-Loza L, Eaton L, Duncan AW, Goldman DC, Anur P, et al. *Fancd2*^{-/-} mice have hematopoietic defects that can be partially corrected by resveratrol. *Blood.* 9 de diciembre de 2010;116(24):5140-8.
 86. Li J, Sipple J, Maynard S, Mehta PA, Rose SR, Davies SM, et al. Fanconi anemia links reactive oxygen species to insulin resistance and obesity. *Antioxid. Redox Signal.* 15 de octubre de 2012;17(8):1083-98.
 87. Lyakhovich A, Surrallés J. Constitutive activation of caspase-3 and Poly ADP ribose polymerase cleavage in fanconi anemia cells. *Mol. Cancer Res.* enero de 2010;8(1):46-56.
 88. Ponte F, Sousa R, Fernandes AP, Gonçalves C, Barbot J, Carvalho F, et al. Improvement of genetic stability in lymphocytes from Fanconi anemia patients

- through the combined effect of α -lipoic acid and N-acetylcysteine. *Orphanet J Rare Dis.* 2012;7:28.
89. Geiselhart A, Lier A, Walter D, Milsom MD. Disrupted Signaling through the Fanconi Anemia Pathway Leads to Dysfunctional Hematopoietic Stem Cell Biology: Underlying Mechanisms and Potential Therapeutic Strategies. *Anemia.* 2012;2012:265790.
 90. Tulpule A, Lensch MW, Miller JD, Austin K, D'Andrea A, Schlaeger TM, et al. Knockdown of Fanconi anemia genes in human embryonic stem cells reveals early developmental defects in the hematopoietic lineage. *Blood.* 29 de abril de 2010;115(17):3453-62.
 91. Auerbach AD, Liu Q, Ghosh R, Pollack MS, Douglas GW, Broxmeyer HE. Prenatal identification of potential donors for umbilical cord blood transplantation for Fanconi anemia. *Transfusion.* octubre de 1990;30(8):682-7.
 92. Dao K-HT, Rotelli MD, Petersen CL, Kaech S, Nelson WD, Yates JE, et al. FANCL ubiquitinates β -catenin and enhances its nuclear function. *Blood.* 12 de julio de 2012;120(2):323-34.
 93. Milsom MD, Lee AW, Zheng Y, Cancelas JA. *Fanca*^{-/-} hematopoietic stem cells demonstrate a mobilization defect which can be overcome by administration of the Rac inhibitor NSC23766. *Haematologica.* julio de 2009;94(7):1011-5.
 94. Ceccaldi R, Parmar K, Mouly E, Delord M, Kim JM, Regairaz M, et al. Bone marrow failure in Fanconi anemia is triggered by an exacerbated p53/p21 DNA damage response that impairs hematopoietic stem and progenitor cells. *Cell Stem Cell.* 6 de julio de 2012;11(1):36-49.
 95. Soulier J. Fanconi anemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2011;2011:492-7.

96. Shimamura A, Montes de Oca R, Svenson JL, Haining N, Moreau LA, Nathan DG, et al. A novel diagnostic screen for defects in the Fanconi anemia pathway. *Blood*. 15 de diciembre de 2002;100(13):4649-54.
97. Faivre L, Guardiola P, Lewis C, Dokal I, Ebell W, Zatterale A, et al. Association of complementation group and mutation type with clinical outcome in fanconi anemia. European Fanconi Anemia Research Group. *Blood*. 15 de diciembre de 2000;96(13):4064-70.
98. Antonio Casado J, Callén E, Jacome A, Río P, Castella M, Lobitz S, et al. A comprehensive strategy for the subtyping of patients with Fanconi anaemia: conclusions from the Spanish Fanconi Anemia Research Network. *J. Med. Genet.* abril de 2007;44(4):241-9.
99. Tischkowitz M, Winqvist R. Using mouse models to investigate the biological and physiological consequences of defects in the Fanconi anaemia/breast cancer DNA repair signalling pathway. *J. Pathol.* julio de 2011;224(3):301-5.
100. Wong JCY, Alon N, Mckerlie C, Huang JR, Meyn MS, Buchwald M. Targeted disruption of exons 1 to 6 of the Fanconi Anemia group A gene leads to growth retardation, strain-specific microphthalmia, meiotic defects and primordial germ cell hypoplasia. *Hum. Mol. Genet.* 15 de agosto de 2003;12(16):2063-76.
101. Cheng NC, Van de Vrugt HJ, Van der Valk MA, Oostra AB, Krimpenfort P, De Vries Y, et al. Mice with a targeted disruption of the Fanconi anemia homolog *Fanca*. *Hum. Mol. Genet.* 22 de julio de 2000;9(12):1805-11.
102. Futaki M, Yamashita T, Yagasaki H, Toda T, Yabe M, Kato S, et al. The IVS4 + 4 A to T mutation of the fanconi anemia gene *FANCC* is not associated with a severe phenotype in Japanese patients. *Blood*. 15 de febrero de 2000;95(4):1493-8.
103. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol.* junio de 2007;35(4):495-516.

104. Chung E, Kondo M. Role of Ras/Raf/MEK/ERK signaling in physiological hematopoiesis and leukemia development. *Immunol. Res.* abril de 2011;49(1-3): 248-68.
105. Ridet A, Guillouf C, Duchaud E, Cundari E, Fiore M, Moustacchi E, et al. Deregulated apoptosis is a hallmark of the Fanconi anemia syndrome. *Cancer Res.* 1 de mayo de 1997;57(9):1722-30.
106. Vinciguerra P, Godinho SA, Parmar K, Pellman D, D'Andrea AD. Cytokinesis failure occurs in Fanconi anemia pathway-deficient murine and human bone marrow hematopoietic cells. *J. Clin. Invest.* noviembre de 2010;120(11):3834-42.
107. Chinnadurai G, Vijayalingam S, Rashmi R. BIK, the founding member of the BH3-only family proteins: mechanisms of cell death and role in cancer and pathogenic processes. *Oncogene.* diciembre de 2008;27 Suppl 1:S20-29.
108. Letai A, Bassik MC, Walensky LD, Sorcinelli MD, Weiler S, Korsmeyer SJ. Distinct BH3 domains either sensitize or activate mitochondrial apoptosis, serving as prototype cancer therapeutics. *Cancer Cell.* septiembre de 2002;2(3):183-92.
109. Pizarro JG, Folch J, Vazquez De la Torre A, Verdaguer E, Junyent F, Jordán J, et al. Oxidative stress-induced DNA damage and cell cycle regulation in B65 dopaminergic cell line. *Free Radic. Res.* octubre de 2009;43(10):985-94.
110. Shaul Y, Ben-Yehoyada M. Role of c-Abl in the DNA damage stress response. *Cell Res.* enero de 2005;15(1):33-5.
111. Pompeia C, Hodge DR, Plass C, Wu Y-Z, Marquez VE, Kelley JA, et al. Microarray analysis of epigenetic silencing of gene expression in the KAS-6/1 multiple myeloma cell line. *Cancer Res.* 15 de mayo de 2004;64(10):3465-73.
112. Gal-Yam EN, Saito Y, Egger G, Jones PA. Cancer epigenetics: modifications, screening, and therapy. *Annu. Rev. Med.* 2008;59:267-80.

113. Hatzimichael E, Dasoula A, Kounnis V, Benetatos L, Lo Nigro C, Lattanzio L, et al. Bcl2-interacting killer CpG methylation in multiple myeloma: a potential predictor of relapsed/refractory disease with therapeutic implications. *Leuk. Lymphoma*. septiembre de 2012;53(9):1709-13.
114. Grob TJ, Novak U, Maisse C, Barcaroli D, Lüthi AU, Pirnia F, et al. Human delta Np73 regulates a dominant negative feedback loop for TAp73 and p53. *Cell Death Differ*. diciembre de 2001;8(12):1213-23.
115. Milutinovic S, Brown SE, Zhuang Q, Szyf M. DNA methyltransferase 1 knock down induces gene expression by a mechanism independent of DNA methylation and histone deacetylation. *J. Biol. Chem*. 2 de julio de 2004;279(27):27915-27.
116. Tan NY, Khachigian LM. Sp1 phosphorylation and its regulation of gene transcription. *Mol. Cell. Biol*. mayo de 2009;29(10):2483-8.
117. Wilhelm MT, Rufini A, Wetzel MK, Tsuchihara K, Inoue S, Tomasini R, et al. Isoform-specific p73 knockout mice reveal a novel role for delta Np73 in the DNA damage response pathway. *Genes Dev*. 15 de marzo de 2010;24(6):549-60.
118. Jin B, Robertson KD. DNA methyltransferases, DNA damage repair, and cancer. *Adv. Exp. Med. Biol*. 2013;754:3-29.
119. Buhlmann S, Pützer BM. DNp73 a matter of cancer: mechanisms and clinical implications. *Biochim. Biophys. Acta*. abril de 2008;1785(2):207-16.
120. Kartasheva NN, Lenz-Bauer C, Hartmann O, Schäfer H, Eilers M, Dobbstein M. DeltaNp73 can modulate the expression of various genes in a p53-independent fashion. *Oncogene*. 13 de noviembre de 2003;22(51):8246-54.
121. Tanaka Y, Kameoka M, Itaya A, Ota K, Yoshihara K. Regulation of HSF1-responsive gene expression by N-terminal truncated form of p73alpha. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 7 de mayo de 2004;317(3):865-72.

