

IV. DISCUSIÓN

La biología de la anemia de Fanconi, su implicación y relación con otras rutas, así como los aspectos clínicos, poblacionales y mutacionales de la enfermedad han adquirido una gran importancia en los últimos años. En este tiempo se han ido mejorando las terapias a seguir y los protocolos y tratamientos de trasplantes, se ha empezado a definir la ruta FA y sus componentes, las relaciones e interacciones entre los mismos y su papel en la respuesta global al daño celular.

Dentro de este trabajo de tesis doctoral se han llevado a cabo varios estudios, todos ellos con el nexo común de la FA, si bien una parte ha estado dedicada a la biología molecular de la FA y otra parte a la caracterización genética de los pacientes españoles. Esta segunda parte se ha desarrollado en el marco de una red nacional de investigación cooperativa sobre la anemia de Fanconi, en colaboración con otros grupos y hospitales españoles.

PARTE 1

1.1 Papel de la ruta FA y el remodelamiento de la cromatina

La estructura cromatínica juega un papel fundamental en varios procesos celulares como son la replicación, transcripción, reparación de lesiones, etc., ya que compromete el acceso al ADN de los componentes de la maquinaria celular encargada de estos procesos. Basta, como ejemplo, la sobradamente conocida vía de reparación acoplada a transcripción de los daños producidos por la luz UV.

Como se ha descrito anteriormente, algunas de las proteínas Fanconi interaccionan con factores que participan en el remodelamiento de la cromatina y en la transcripción. Con el propósito de estudiar el procesamiento de las lesiones en regiones de ADN altamente condensadas en un fondo FA, hemos analizado la inducción de roturas tras el tratamiento con DEB y MMC en la región heterocromática 1q12, en comparación con la tasa global de daño

genómico o el retraso en el ciclo celular en pacientes FA, en portadores y en controles sanos (**Artículo 1**). Para ello se ha utilizado la técnica de hibridación fluorescente multicolor *tandem labelling* para medir el daño en la región 1q12, el ensayo de micronúcleos para estimar el daño general en el genoma y el bloqueo de los cultivos con citocalasina-B para el estudio del ciclo celular.

Estos estudios han revelado que esta región heterocromática se ve igualmente afectada tras el tratamiento con mutágenos en pacientes FA, portadores y controles, a pesar de que el daño estimado de manera global es mucho más evidente y estadísticamente significativo en las células FA. Previamente ya se había descrito que el nivel de reparación en esta región es mucho menor comparado con el resto del genoma, producto de un bajo nivel de reparación por escisión (Surrallés et al., 1997), pero no se sabía nada acerca de la respuesta ante agentes inductores de ICLs. Por lo tanto, nuestros resultados demuestran claramente que la sensibilidad de esta región heterocromática a la acción de los ICLs es independiente de la ruta FA; es decir, la acción de la ruta FA está distribuida irregularmente a lo largo del genoma.

Así pues, parece razonable pensar que nuestra observación podría venir determinada por la íntima asociación de procesos celulares tales como la transcripción, la estructuración de la cromatina y la reparación, aunque son necesarios más estudios para comprobar que realmente éste es el caso de la ruta FA en el procesamiento de los ICLs. Una posible explicación podría estar relacionada con la participación de la histona H2AX en la ruta FA (ver más adelante).

1.2. La regulación de la ruta FA en respuesta al daño inducido por UV-C

La ruta FA es inducida o activada en respuesta a diversos agentes como MMC, rayos X o UV-C, tras lo cual FANCD2, proteína con un importante papel dentro de esta ruta debido a su conexión con otras rutas de reparación, se asocia a la cromatina en el sitio del daño junto con otros factores implicados en diversos procesos, tal y como se ha explicado en la introducción de esta memoria.

Con nuestro trabajo, se ha pretendido aumentar el conocimiento del papel de la ruta FA en respuesta al daño inducido de manera localizada por la radiación UV-C. Para ello, se han irradiado distintas líneas celulares con 20-60J/m² de luz UV-C, a través de filtros de policarbonato con poros de 5µm de diámetro para junto con un anticuerpo específico contra los dímeros de pirimidina que nos indica el sitio exacto donde se ha producido el daño, y así poder detectar las proteínas de interés en diferentes fondos genéticos.