122. Karupiah G, Xie QW, Buller RM, Nathan C, Duarte C, MacMicking JD. Inhibition of viral replication by interferon-gamma-induced nitric oxide synthase. *Science*. 10 de septiembre de 1993;261(5127):1445-8.
123. Rawlings JS, Rosler KM, Harrison DA. The JAK/STAT signaling pathway. *J. Cell. Sci.* 15 de marzo de 2004;117(Pt 8):1281-3.
124. Schindler C, Fu XY, Improta T, Aebersold R, Darnell JE Jr. Proteins of transcription factor ISGF-3: one gene encodes the 91- and 84-kDa ISGF-3 proteins that are activated by interferon alpha. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 15 de agosto de 1992;89(16):7836-9.
125. Baran-Marszak F, Feuillard J, Najjar I, Le Clorennec C, Béchet J-M, Dusanter-Fourt I, et al. Differential roles of STAT1alpha and STAT1beta in fludarabine-induced cell cycle arrest and apoptosis in human B cells. *Blood*. 15 de octubre de 2004;104(8):2475-83.
126. Barry SP, Townsend PA, Knight RA, Scarabelli TM, Latchman DS, Stephanou A. STAT3 modulates the DNA damage response pathway. *Int J Exp Pathol*. diciembre de 2010;91(6):506-14.
127. Bito T, Sumita N, Masaki T, Shirakawa T, Ueda M, Yoshiki R, et al. Ultraviolet light induces Stat3 activation in human keratinocytes and fibroblasts through reactive oxygen species and DNA damage. *Exp. Dermatol.* 1 de julio de 2010;19(7):654-60.
128. Fagerlie SR, Diaz J, Christianson TA, McCartan K, Keeble W, Faulkner GR, et al. Functional correction of FA-C cells with FANCC suppresses the expression of interferon gamma-inducible genes. *Blood*. 15 de mayo de 2001;97(10):3017-24.
129. Li Y, Youssoufian H. MxA overexpression reveals a common genetic link in four Fanconi anemia complementation groups. *J. Clin. Invest.* 1 de diciembre de 1997;100(11):2873-80.

130. Morrison TE, Mauser A, Wong A, Ting JP, Kenney SC. Inhibition of IFN-gamma signaling by an Epstein-Barr virus immediate-early protein. *Immunity*. noviembre de 2001;15(5):787-99.
131. Xi S, Dyer KF, Kimak M, Zhang Q, Gooding WE, Chaillet JR, et al. Decreased STAT1 expression by promoter methylation in squamous cell carcinogenesis. *J. Natl. Cancer Inst.* 1 de febrero de 2006;98(3):181-9.
132. Singh BN, Shankar S, Srivastava RK. Green tea catechin, epigallocatechin-3-gallate (EGCG): mechanisms, perspectives and clinical applications. *Biochem. Pharmacol.* 15 de diciembre de 2011;82(12):1807-21.
133. Schmitt NC, Rubel EW, Nathanson NM. Cisplatin-induced hair cell death requires STAT1 and is attenuated by epigallocatechin gallate. *J. Neurosci.* 25 de marzo de 2009;29(12):3843-51.
134. Zhou X, Fang Y, Jing H, Zhong L, Luo P, Song H, et al. Involvement of mitogen-activated protein kinase in signal transducer and activator of transcription-1 mediated differentiation induced by bortezomib in acute myeloid leukemia cells. *Mol. Carcinog.* 17 de octubre de 2011;
135. Bermejo E, Martínez-Frías ML. Congenital eye malformations: clinical-epidemiological analysis of 1,124,654 consecutive births in Spain. *Am. J. Med. Genet.* 17 de febrero de 1998;75(5):497-504.
136. Tsilou ET, Giri N, Weinstein S, Mueller C, Savage SA, Alter BP. Ocular and orbital manifestations of the inherited bone marrow failure syndromes: Fanconi anemia and dyskeratosis congenita. *Ophthalmology.* marzo de 2010;117(3):615-22.
137. Gonzalez-Rodriguez J, Pelcastre EL, Tovilla-Canales JL, Garcia-Ortiz JE, Amato-Almanza M, Villanueva-Mendoza C, et al. Mutational screening of CHX10, GDF6, OTX2, RAX and SOX2 genes in 50 unrelated microphthalmia-anophthalmia-coloboma (MAC) spectrum cases. *Br J Ophthalmol.* agosto de 2010;94(8):1100-4.

138. Manuel M, Pratt T, Liu M, Jeffery G, Price DJ. Overexpression of Pax6 results in microphthalmia, retinal dysplasia and defective retinal ganglion cell axon guidance. *BMC Dev. Biol.* 2008;8:59.
139. Wu L-Y, Li M, Hinton DR, Guo L, Jiang S, Wang JT, et al. Microphthalmia resulting from MSX2-induced apoptosis in the optic vesicle. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* junio de 2003;44(6):2404-12.
140. Bahar I, Weinberger D, Kramer M, Axer-Siegel R. Retinal vasculopathy in Fanconi anemia: a case report. *Retina (Philadelphia, Pa.)*. septiembre de 2005;25(6):799-800.
141. Elgohary MA, Lim KS, Siriwardena D, Moore AT, Wormald RP. Increased crystalline lens thickness and phacomorphic glaucoma in patients with Fanconi anemia. *J Cataract Refract Surg.* octubre de 2006;32(10):1771-4.
142. Aslan D, Ozdogan S, Onol M, Kaya Z, Gursel T. An unusual ocular manifestation in Fanconi anemia: congenital glaucoma. *Am. J. Hematol.* enero de 2005;78(1):64-6.
143. Yahia SB, Touffahi SA, Zeghidi H, Zaouali S, Khairallah M. Ocular neovascularization in a patient with Fanconi anemia. *Can. J. Ophthalmol.* diciembre de 2006;41(6):778-9.
144. Gayatri NA, Hughes MI, Lloyd IC, Wynn RF. Association of the congenital bone marrow failure syndromes with retinopathy, intracerebral calcification and progressive neurological impairment. *Eur. J. Paediatr. Neurol.* 2002;6(2):125-8.
145. Crossan GP, Van der Weyden L, Rosado IV, Langevin F, Gaillard P-HL, McIntyre RE, et al. Disruption of mouse Slx4, a regulator of structure-specific nucleases, phenocopies Fanconi anemia. *Nat. Genet.* febrero de 2011;43(2):147-52.

146. Houghtaling S, Timmers C, Noll M, Finegold MJ, Jones SN, Meyn MS, et al. Epithelial cancer in Fanconi anemia complementation group D2 (Fancd2) knockout mice. *Genes Dev.* 15 de agosto de 2003;17(16):2021-35.
147. Carreau M. Not-so-novel phenotypes in the Fanconi anemia group D2 mouse model. *Blood.* 15 de marzo de 2004;103(6):2430.
148. Silver J, Hughes AF. The role of cell death during morphogenesis of the mammalian eye. *J. Morphol.* junio de 1973;140(2):159-70.
149. Laemle LK, Puzkarczuk M, Feinberg RN. Apoptosis in early ocular morphogenesis in the mouse. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 11 de enero de 1999;112(1):129-33.
150. Péquignot MO, Provost AC, Sallé S, Taupin P, Sainton KM, Marchant D, et al. Major role of BAX in apoptosis during retinal development and in establishment of a functional postnatal retina. *Dev. Dyn.* octubre de 2003;228(2):231-8.
151. Péquignot MO, Provost AC, Sallé S, Taupin P, Sainton KM, Marchant D, et al. The retinal pigment epithelium undergoes massive apoptosis during early differentiation and pigmentation of the optic cup. *Mol. Vis.* 2011;17:989-96.
152. Du W, Li J, Sipple J, Chen J, Pang Q. Cytoplasmic FANCA-FANCG complex interacts and stabilizes the cytoplasm-dislocalized leukemic nucleophosmin protein (NPMc). *J. Biol. Chem.* 2010;285(48):3736-44.

8) ANEXO

BIK (NBK) is a mediator of the sensitivity of Fanconi Anemia group C lymphoblastoid cell lines to interstrand DNA crosslinking agents.

Short title: BIK mediates ICL-induced apoptosis in FA-C LCL.

Inés Prieto-Remón, Dámaso Sánchez-Carrera, Mónica López-Duarte, Carlos Richard and Carlos Pipaón.

Servicio de Hematología - Instituto de Formación e Investigación Marqués de Valdecilla-IFIMAV, Santander, Spain.

Corresponding author: Carlos Pipaón, Laboratorio de Hematología Molecular, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, Pabellón 20, bajo. Avda. Valdecilla s/n, 39008 Santander, Spain.

e-mail: cpipaon@humv.es

phone: +34 942 202520 Ext. 73007

fax: +34 942 202918

ABSTRACT

Fanconi Anemia is a rare hereditary disorder characterized by congenital malformations, progressive bone marrow failure and an extraordinary predisposition to develop cancer. At present, fifteen genes have been related to this condition and mutations of them have also been found in different types of cancer. Bone marrow failure threatens the life of Fanconi Anemia patients during the first decade of their life but the mechanisms underlying this process are not completely understood. In the present work we investigate a possible imbalance between the expression of pro- and anti-apoptotic proteins as responsible for the hypersensitivity of FANCC-deficient cells to genotoxic stress. We found a BIK over-expression in lymphoblastoid cell lines derived from FA-C patients when compared to their phenotypically corrected counterparts. This over-expression has a transcriptional basis since the regulatory region of the gene shows higher activity in FANCC-deficient cells. We demonstrate the involvement of BIK in the sensitivity of FA-C lymphoblast to interstrand DNA crosslinking agents as it is induced by these drugs and interference of its expression in these cells preserves their viability and reduces apoptosis. We investigate the mechanism of BIK over-expression in FANCC-deficient cells by analyzing the activity of many different signaling pathways in these cells. Finally, we provide evidences of a previously undescribed indirect epigenetic regulation of BIK in FA-C lymphoblasts mediated by Δ Np73, an isoform of p73 lacking its transactivation domain that activates BIK through a proximal element in its promoter.

KEYWORDS

Fanconi Anemia (FA), Bcl-2 interacting killer (BIK), apoptosis, interstrand DNA crosslinking agents, Δ Np73.

ABBREVIATIONS

LCL, lymphoblastoid cell line, MMC, mitomycin C, TGF- β , transforming growth factor beta, IFN- γ , interferon gamma, NAC, N-acetyl-L-cysteine, DCB, 5-aza-2'-deoxycytidine or Decitabine.

INTRODUCTION

Fanconi Anemia is a recessive congenital disorder caused by mutations in any of fifteen different FANC genes that define fifteen different complementation groups [1]. Clinically it is characterized by congenital malformations, progressive bone marrow failure and an extraordinary high predisposition to suffering cancer, mainly hematological but also solid tumors [2]. Sporadic mutations in FANC genes have also been found in other types of cancer [3]. A progressive thrombocytopenia and eventually pancytopenia is usually the first clinical manifestation that, added to the physical alterations, raises the suspicion of a FA diagnostic. Although there has been great advances in the treatment of the bone marrow degradation of these patients, the drugs used sometimes have undesirable side effects and when an hematopoietic stem cell (HSC) transplantation is needed, it is not always possible to find a suitable donor. Thus, the increase of our knowledge on the mechanisms underlying this failure will help in the development of new treatments. Several works have shown an elevated predisposition of FA hematopoietic progenitors to apoptosis and this is thought to be the cause of the bone marrow aplasia in these patients [4]. This inherited predisposition is enhanced by the elevated production of certain inhibitory cytokines in this patients [5] as well as by oxidative stress [6] and by the exposure to environmental genotoxic agents, to which FA cells are particularly sensitive [7,8]. However, the pathways involved in the apoptosis predisposition of FA cells are still not fully understood.

BH3-only proteins are pro-apoptotic members of the family of proteins defined by their homology to Bcl-2. BIK (Bcl-2 interactin killer) was the first member where the apoptotic activity was linked to its Bcl-2 homology domain 3 (BH3) [9,10]. This domain is responsible for the interaction of BIK with anti-apoptotic proteins like Bcl-2 and Bcl-X. This interaction releases BAK and BAX, that mediate the liberation of cytochrome C from the mitochondria and its activation of caspases [11]. Thus, BH3-only proteins are classified into two groups: activators (BIM, BID and PUMA), capable of directly activating BAX and BAK, and sensitizers (BIK/NBK, BMF, BAD and NOXA) [12], that interact with and sequester the anti-apoptotic members of the Bcl-2 family, leaving the cells more sensitive to pro-apoptotic triggers. Alterations of BIK expression by many different mechanisms have been described in relation to carcinogenesis. BIK expression probably needs a tight regulation due to its already exposed BH3 domain [13]. Mechanisms regulating BIK function include p53-dependent and independent transcriptional regulation by different factors including TEF and E2F-1 [14,15], chromosomal deletions [16], phosphorylation of the protein [17] and methylation of the gene regulatory region [18]. In hematological malignancies, BIK expression has been related to the busulfan sensitivity in myeloid leukemia cells [19] and in the sensitivity to oxidative stress in myeloma cells [20]. In Burkitt's Lymphoma B-cell lines, TGF- β induces apoptosis by transcriptionally activating BIK and repressing Bcl-X(L) [21]. BIK is also activated during the B cell receptor stimulation, a mechanism thought to mediate B-cell selection at the germinal centers [22].

These features of BH3-only proteins make them ideal candidates to mediate the progressive bone marrow failure of FA patients. In the present article, we identify BIK as overexpressed in two lymphoblastoid cell lines derived from FA-C patients and demonstrate its implication in the sensitivity of these cells to interstrand DNA crosslinking agents. We also provide evidences of an epigenetic up-regulation of the expression of BIK in these cells, that uncovers a new regulation of BIK by Δ Np73.

MATERIALS AND METHODS

Cell culture and cell viability assay.

Epstein-Barr virus (EBV)-transformed human lymphoblasts were maintained in RPMI media 1640 (Life Technologies, Rockville, USA) supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum and grown in a humidified 5% CO₂-containing atmosphere at 37°C. The FANCC-deficient cell lines EUFA450 (heterozygous for 322delG and L554P) and HSC536 and their phenotypically corrected counterparts were described elsewhere [23]. Cells were grown in the presence of LY294002 (Cayman, Ann Arbor, USA), N-acetyl-L-cysteine (NAC) (Sigma, St. Louis, USA), transforming growth factor beta (TGF- β) (Life technologies, Rockville, USA), interferon gamma (IFN- γ) (Applichem, Darmstadt, Germany), Imatinib (Novartis, Basel, Switzerland), Tacrolimus (FK506) (Astellas, Deerfield, USA) or 5-Aza-2'-deoxycytidine (Decitabine, DCB)(Santa Cruz, Santa Cruz, USA) where indicated. Short-hairpin RNA viral vectors (Sigma, St. Louis, USA) were transduced into the cells to interfere with the expression of the indicated genes. Stably shRNA-transduced cells were selected by incubation with puromycin (Applichem, Darmstadt, Germany). To determine the cell resistance to certain treatments, 50,000 cells were plated on 96-well plates and incubated for 3 days in the presence of the indicated drugs. Cell viability was then determined using the XTT Cell Proliferation Kit II (Roche, Basel, Switzerland) following the manufacturer's instructions.

RT-PCR analysis

Total RNA was prepared using TRI reagent (MRC, Cincinnati, USA). To assess mRNA expression, a semiquantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) method was used. For the RT reaction, RNA (5 μ g) was primed with random hexamers and reverse transcribed with Superscript MMLV reverse transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, USA) in a 20 μ l volume following the manufacturer's instructions. The generated cDNA was amplified using primers for human BIK (5'-GACCATGGAGGTTCTTGGCA and 5'-AGGCTCACGTCCATCTCGTC), PUMA (5'-ACGACCTCAACGCACAGTACG and 5'-TGGGTAAGGGCAGGAGTCC), NOXA (5'-AGCTGCGTTTCACCAGGG and 5'-TCCAGCTACTTGCACCTTGTTCCT), BAX (5'-TGGAGCTGCAGAGGATGATTG and 5'-CCAGTTGAAGTTGCCGTCAGA), Bcl-X(L) (5'-GGCAACCCATCCTGGCACCT and 5'-AGCGTTCCTGGCCCTTTCG), Bcl-X(S) (5'-GAGGGAGGCAGGCGACGAGTTT and 5'-ATGGCGGCTGGACGGAGGAT), Bcl-2 (5'-AGATGTCCAGCCAGCTGCACCTGAC and 5'-AGATAGGCACCCAGGGTGATGCAAGCT), Mcl-1(L) (5'-ACGTTCTCGTAAGGACAAAA and 5'-TAGATATGCCAAACCAGCTC), Mcl-1(S) (5'-CAAGGATGGGTTTGTGGAGT and 5'-TAGATATGCCAAACCAGCTC), BIM (L) (5'-ATGGCTTCCATGAGGCAG and 5'-ATAACCATTTCGTGGGTGGTC), p53 (5'-GTTCCGAGAGCTGAATGAGG and 5'-TCTGAGTCAGGCCCTTCTGT), Tap73/ Δ Np73 (5'-TCTGGAACCAGACAGCACCT or 5'-CGCCTACCATGCTGTACGTC and 5'-GTGCTGGACTGCTGGAAAGT), and β 2 microglobulin (β 2 μ) (5'-GAGACATGTAAGCAGCATCA and 5'-AGCAACCTGCTCAGATACAT). After 30 amplification cycles, except for β 2 μ (25), the expected PCR products were size-fractionated onto a 2% agarose gel and stained with ethidium bromide.

Western blot analysis

To prepare whole cell lysates, cells were collected by centrifugation and washed once with PBS and then lysed in EBC buffer (50mM Tris [pH 8.0], 120 mM NaCl, 0.5% Nonidet P-40) supplemented with aprotinin (11.5 μ g/ml), leupeptin (11.5 μ g/ml) phenylmethylsulfonyl fluoride (50 μ g/ml), NaF (100mM) and Na Orthovanadate (0.2 mM). Protein concentration was determined by BCA following the manufacturer's instructions (Pierce, Rockford, USA). Proteins (100 μ g) were resolved in SDS-PAGE and transferred to PVDF filters. Blots were

incubated with rabbit antibodies against BIK, p53, DNMT1 or GAPDH (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA) and then incubated with anti-rabbit, anti-mouse or anti-goat antibodies conjugated with horseradish peroxidase (Pierce, Rockford, USA). Bound antibody was detected by a chemiluminescence assay (Pierce, Rockford, USA).

Gene reporter assay

A genomic PCR fragment of 1038 base pairs (bp) (-998 to +40, referred to the initiation of transcription) from the 5' regulatory region of BIK was amplified with specific primers and cloned into the pGL2basic luciferase reporter vector (Promega, Madison, USA). Deletions of this original construct were obtained by amplification using specific primers and cloning into pGL2basic. Similarly, a 1kb sequence upstream of the transcription start site of Δ Np73 corresponding to the second promoter of the p73 gene, was amplified from human genomic DNA and cloned into the same reporter vector. Cells were cotransfected with 1 μ g of the reporter constructs, 2 μ g of the adequate expression vectors and 0,2 μ g pEF-BOS- β -gal in triplicate using Superfect (Qiagen, Düsseldorf, Germany) according to the manufacturer's directions. 36 hours after transfection, cell extracts were prepared and analyzed for their luciferase activity by using a reporter gene assay system (Promega, Madison, USA). Results were normalized for transfection efficiency with the β -galactosidase activity values obtained in the same extracts.