Tal y como se detalla en el **anexo 1**, nuestra primera observación es la localización de FANCD2 en el sitio del daño, siguiendo una dinámica progresiva que alcanza un máximo de colocalización a las 6 horas después de la irradiación. Esta relocalización al sitio del daño es dependiente de la monoubiquitinación de FANCD2 en su lisina 561, ya que en fondos genéticos tales como FANCA *-/-*, BRCA1 *-/-*, FANCD2 K561R o ATR *-/-* no se aprecia. Además, a través de estudios de *western blot*, hemos demostrado que esta dinámica se desarrolla de forma paralela tanto a la monoubiquitinación como a la fosforilación de FANCD2 tras la irradiación. Sin embargo, según nuestros resultados, la monoubiquitinación de la proteína no es condición suficiente para su localización en el sitio dañado, sino que depende (como en el caso de otras proteínas tales como NBS1) de la presencia de la histona γ H2AX, implicada en la señalización de dobles roturas y que es sustrato de ATR (entre otras quinasas), en respuesta a la presencia de horquillas de replicación bloqueadas. El papel de esta proteína dentro de la ruta FA es posterior al de FANCD2 en lo que a su activación se refiere, ya que no es necesaria para su monoubiquitinación. En resumen, podríamos decir que la activación de FANCD2 por fosforilación y monoubiquitinación es una condición necesaria pero no suficiente para que esta proteína relocalice al sitio dañado. Otro hecho que vendría a reforzar la hipótesis de que la H2AX está de alguna manera implicada en la ruta FA es la demostrada sensibilidad de las células H2AX *-/-* a la MMC de forma similar a lo que ocurre en las células FA.

Los datos obtenidos en nuestro trabajo se pueden integrar en un modelo en el cual la irradiación con UV-C provoca el bloqueo de la horquilla de replicación debido a la aparición de dímeros de timina, lo cual activa ATR. A su vez, ATR fosforila tanto a FANCD2 como a la H2AX localizada en el lugar de la irradiación. Una vez fosforilada por ATR, FANCD2 se convierte en un sustrato

más asequible para la monoubiquitinación por parte del complejo FA con la ayuda de BRCA1. Tras esta activación, y siempre y cuando la histona se encuentre en su forma fosforilada, FANCD2 se dirige al sitio del daño junto con otros factores tales como BRCA2/FANCD1. Una vez los dímeros han sido reparados, ATR deja de activarse y, en consecuencia, la ruta FA vuelve a su estado inactivo.

Por lo tanto, las evidencias anteriormente expuestas podrían encajar con el hecho de que el gen *H2AX* sea en realidad uno de los genes FA. Para descartar esta posibilidad, y en colaboración con el grupo del Dr. Schindler (Univiversidad de Würzburg, Alemania), se procedió a secuenciar el gen y analizar por *western blot* la presencia o ausencia de proteína en 11 pacientes no asignados a ninguno de los grupos de complementación hasta ahora conocidos y que se obtuvieron tras el subtipaje de más de 450 pacientes entre España y Alemania. En ningún caso se observaron anomalías a nivel del gen o de la proteína por lo que, al menos en estos casos la proteína mutada podría ser FANCI o alguna otra no identificada hasta el momento.

1.3. Biología telomérica en FA

La disfunción telomérica causa inestabilidad cromosómica, defectos en el ciclo celular, baja capacidad proliferativa, muerte celular y envejecimiento prematuro. En diversas ocasiones, se ha asociado a enfermedades hematológicas y a otros síndromes que cursan con defectos en la reparación del ADN e inestabilidad cromosómica (**Artículo 2**) debido al papel dual en el mantenimiento telomérico y en la reparación del daño que juegan las proteínas implicadas. La mayor parte de estas características son inequívocamente rasgos de la FA por lo que parecería sensato analizar la biología de los telómeros en nuestra enfermedad de estudio.

Paralelamente a la realización de nuestro trabajo, otros autores habían observado un acortamiento telomérico en células FA con respecto a controles de edad similar (Leteurtre et al., 1999; Hanson, 2001).