Methylation analysis

Genomic DNA was isolated using DNAzol reagent (Invitrogen, Carlsbad, USA). 1 μ g of genomic DNA was modified with bisulfite using the EZ DNA Methylation Gold Kit (Zymo Research, Irvine, USA). The region between -314 and +44 of BIK promoter was amplified with the primers 5'-AAAGGGTTAGATTTTGTAAATGGAT and 5'-ATACTAACAACGTCTATAAACCACC, and cloned into the plasmid pCR-II by TA-cloning (Invitrogen, Carlsbad, USA). The plasmids were transformed into DH5- α bacteria and 10 different colonies from each cell line were sequenced. For the analysis of the methylation of the second promoter of p73 (P2p73), 1 μ g of genomic DNA from the indicated cell lines was digested overnight with HpaII, MspI or with no enzyme. After inactivation of the enzymes at 65°C for 20 minutes, the integrity of the P2p73 under each digestion was determined by PCR with the primers 5'-GAAAGCAGGCAGGTGGTTTGGG and 5'-TGAATCCAACAACAAAACCCGC, that amplify 1 kb upstream of the transcription start site.

RESULTS

BIK is overexpressed in FANCC-deficient cell lines.

It is well known that FA-C cells are hypersensitive to interstrand DNA crosslinking agents like cisplatin or mitomycin C (MMC). We hypothesized that such an increased sensitivity could eventually be due to the aberrant expression of genes directly involved in the apoptotic response, which final misbalance leave the FA cells prone to apoptosis. In order to avoid the influence of the genetic background, we used an isogenic model of a lymphoblastoid cell line (LCL) derived from a FA-C patient and its counterpart line, corrected by a second mutation that restores the functionality of the FANCC protein. We analyzed the basal expression of a number of apoptotic genes in these two cell lines. Although we did not observe much variation in the expression of most of the genes analyzed, the over-expression of BIK and PUMA in FA-C cells correlated well with their apoptosis-prone phenotype (figure 1A). We validated these results by quantitative RT-PCR analysis of four pro-apoptotic genes in the same cells: PUMA, BAX, NOXA and BIK. The test confirmed that BIK and PUMA mRNAs accumulate at a much higher basal level in FA-C cells (figure 1B). Quantitative analysis of these mRNAs in a second FANCC-deficient lymphoblastoid cell line showed similar results when compared to their corrected counterparts transduced with a wild type FANCC expression vector (figure 1C). BIK protein mirrored the level of BIK mRNA in FA-C LCL as we could demonstrate by Western blot (figure 1D). Moreover, BIK mRNA accumulated at a higher level also in a squamous cell carcinoma (SCC) cell line derived from a FA-C patient when compared to its FANCC-transduced counterpart or to another SCC cell line derived from a FANCC-proficient patient (figure 1E). We could not detect similar differences in BIK mRNA accumulation between FANCA-deficient cells and their corrected isogenic controls (supplementary figure 1F). Since BIK was consistently over-expressed in the cell lines tested, we focussed our efforts to the characterization of the molecular mechanisms leading to its activation in FANCC-deficient cells and its role in the apoptosis-prone phenotype of these cells.

BIK gene promoter is more active in FA-C LCL.

We then explored a potential transcriptional mechanism as responsible of the over-expression by transfecting a reporter construct containing 556 bp of the region upstream of the transcriptional initiation of the gene into FA-C LCLs or their reverted controls. This region was able to promote the transcription of the reporter gene in FANCC-proficient cells although at a very low rate as expected for a gene involved in cellular death (figure 2A). The activity of this promoter region was clearly higher when transfected into FANCC-deficient cells (figure 2A), suggesting a transcriptional mechanism in the over-expression of BIK in FA-C cells. In order to ascertain a role of FANCC-deficiency in the activation of BIK promoter, we transfected the reporter construct into HCT116 colon carcinoma cell line, and co-transfected a short-hairpin RNA (shRNA) interference plasmid against FANCC. As shown in figure 2B, the interference of FANCC expression produced an activation of BIK promoter in these cells. Moreover, when we artificially over-express FANCA in HCT116 cells, the activity of our BIK promoter reporter construct reduces notably (figure 2C). These data further confirm a role of FANCC in the transcriptional regulation of BIK.

BIK expression is activated during genotoxic-induced cell death in FA-C LCL.

Cisplatin and mitomycin C (MMC) are drugs known to create adducts between the DNA strands that the FA cells fail to resolve properly leading to an aberrant induction of the apoptosis mechanisms, which is considered a hallmark of this pathology. We tested our isogenic model by treating the cells with increasing concentrations of cisplatin and determining the cell viability after three days. FANCC-deficient cells showed reduced

viability at lower cisplatin doses than their corrected isogenic partners as expected (figure 3A). Something similar happened when we treated FA-C cells with MMC (data not shown).

BIK is a well known BH3-only protein involved in the apoptotic response to chemotherapeutic agents [15]. In order to determine whether this gene plays a role in the stronger response of FANCC-deficient cells to interstrand DNA crosslinking agents we studied the accumulation of its mRNA after cisplatin treatment. After a 24 hour incubation of FA-C LCLs with cisplatin at doses that differentially affect their viability compared to FANCC-proficient cells (see figure 3A), we observed a dose-dependent accumulation of BIK transcript in both cell types, but the levels they reached were clearly higher in FANCC-deficient cells (figure 3B). Other apoptosis-related genes showed much milder increases in their mRNA if any. A similar induction of BIK expression was obtained when we incubated FA-C LCLs in the presence of MMC, both at the mRNA and protein levels (figure 3C). Interestingly, p53 was strongly stabilized in response to MMC in these cells (supplementary figure 2C), mirroring BIK induction. A second FANCC-deficient lymphoblastoid cell line showed similar BIK inductions after MMC treatment when compared to its phenotypically corrected controls (figure 3D).

These results show a differential induction of BIK pro-apoptotic gene after DNA damage depending on FANCC integrity and suggest BIK basal overexpression as a predisposition factor of FA-C cells to apoptosis.

Interference of BIK expression make FA-C LCL more resistant to crosslinking agents.

To determine the role of BIK in the predisposition of FA-C cells to apoptosis, we genetically interfere its expression using a shRNA construct and analyze the effect on the sensitivity of FA-C LCLs to interstrand DNA crosslinking agents. We obtained a FA-C cell line stably transfected with the BIK shRNA construct where we confirmed a 50% reduction in BIK mRNA expression (figure 4A) that conditioned a reduction in BIK protein (data not shown). The interference of BIK in these FANCC-deficient cells preserves a higher viability in response to cisplatin in comparison to the parental cell line or cells transduced with a non-target shRNA construct (figure 4B). Analysis of the cell cycle of these cells showed a reduction in the sub-G1 peak, representing the cells undergoing apoptosis, both basal or after treatment with cisplatin (figure 4C). Similarly, the interference of BIK expression leads to a reduction in the amount of propidium iodide stained cells after cisplatin treatment (figure 4D). Taken together, these data demonstrate a role of BIK over-expression in the hypersensitivity of FA-C cells to interstrand DNA crosslinking agents.

BIK basal activation in FA-C LCL is not related to an elevation in DNA damage signaling.

One possible explanation for the high basal levels of BIK mRNA in FA-C LCLs could be that the failure in their DNA repair machinery leads to an accumulation of DNA damage and to a basal activation of the apoptotic pathways in these cells. To test this possibility, we decided to block in FA-C LCLs the reactive oxygen species (ROS) and the activation of the tyrosine kinase c-Abl, both mediators of the DNA-damage signaling [24,25] [26], and analyze the effect over BIK expression. Pretreatment of FA-C with the antioxidant N-acetyl-L-cystein (NAC) prior to the addition of cisplatin completely blocked BIK mRNA induction (figure 5A), indicating a role of ROS in this process. However, although capable to reduce basal BIK expression in corrected LCLs, NAC had no effect on the basal levels of BIK mRNA in FANCC-deficient LCLs, suggesting that its basal increase is not due to the accumulation of ROS in FANCC-deficient cells (figure 5B). Consistently, incubation of FA-C LCLs for 3 days with increasing concentrations of NAC did not affect their viability as

measured by XTT (figure 5C) and only slightly improved the viability of these cells when exposed to low doses of cisplatin (figure 5D). As in the case of NAC, treatment with Imatinib, a specific inhibitor of c-Abl, reduced the basal levels of BIK mRNA in FANCC-proficient cells in a dose dependent manner (figure 5E). Both observations suggest that basal expression of BIK in FANCC-proficient cells is due to signals induced by DNA damage probably caused by errors in the DNA replication process. However, BIK mRNA expression in FA-C cells was unaffected by Imatinib treatment (figure 5E), indicating that an elevated c-Abl activation is not the cause of the increased BIK expression in these cells. Moreover, the treatment with Imatinib had no effect on the viability of these cells in response to cisplatin (data not shown). Taken together, these data suggest that an increase in the DNA damage signaling is not the cause of the elevated basal BIK levels in FA-C LCLs.

Analysis of different signaling pathways that may regulate BIK in FA-C LCLs.

Since an increase in DNA damage signaling does not seem to be involved in BIK over-expression in FA-C LCLs, we considered an aberrant activation of other signaling pathways as responsible for such effect. BIK has been related to the induction of apoptosis in B cells mediated by B cell receptor [22]. This activation of BIK is dependent of the PI3K and calcineurin signaling pathways. We used specific inhibitors of these two pathways and analyzed their effect on BIK mRNA levels in FA-C LCL. The calcineurin inhibitor Tacrolimus did not affect BIK expression (supplementary figure 1A). However, PI3K demonstrated some activity over BIK expression since treatment with LY294002 moderately reduced the accumulation of BIK mRNA, although the effect was more evident in FANCC-proficient cells (supplementary figure 1B). This subtle effect was not accompanied by a clear change in cellular viability (supplementary figure 1C).

Inactivation of FANCC has been related to an increase in interferon gamma (IFN γ)-induced apoptotic responses in hematopoietic cells [23,27]. However, incubation of our FA-C LCLs with increasing concentrations of IFN γ for 24 hours had no effect on their viability (supplementary figure 1D). Something similar happened when the cells were incubated with TGF- β , a cytokine known to induce apoptosis in human B cells through the regulation of BIK and Bcl-X [21] (supplementary figure 1E). In addition, these two cytokines induced no significant change in BIK mRNA in our cells (supplementary figures 1F and 1G).

Demethylating agents induce BIK expression and sensitize control LCL to interstrand DNA crosslinking agents.

Several epigenetic events have been reported to modify BIK expression in relation to carcinogenesis [28]. Thus, we considered a possible change in the methylation status of BIK promoter as the reason of its elevated basal expression in FA-C cells. BIK mRNA expression is clearly induced in response to the demethylating agent Decitabine (DCB), especially in FANCC-proficient cells, where BIK mRNA rises to reach the level observed in FA-C LCLs (figure 6A). We then studied the methylation status of BIK promoter in FANCC-deficient cells to try to correlate it with the basal expression level of the gene. However, the methylation analysis of 31 methylable CpG dimers between positions -314 and +44 of the gene showed a lack of methylation both in FA-C LCLs and their corrected controls (supplementary figure 2A). To investigate a possible indirect epigenetic effect on BIK basal expression, we then studied the expression profile of factors candidate to regulate BIK in response to demethylating agents. We found that Δ Np73, an isoform of p73 driven by a second promoter within the third intron of the gene, is clearly induced both by DCB and MMC, following a pattern very similar to that of BIK (figure 6A). In clear contrast, the mRNAs of the close related genes TAp73 and p53 showed no change in response to DCB.

Quantitative RT-PCR further confirmed a higher basal expression of $\Delta Np73$ in FA-C LCLs (supplementary figure 2B), suggesting a relationship between these two genes. To investigate a possible transcriptional regulation of BIK by $\Delta Np73$, we analyzed the effect of this later on the activation of BIK gene promoter. In cotransfection experiments, $\Delta Np73$ was able to induce two fold the luciferase activity driven by the region between positions -998 and +40 relative to the transcription start site of the BIK gene (figure 6B). p53 does not directly activate BIK promoter, although strongly activates promoter 2 of p73, responsible of the regulation of $\Delta Np73$ transcription in the cell. The element within BIK promoter responsible for its induction by $\Delta Np73$ seems to be located between positions -96 and the transcriptional start site, since deletion of the promoter further than that abrogates both its basal activity and its induction by $\Delta Np73$ (figure 6C). Analysis of the promoter 2 of p73 with methylation-sensitive restriction enzymes revealed a lower methylation level in FA-C LCLs compared to their corrected counterparts, compatible with the higher basal expression of $\Delta Np73$ in these cells (figure 6D). These group of results demonstrate that FA-C LCLs show alterations in their DNA methylation pattern that lead to the basal overexpression of BIK through its regulation by $\Delta Np73$.

Since DCB induces the expression of BIK in FANCC-proficient cells, we wanted to test whether this induction sensitizes these cells to DNA interstrand crosslinking agents. Thus, we treated both FA-C and reverted LCLs with DCB and analyzed the response of the cells to MMC. Treatment with DCB induced no noticeable change in the sensitivity of FANCC-deficient cells to MMC. However, FANCC-proficient cells became more sensitive to MMC, showing a viability curve similar to that of FA-C LCLs (figure 6E). These data further support the idea that BIK mediates the sensitivity of FA-C to DNA interstrand crosslinking agents and that its higher basal expression in FA-C LCLs though epigenetic mechanisms leave the cells prone to apoptosis.

DISCUSSION

One of the main cellular aspects of the phenotype of FA is the predisposition both spontaneous and induced to programmed cell death or apoptosis. This predisposition is behind the progressive bone marrow failure of these patients. This aspect of the pathology is an important issue since it threatens the life of the patient within the first decade of life. Current therapies for this bone marrow failure have important side effects and in the case of transplantation, adds the problem of finding a suitable bone marrow donor. Thus, preservation of the hematopoietic progenitors of these patients is of extreme importance. The knowledge of the mechanisms and cellular components involved in the predisposition to apoptosis of FANCC-deficient cells become then crucial to develop new therapies with lower side effects and that may avoid more aggressive treatments.

In the present work we decided to identify apoptotic-related genes with altered basal expression that could account for the elevated predisposition to apoptosis of FA-C cells. Our discrete screening in an isogenic lymphoblastoid cell line (LCL) model identified BIK as consistently overexpressed in FA-C LCLs at the mRNA basal level. This gene code for a BH3-only protein known to activate other executive members of the same family, namely BAX and BAK. BH3-only proteins can be divided into those that directly activate BAX and BAK, and those that sensitizes cells by releasing them from the dimers they form with anti-apoptotic Bcl-2-related proteins [12]. BIK belongs to the sensitizers of BH3-only family. Thus, the overexpression of BIK seems to be related to the sensitivity of these cells to DNA crosslinking agents. In agreement with this idea, the interference of BIK expression using short hairpin constructs make FANCC-deficient LCLs more resistant to cisplatin (figure 4B) and reduces the number of cells entering apoptosis under these conditions (figures 4C and 4D).

Here we provide for the first time evidence of a role of FANCC in the modulation of BIK expression. Surprisingly, BIK basal over-expression does not seem to be related to the accumulation of DNA damage in FA-C LCLs since an antioxidant as N-acetyl-L-cystein or the inhibition of c-Abl, known to mediate DNA damage signals, only blocked the cisplatin-induced activation of BIK, but had no effect on its basal mRNA levels in FA-C cells (Figure 5). BIK gene expression is very tightly controlled given the fact of its exposed BH3 domain [13]. Several mechanisms of BIK regulation have been described in relation to carcinogenesis [14-18]. We explored several pathways related to B-cell physiology as possible aberrant mediators of BIK over-expression in FA-C cells, but we found no clear involvement in our system (supplementary figure 1).

FA hematopoietic stem cells have been reported to be more sensitive to inhibitory cytokines [23,29] that, in addition, are over-expressed by FA patients [30,31]. Some authors give central importance to cytokines in the etiology of bone marrow failure in FA. However, treatment of LCLs with IFN γ or TGF- β neither have any effect on cell viability nor induced any change on BIK expression, independently of their FANCC status (supplementary figures 1D-G). This lack of response to IFN γ or TGF- β in LCLs could be attributable to the interference of the Epstein-Barr virus used for the immortalization of the cells.

Changes in the methylation pattern of tumor suppressor genes have been associated with carcinogenesis. BIK has been identified as one of the most affected genes by epigenetic mechanisms in cancer cells [18,28] and it actually contains a CpG island in its promoter region that makes it susceptible to regulation by methylation. We hypothesized that the elevated levels of expression of BIK in FA-C LCLs could be due to a demethylation of its regulatory region. This idea was supported by our finding that a demethylating agent can

increase BIK mRNA expression in control LCLs to reach levels similar of those of FANCC-deficient cells (figure 6A). Moreover, treatment with Decitabine induces a concomitant increase in the sensitivity of FANCC-proficient cells to mitomycin C, supporting the idea that BIK contributes to the apoptosis-prone phenotype of FA-C cells (figure 6E). However, 31 CpG dimers within the first 314 bp of the 5' upstream region of the BIK gene are completely unmethylated in LCLs irrespectively of their FANCC status. This observation correlates with the data of Milutinovic et al. showing a predominantly unmethylated pattern of this gene. These authors demonstrated a regulation of BIK by DNMT1 independently of their methylase function [32]. Interestingly, DNMT1 knock down induces a stress cellular response with a gene expression profile very similar to that of FA cells ([33] and our unpublished data), and we previously demonstrated an altered methylation pattern of the first p73 intron in FANCA-deficient cells [34], suggesting an interrelation between DNA methylation and repair pathways.

We then explored an indirect epigenetic regulation of BIK expression in FA-C LCLs. Although p53 has been related to the induction of BIK expression [35] and BIK promoter contains degenerate p53 binding sites [36], no response to p53 in promoter assays has been detected [35,37]. In addition to this, several groups have reported p53-independent activation of the BIK gene in response to genotoxic chemotherapeutic drugs [15]. p53 is strongly stabilized at the protein level after MMC treatment, specially in FA-C LCLs, correlating with the activation of BIK mRNA expression. However, our promoter experiments indicate that is Δ Np73 and not p53 the member of the p53 family that activates BIK promoter. Δ Np73 is a truncated form of p73 that lacks its transactivation (TA) domain and is induced by p53 through its promoter, located in intron 3 of the p73 gene. Δ Np73 has been reported to play dominant negative functions with TA domain-containing members of the family, but it also activates transcription through its interaction with other factors [38]. Our promoter deletion experiments locate the Δ Np73-responsive element within the first 96 bp of BIK promoter. The region between -96 and -40 contains SP1 binding sites that sustain the basal activity of this promoter in our experiments. A possible cooperation between SP1 and Δ Np73 in the regulation of this promoter is currently under investigation in our laboratory.

Epigenetics are considered as a master regulator of Δ Np73 mRNA expression [39], and our data with demethylating agents further support this idea. We show a lower methylation degree of the second promoter of p73, that correlates with the higher basal expression of Δ Np73 in FA-C LCLs. Thus, our results point to Δ Np73 as a key modulator of cell death mediated by BIK in FA-C cells, compiling both epigenetic and genotoxic-induced signaling. Alterations in both of this pathways in FANCC-deficient cells explain both basal and induced expressions of BIK, and so the apoptosis-prone phenotype of these cells.