Leteurtre y colaboradores utilizaron en su trabajo la técnica de TRF (*Telomere Restriction Fragment*), técnica que simultáneamente a las regiones terminales también detecta porciones de la secuencia subtelomérica. Además,

debido a las características particulares de este síndrome, el uso de la técnica de TRF hace que los resultados no sean del todo fiables. En individuos Fanconi, el recuento celular en sangre está muy alterado y se sabe que la longitud telomérica es muy variable entre los distintos linajes celulares sanguíneos (Weng et al., 1995; Rufer et al., 1998; Herrera et al., 1999), por lo que sería un factor a tener en cuenta si las mediciones se realizan en sangre completa sin seleccionar ningún tipo celular concreto. Además, la elevada frecuencia de deleciones que se producen en las células de los pacientes FA (Laquerbe et al., 1995, 1999) puede afectar a las regiones subteloméricas, lo cual haría que se acortaran los TRF aunque la longitud del telómero haya permanecido invariable.

Por lo tanto, nos planteamos el análisis detallado de la longitud telomérica mediante Q-FISH (técnica con la cual se detecta específicamente el telómero y se puede estimar su longitud evitando las regiones subteloméricas) en linfocitos T de sangre periférica de un número de pacientes FA y los correspondientes controles de la misma edad.

Con nuestro trabajo se corroboró, por una parte, que existe un acortamiento telomérico en FA de unas 0,68 Kb con respecto a los correspondientes controles, de manera concurrente en ambos brazos de los cromosomas, lo cual, por otro lado, legitima la técnica empleada. Este acortamiento no es tan elevado como el observado en el trabajo de Leteurtre, debido seguramente a diferencias en las técnicas empleadas.

Como se explica en el **artículo 3**, no sólo se comprobó que los telómeros de los individuos FA tienen una menor longitud, sino que además, de manera similar a lo que ocurre en células de ratón y en células humanas ATM-/- (Metcalf et al., 1996; Hande et al., 2001), en las células FA hay un nivel significativamente más elevado de repeticiones TTAGGG extrateloméricas (tanto extracromosómicas como intracromosómicas). Para aclarar el origen o las causas de este acortamiento telomérico, se estudiaron el exceso de señales teloméricas por célula en las mismas preparaciones. El resultado que se obtuvo fue que en células FA había una media de $6,60 \pm 0,9$ señales teloméricas en exceso frente a las $2,36 \pm 0,5$ señales en exceso que se contabilizaron en las células control. Esto nos llevó a concluir que los telómeros son muy sensibles a las roturas, aunque de manera paralela ocurre un desgaste telomérico debido

al acortamiento replicativo acelerado, como nos señala el hecho de que la misma tasa de acortamiento aparezca en ambos brazos del cromosoma. La similitud entre FA y AT en lo que al fenotipo telomérico respecta es otra evidencia más de la relación subyacente que existe entre estos síndromes cuyas rutas se entrecruzan, tal como se ha explicado en la introducción.

Las bases moleculares que explican esta presencia de repeticiones teloméricas extracromosómicas se desconocen, aunque podrían estar implicados fenómenos como la replicación, la reparación defectuosa y la rotura telomérica. De hecho, se ha publicado que existe una acumulación de roturas en los telómeros de células humanas *in vitro* (Von Zglinicki et al., 2000a) y que la reparación en estas zonas del cromosoma es defectiva (Kruk et al., 1995; Lansdorp, 2000). Además, también se sabe que existe un efecto del estrés oxidativo en la regulación de la longitud telomérica (Von Zglinicki, 2000b). Se ha demostrado que el estrés oxidativo causa un daño específico en las secuencias GGG teloméricas y la consiguiente inducción de 8-OxodG podría ser una causa de aceleración del acortamiento telomérico (Oikawa et al., 1999; Von Zglinicki et al., 2000a). De acuerdo con esto, se sabe que las células FA tienen alterada la respuesta frente al estrés oxidativo (Joenje et al., 1981) dando como resultado un elevado nivel de 8-OxodG (Degan et al., 1995). Si a todos estos datos le añadimos el hallazgo de la elevada frecuencia de señales TTAGGG extrateloméricas y el exceso de señales teloméricas en pacientes Fanconi, parecería obvio pensar que el mecanismo que actuaría provocando el acortamiento de los telómeros *in vivo* en estos individuos sería la acumulación de roturas deletéreas en los telómeros. Reciente se ha publicado un fenómeno mediado por HR y que provoca la escisión del *T-loop* telomérico, lo cual provoca una disminución en la longitud telomérica global con un incremento en la frecuencia de señales extrateloméricas (Wang et al., 2004). Podría ser que un defecto en este mecanismo de reparación en las células FA sea el causante del acortamiento observado. Ambos fenómenos actuarían independientemente del problema de la replicación terminal en la cadena discontinua del ADN ya que el ADN extratelomérico se observa en linfocitos T diferenciados, mientras que el acortamiento mediado por replicación ocurre principalmente durante la proliferación de las células madre de la médula ósea y ocurre de manera concurrente en ambos brazos del cromosoma.