In summary, we have reported an overproduction of BIK in FA-C lymphoblastoid cells lines and provided evidence of its implication in FA-C apoptosis-prone phenotype. Our tests demonstrate an involvement of Δ Np73 protein in BIK regulation, that mediates its activation both by genotoxic damage and epigenetic alterations in FA-C LCLs. Although further studies are needed, these findings open new therapeutic targets to alleviate the bone marrow aplasia of these patients.

ACKNOWLEDGMENTS

This work has been supported by grants PS09/01533 from Instituto de Salud Carlos III and UC08/03 from Fundación Marqués de Valdecilla-IFIMAV and Universidad de Cantabria. Inés Prieto-Remón and Dámaso Sánchez-Carrera are recipients of a contract from Instituto de Formación e Investigación Marqués de Valdecilla-IFIMAV.

EUFA 1131 cell line was a kind gift from doctors Rudd Brakenhoff and Hans Joenje. HSC536 cell lines were kindly donated by doctor Juan Bueren.

We thank Albert Herrería Cobo for the correction of the grammar.

REFERENCES

- 1 D'Andrea AD (2010) Susceptibility pathways in Fanconi's anemia and breast cancer. *N. Engl. J. Med.* **362**, 1909–1919.
- 2 Rosenberg PS, Greene MH and Alter BP (2003) Cancer incidence in persons with Fanconi anemia. *Blood* **101**, 822–826.
- 3 Valeri A, Martínez S, Casado JA and Bueren JA (2011) Fanconi anaemia: from a monogenic disease to sporadic cancer. *Clin Transl Oncol* **13**, 215–221.
- 4 Río P, Segovia JC, Hanenberg H, Casado JA, Martínez J, Göttsche K, Cheng NC, Van de Vrugt HJ, Arwert F, Joenje H and Bueren JA (2002) In vitro phenotypic correction of hematopoietic progenitors from Fanconi anemia group A knockout mice. *Blood* **100**, 2032–2039.
- 5 Bijangi-Vishehsaraei K, Saadatzadeh MR, Werne A, McKenzie KAW, Kapur R, Ichijo H and Haneline LS (2005) Enhanced TNF-alpha-induced apoptosis in Fanconi anemia type C-deficient cells is dependent on apoptosis signal-regulating kinase 1. *Blood* **106**, 4124–4130.
- 6 Du W, Adam Z, Rani R, Zhang X and Pang Q (2008) Oxidative stress in Fanconi anemia hematopoiesis and disease progression. *Antioxid. Redox Signal.* **10**, 1909–1921.
- 7 Taniguchi T, Tischkowitz M, Ameziane N, Hodgson SV, Mathew CG, Joenje H, Mok SC and D'Andrea AD (2003) Disruption of the Fanconi anemia-BRCA pathway in cisplatin-sensitive ovarian tumors. *Nat Med* **9**, 568–574.
- 8 Ferrer M, Izeboud T, Ferreira CG, Span SW, Giaccone G and Kruyt FAE (2003) Cisplatin triggers apoptotic or nonapoptotic cell death in Fanconi anemia lymphoblasts in a concentration-dependent manner. *Exp Cell Res* **286**, 381–395.
- 9 Boyd JM, Gallo GJ, Elangovan B, Houghton AB, Malstrom S, Avery BJ, Ebb RG, Subramanian T, Chittenden T and Lutz RJ (1995) Bik, a novel death-inducing protein shares a distinct sequence motif with Bcl-2 family proteins and interacts with viral and cellular survival-promoting proteins. *Oncogene* **11**, 1921–1928.
- 10 Chittenden T, Flemington C, Houghton AB, Ebb RG, Gallo GJ, Elangovan B, Chinnadurai G and Lutz RJ (1995) A conserved domain in Bak, distinct from BH1 and BH2, mediates cell death and protein binding functions. *EMBO J* **14**, 5589–5596.
- 11 Chinnadurai G, Vijayalingam S and Rashmi R (2008) BIK, the founding member of the BH3-only family proteins: mechanisms of cell death and role in cancer and pathogenic processes. *Oncogene* **27 Suppl 1**, S20–9.
- 12 Letai A, Bassik MC, Walensky LD, Sorcinelli MD, Weiler S and Korsmeyer SJ (2002) Distinct BH3 domains either sensitize or activate mitochondrial apoptosis, serving as prototype cancer therapeutics. *Cancer Cell* **2**, 183–192.
- 13 McDonnell JM, Fushman D, Milliman CL, Korsmeyer SJ and Cowburn D (1999) Solution structure of the proapoptotic molecule BID: a structural basis for apoptotic agonists and antagonists. *Cell* **96**, 625–634.
- 14 Ritchie A, Gutierrez O and Fernández-Luna JL (2009) PAR bZIP-bik is a novel transcriptional pathway that mediates oxidative stress-induced apoptosis in fibroblasts. *Cell Death Differ* **16**, 838–846.
- 15 Real PJ, Sanz C, Gutierrez O, Pipaón C, Zubiaga AM and Fernandez-Luna JL (2006) Transcriptional activation of the proapoptotic bik gene by E2F proteins in cancer cells. *FEBS Lett* **580**, 5905–5909.
- 16 Castells A, Gusella JF, Ramesh V and Rustgi AK (2000) A region of deletion on chromosome 22q13 is common to human breast and colorectal cancers. *Cancer Res* **60**, 2836–2839.
- 17 Li YM, Wen Y, Zhou BP, Kuo H-P, Ding Q and Hung M-C (2003) Enhancement of Bik antitumor effect by Bik mutants. *Cancer Res* **63**, 7630–7633.

- 18 Sturm I, Stephan C, Gillissen B, Siebert R, Janz M, Radetzki S, Jung K, Loening S, Dörken B and Daniel PT (2006) Loss of the tissue-specific proapoptotic BH3-only protein Nbk/Bik is a unifying feature of renal cell carcinoma. *Cell Death Differ* **13**, 619–627.
- 19 Valdez BC, Murray D, Ramdas L, de Lima M, Jones R, Kornblau S, Betancourt D, Li Y, Champlin RE and Andersson BS (2008) Altered gene expression in busulfan-resistant human myeloid leukemia. *Leuk Res* **32**, 1684–1697.
- 20 Bodet L, Ménoret E, Descamps G, Pellat-Deceunynck C, Bataille R, Le Gouill S, Moreau P, Amiot M and Gomez-Bougie P (2010) BH3-only protein Bik is involved in both apoptosis induction and sensitivity to oxidative stress in multiple myeloma. *Br J Cancer* **103**, 1808–1814.
- 21 Spender LC, O'Brien DI, Simpson D, Dutt D, Gregory CD, Allday MJ, Clark LJ and Inman GJ (2009) TGF-beta induces apoptosis in human B cells by transcriptional regulation of BIK and BCL-XL. *Cell Death Differ* **16**, 593–602.
- 22 Jiang A and Clark EA (2001) Involvement of Bik, a proapoptotic member of the Bcl-2 family, in surface IgM-mediated B cell apoptosis. *J Immunol* **166**, 6025–6033.
- 23 Rathbun RK, Faulkner GR, Ostroski MH, Christianson TA, Hughes G, Jones G, Cahn R, Maziarz R, Royle G, Keeble W, Heinrich MC, Grompe M, Tower PA and Bagby GC (1997) Inactivation of the Fanconi anemia group C gene augments interferon-gamma-induced apoptotic responses in hematopoietic cells. *Blood* **90**, 974–985.
- 24 Zhang X, Sejas DP, Qiu Y, Williams DA and Pang Q (2007) Inflammatory ROS promote and cooperate with the Fanconi anemia mutation for hematopoietic senescence. *J Cell Sci* **120**, 1572–1583.
- 25 Lyakhovich A and Surrallés J (2010) Constitutive activation of caspase-3 and Poly ADP ribose polymerase cleavage in fanconi anemia cells. *Mol. Cancer Res.* **8**, 46–56.
- 26 Maiani E, Diederich M and Gonfloni S (2011) DNA damage response: The emerging role of c-Abl as a regulatory switch? *Biochem Pharmacol.*
- 27 Rathbun R, Christianson T, Faulkner G, Jones G, Keeble W, O'Dwyer M and Bagby G (2000) Interferon-gamma-induced apoptotic responses of Fanconi anemia group C hematopoietic progenitor cells involve caspase 8-dependent activation of caspase 3 family members. *Blood* **96**, 4204–11.
- 28 Dai Z, Liu S, Marcucci G and Sadee W (2006) 5-Aza-2'-deoxycytidine and depsipeptide synergistically induce expression of BIK (BCL2-interacting killer). *Biochem Biophys Res Commun* **351**, 455–461.
- 29 Haneline LS, Broxmeyer HE, Cooper S, Hangoc G, Carreau M, Buchwald M and Clapp DW (1998) Multiple inhibitory cytokines induce deregulated progenitor growth and apoptosis in hematopoietic cells from Fac-/- mice. *Blood* **91**, 4092–4098.
- 30 Dufour C, Corcione A, Svahn J, Haupt R, Poggi V, Béka'ssy AN, Scimè R, Pistorio A and Pistoia V (2003) TNF-alpha and IFN-gamma are overexpressed in the bone marrow of Fanconi anemia patients and TNF-alpha suppresses erythropoiesis in vitro. *Blood* **102**, 2053–2059.
- 31 Ibáñez A, Río P, Casado JA, Bueren JA, Fernández-Luna JL and Pipaón C (2009) Elevated levels of IL-1beta in Fanconi anaemia group A patients due to a constitutively active phosphoinositide 3-kinase-Akt pathway are capable of promoting tumour cell proliferation. *Biochem J* **422**, 161–170.
- 32 Milutinovic S, Brown SE, Zhuang Q and Szyf M (2004) DNA methyltransferase 1 knock down induces gene expression by a mechanism independent of DNA methylation and histone deacetylation. *J Biol Chem* **279**, 27915–27927.
- 33 Milutinovic S, Zhuang Q, Niveleau A and Szyf M (2003) Epigenomic stress response. Knockdown of DNA methyltransferase 1 triggers an intra-S-phase arrest of DNA replication and induction of stress response genes. *J Biol Chem* **278**, 14985–14995.

- 34 Pipaón C, Real PJ and Fernandez-Luna JL (2005) Defective binding of transcriptional repressor ZEB via DNA methylation contributes to increased constitutive levels of p73 in Fanconi anemia cells. *FEBS Lett* **579**, 4610–4614.
- 35 Mathai JP, Germain M, Marcellus RC and Shore GC (2002) Induction and endoplasmic reticulum location of BIK/NBK in response to apoptotic signaling by E1A and p53. *Oncogene* **21**, 2534–2544.
- 36 Verma S, Budarf ML, Emanuel BS and Chinnadurai G (2000) Structural analysis of the human pro-apoptotic gene Bik: chromosomal localization, genomic organization and localization of promoter sequences. *Gene* **254**, 157–162.
- 37 Hur J, Bell DW, Dean KL, Coser KR, Hilario PC, Okimoto RA, Tobey EM, Smith SL, Isselbacher KJ and Shioda T (2006) Regulation of expression of BIK proapoptotic protein in human breast cancer cells: p53-dependent induction of BIK mRNA by fulvestrant and proteasomal degradation of BIK protein. *Cancer Res* **66**, 10153–10161.
- 38 Tanaka Y, Kameoka M, Itaya A, Ota K and Yoshihara K (2004) Regulation of HSF1-responsive gene expression by N-terminal truncated form of p73alpha. *Biochem Biophys Res Commun* **317**, 865–872.
- 39 Brigati C, Banelli B, Casciano I, Di Vinci A, Matis S, Cutrona G, Forlani A, Allemanni G and Romani M (2011) Epigenetic mechanisms regulate Δ NP73 promoter function in human tonsil B cells. *Mol Immunol* **48**, 408–414.

FIGURE LEGENDS

Figure 1: BIK is overexpressed in FANCC-deficient cell lines.

- A. Semiquantitative RT-PCR analysis of several apoptosis-related genes in total RNA extracts from FA-C LCLs (EUFA450) and their reverted counterparts (EUFA450R).
- B. Quantitative RT-PCR analysis of PUMA, NOXA, BAX and BIK pro-apoptotic genes expression in total RNA extracted from EUFA450 (FA-C LCL, black bars) and EUFA450R (reverted LCL, white bars).
- C. Quantitative RT-PCR analysis of the same pro-apoptotic genes as in B in total RNA extracts from HSC536 (FA-C LCL, black bars) and HSC536+FC (transduced with an expression viral vector for wild type FANCC, white bars).
- D. Whole cell protein extracts obtained from EUFA450 cells and their reverted counterparts incubated in the presence or absence of mitomycin C (MMC) 0.33 μ M for 16 hours were analyzed by western blot for the expression of BIK. The same blot was incubated with an anti-GAPDH antibody as a loading control.
- E. Total RNA from EUFA1131, a FA-C squamous carcinoma cell line (SCC), their FANCC-transduced counterparts (EUFA1131+FC) and a non-Fanconi SCC (UM-SCC-14c) were analyzed by semiquantitative RT-PCR for BIK mRNA expression. Beta-2 microglobulin (B2M) expression is shown as housekeeping control.

Figure 2: FANCC modulates BIK promoter activity.

- A. EUFA450 (FA-C) and EUFA450R (reverted) LCL were transfected with a reporter construct containing 556 base pairs upstream of the transcription origin of the BIK gene driving the luciferase gene expression. The graph represents the relative luciferase activity (RLU) in both cell lines transfected with the -556 BIK construct (black bars) or the empty reporter vector (white bars).
- B. HCT116 colon carcinoma cells were transfected with our -556 BIK luciferase construct and co-transfected either with a FANCC shRNA interference construct (black bar) or an empty vector (white bar). The relative luciferase activity (RLU) in the cells is represented.
- C. HCT116 cells were transfected with the -556 BIK luciferase construct and cotransfected either with a FANCC expression vector (black bar) or its empty vector (white bar). The luciferase activity in the cell extracts was then measured and graphed as RLU.

Figure 3: DNA interstrand crosslinking agents induce BIK in FA-C LCL.

- A. Sensitivity of EUFA450 (FA-C) and EUFA450R (reverted) cells to cisplatin. The cells were grown for three days in the presence of the indicated concentrations of cisplatin and their viability was then measured using a XTT viability cell assay.
- B. EUFA450 and EUFA450R cells were treated with the indicated concentrations of cisplatin for 24 hours and their total RNA extracts were analyzed by semiquantitative RT-PCR for the expression of BIK, PUMA, NOXA and BAX pro-apoptotic genes.
- C. Western blot analysis of BIK expression on EUFA450 and EUFA450R whole cell protein extracts after treatment with the indicated concentration of mitomycin C (MMC) for 24 hours. The same blot was incubated with an anti-GAPDH antibody as a loading control.
- D. HSC536 (FA-C) and HSC536+FC (FANCC-transduced) cells were treated with mitomycin C 1 μ M for 24 hours and their total RNA extracts were analyzed by semiquantitative RT-PCR for the mRNA levels of the indicated pro-apoptotic genes. Beta-2-microglobulin (B2M) mRNA expression was determined as housekeeping control.

Figure 4: Interference of BIK expression in FA-C lymphoblastoid cells augments their resistance to interstrand DNA crosslinking agents.

- A.** Test of BIK mRNA interference. Total RNA extracts from EUFA450 (FA-C) or EUFA450R (reverted) cells stably transduced with a non-target shRNA construct (shRNA-NT) or a shRNA against BIK (shRNA-BIK) were analyzed by semiquantitative RT-PCR for the expression of BIK and other pro-apoptotic genes. A densitometric analysis of the BIK bands normalized to beta-2-microglobulin expression (B2M) is shown on the right panel.
- B.** XTT viability cell assay of EUFA450 cells stably transduced with a non-target shRNA construct (squares), the shRNA against BIK (diamonds) or untransduced (circles), in response to the indicated concentrations of cisplatin (CDDP) for 3 days.
- C.** The cell cycles of EUFA450 cells stably transduced with a non-target shRNA construct (shRNA-NT) or a shRNA against BIK (shRNA-BIK) were analyzed by cytometry after treatment with cisplatin $1\mu\text{M}$ or vehicle for 24 hours. The percentage of cells in the sub-G1 population, corresponding to cells undergoing apoptosis, is indicated.
- D.** EUFA450 cells stably transduced with a non-target shRNA (shRNA-NT) or a shRNA against BIK (shRNA-BIK) were exposed to cisplatin $0.33\mu\text{M}$ (grey bars), $1\mu\text{M}$ (black bars) or untreated (white bars) for 24 hours. Dead cells were stained with propidium iodide (PI) and analyzed in a cytometer. The graph represents the percentage of PI-stained cells after each treatment.

Figure 5: Elevated BIK mRNA basal levels in EUFA450 cells are not related to an increase in DNA damage signaling.

- A.** Semiquantitative RT-PCR analysis of the total RNA extracted from EUFA450 (FA-C) and EUFA450R (reverted) cells treated with $100\mu\text{M}$ N-acetyl-L-cystein (NAC), $5\mu\text{M}$ cisplatin (CDDP) or a combination of both.
- B.** EUFA450 and their reverted counterparts were incubated in the presence of increasing concentrations of N-acetyl-L-cystein (NAC) and its effect on BIK mRNA expression was analyzed by semiquantitative RT-PCR analysis. Beta-2-microglobulin (B2M) mRNA expression is shown as housekeeping control.
- C.** EUFA450 (circles) and EUFA450R (squares) cells were grown for three days in the presence of increasing concentrations of N-acetyl-L-cystein (NAC) and then their viability was measured using an XTT cell viability assay.
- D.** Effect of NAC on the sensitivity of EUFA450 cells to cisplatin. EUFA450 cells were incubated for three days in the presence or absence of NAC 1mM and exposed to increasing concentrations of cisplatin: $1\mu\text{M}$ (grey bars), $3.3\mu\text{M}$ (black bars) or left untreated (white bars). The graph shows the viability of the cells after each treatment as a percentage of the viability of cisplatin-untreated cells.
- E.** EUFA450 and EUFA450R LCLs were treated with different concentrations of the c-abl kinase inhibitor Imatinib and the total RNA extracted from the cells was analyzed for BIK, NOXA and PUMA mRNA expression by semiquantitative RT-PCR.

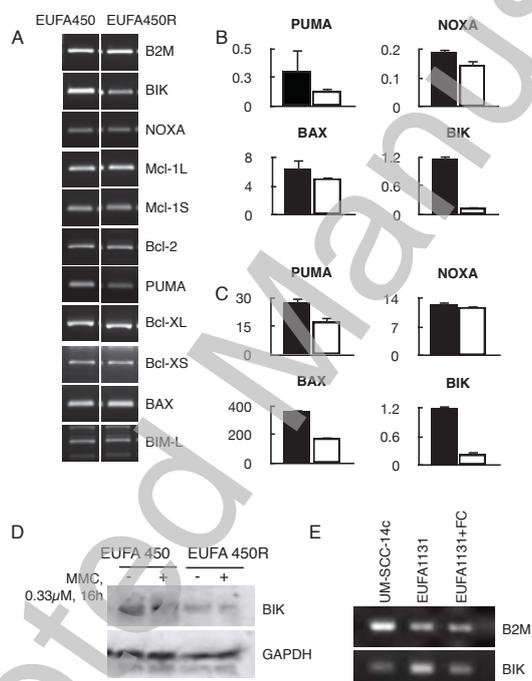
Figure 6: Decitabine induces BIK expression through its modulation of ΔNp73 , and sensitizes control LCLs to interstrand DNA crosslinking agents.

- A.** Semiquantitative RT-PCR analysis of total RNA extracted from EUFA450 or HSC536 LCLs or their corresponding corrected counterparts treated with the indicated doses of decitabine (DCB) and/or mitomycin C (MMC).
- B.** Luciferase analysis of 293T cells transfected either with BIK promoter between position -998 and +40 (BIK-998/+40) or the second promoter of p73 (P2p73) and cotransfected

with expression plasmids for p53 or Δ Np73. Luciferase units relative to a normalizing vector are depicted (RLU).

- C.** Luciferase analysis of a series of deletions of BIK promoter between position +40 and the indicated upstream position, cotransfected with a expression vector for Δ Np73 (black bars) or an empty vector (white bars). Relative luciferase units are depicted (RLU).
- D.** Methylation analysis of the second promoter of p73 in EUFA450 LCLs and their corrected counterparts. Genomic DNA extracted from these cells was digested with the methylation-sensitive restriction enzyme HpaII (H), the methylation-insensitive restriction enzyme MspI (M) or no enzyme (U) and the first kilobase region of the promoter was amplified using specific primers.
- E.** Decitabine sensitizes control LCLs to mitomycin C. HSC536 (FA-C, circles) and their wild type FANCC-transduced controls (squares) were treated with increasing concentrations of mitomycin C (MMC) in the absence (solid lines) or presence (dashed lines) of 10 μ M Decitabine. Viability was measured using a XTT cell viability assay.

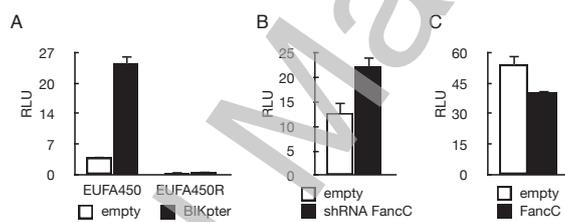
FIGURE 1



THIS IS NOT THE VERSION OF RECORD - see doi:10.1042/BJ20120327

Accepted Manuscript

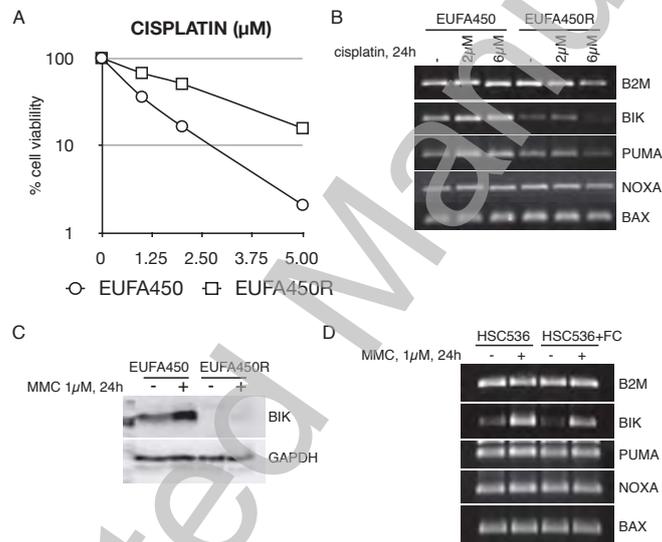
FIGURE 2



THIS IS NOT THE VERSION OF RECORD - see doi:10.1042/BJ20120327

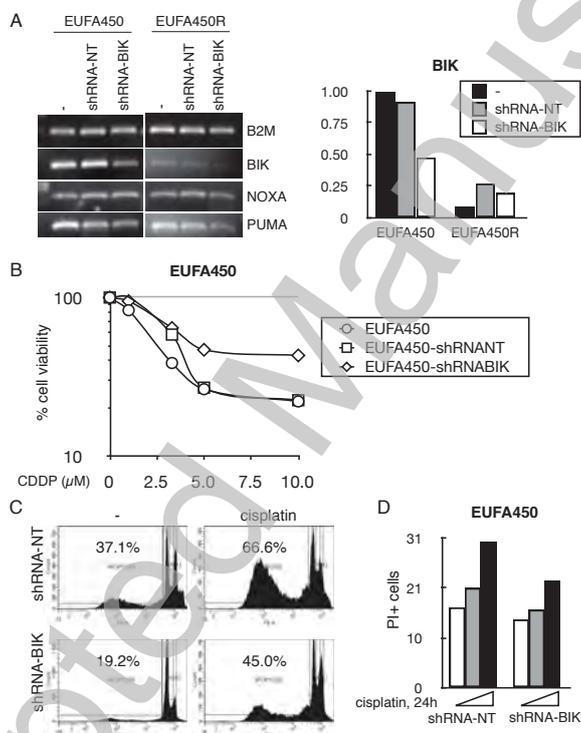
Accepted Manuscript

FIGURE 3



THIS IS NOT THE VERSION OF RECORD - see doi:10.1042/BJ20120327

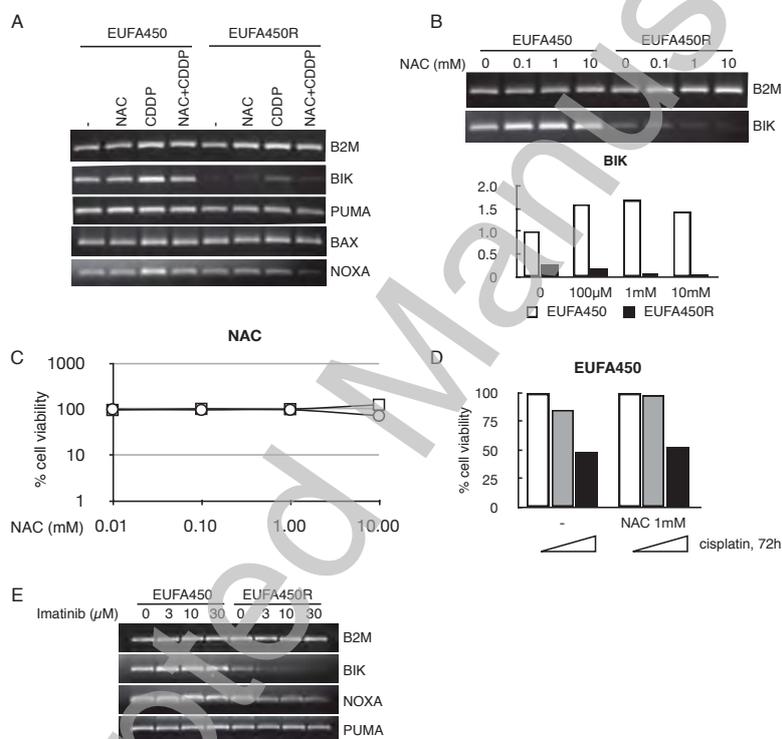
FIGURE 4



THIS IS NOT THE VERSION OF RECORD - see doi:10.1042/BJJ20120327

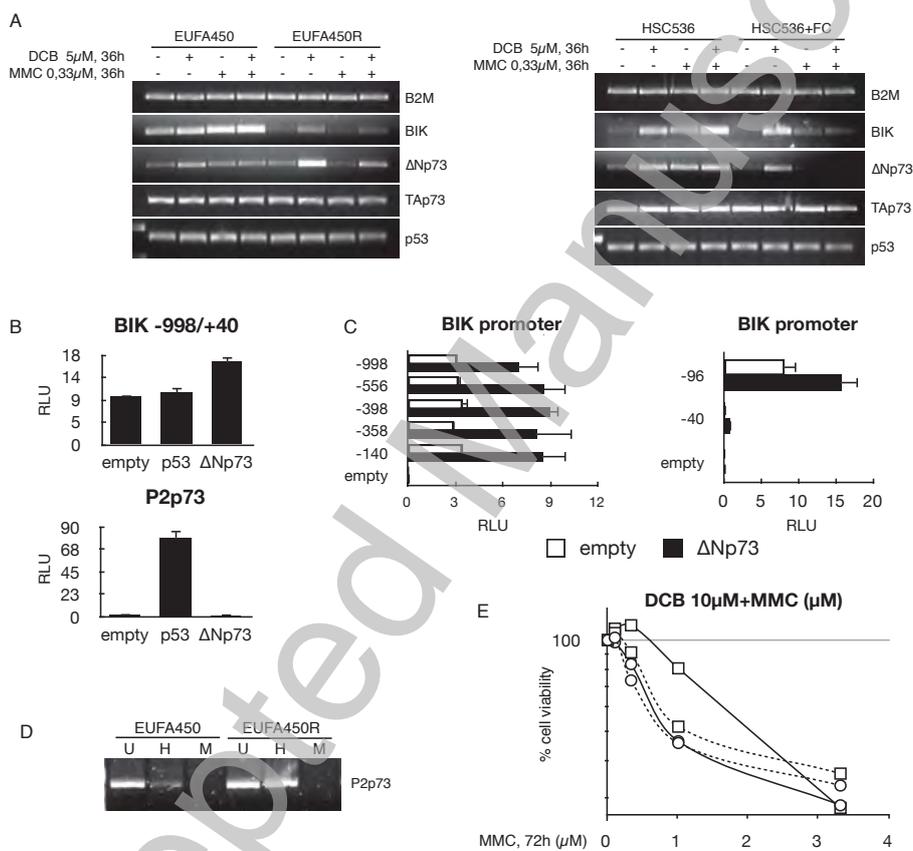
Accepted Manuscript

FIGURE 5



THIS IS NOT THE VERSION OF RECORD - see doi:10.1042/BJ20120327

FIGURE 6



THIS IS NOT THE VERSION OF RECORD - see doi:10.1042/BJJ20120327

Accepted Manuscript