Otra de las funciones esenciales de los telómeros es la protección de los cromosomas frente a la degradación y la fusión con otros cromosomas con el fin de mantener el genoma en su estado intacto. Para mantener la integridad telomérica, varias proteínas entre las que destaca TRF2 se unen a estos extremos. La elevada frecuencia de fusiones terminales hallada en FA, nos indica que ha habido una pérdida de función del telómero, pero este fenómeno ocurre de forma independiente a la unión de TRF2, por lo que podría tratarse de un efecto secundario, consecuencia de la elevada fragilidad espontánea observada en individuos Fanconi, ya que el aumento relativo de roturas es similar al de fusiones terminales.

En el **artículo 4** presentado en esta tesis se evaluaron, entre otros parámetros, la posible relación entre el acortamiento telomérico y la severidad hematológica, las anomalías cromosómicas numéricas y la fragilidad cromosómica espontánea observada en pacientes FA. En ninguno de los casos se ha visto que haya correlación alguna. Sin embargo, en el trabajo de Leteurtre y colaboradores, se describió la existencia de relación entre el acortamiento telomérico y la severidad hematológica. Hay que tener en cuenta que este resultado podría ser poco fiable debido a que la técnica empleada, como ya se ha comentado anteriormente, no discrimina entre tipos celulares y en FA la longitud telomérica es muy variable entre estos tipos. Una relación entre la longitud telomérica y alteraciones cromosómicas numéricas se había observado en ratones ATM^{-/-} (Hande et al., 2001), pero hay que tener en cuenta que la erosión telomérica que tiene lugar en los modelos murinos es mucho más espectacular que en células humanas y las consecuencias derivadas de ello mucho más evidentes.

Como se ha mencionado en la introducción de esta memoria, en ausencia de telomerasa los telómeros pueden ser mantenidos por recombinación, a través de un mecanismo en el que, entre otras proteínas, está implicada RAD51. Una parte de las células pertenecientes a estas líneas ALT, contienen APBs, estructuras compuestas por varias proteínas con un conocido papel en recombinación, reparación y mantenimiento a nivel del telómero. Entre estas proteínas podemos encontrar BLM, NBS, TRF1, TRF2, RAD51, pRB, etc.

Teniendo en cuenta la evidente interrelación de la ruta FA con algunas de estas proteínas en diversos procesos, estudiamos el posible papel de

FANCD2 en el mantenimiento telomérico de las células que mantienen los telómeros mediante el mecanismo alternativo. Para ello, analizamos por inmunohistoquímica la colocalización de FANCD2 con TRF2, PML o TRF1 en células ALT y en células telomerasa+/+ y, tal y como se puede observar en las imágenes del **anexo 2**, existe una clara colocalización de FANCD2 con estos marcadores teloméricos en unas estructuras típicas y definidas y que se corresponden con APBs. Esta colocalización es exclusiva de las células ALT y se debe al mecanismo de mantenimiento telomérico que opera en ellas y no a un efecto de la transformación, ya que tampoco lo hemos observado en fibroblastos primarios. Además, y de acuerdo con la literatura especializada, la presencia de estas estructuras es mucho más elevada durante la fase G2 del ciclo celular, lo cual es coherente con su función en el mantenimiento telomérico por recombinación. Esta asociación proteica no es arbitraria sino que ambas proteínas interactúan físicamente, como se desprende de los resultados de la coinmunoprecipitación de FANCD2 con TRF2. Para evaluar si la asociación telomérica de FANCD2 depende en realidad de la interacción con TRF2, tal como ocurre en el caso de BLM, en estos momentos estamos realizando en colaboración con el grupo de la Dra. María Blasco (CNIO) un estudio basado en la técnica de siRNA. El propósito es inhibir la expresión de TRF2 en células ALT y, en estas condiciones, evaluar la asociación de FANCD2 a los APBs para establecer las posibles diferencias que podrían existir con respecto a células ALT que poseen una expresión normal de TRF2.

1.3. Relación entre alteraciones cromosómicas numéricas y fragilidad en FA

La monosomía del cromosoma 7 es un rasgo que frecuentemente se observa en muestras de médula ósea de pacientes FA y que está relacionado con un mal pronóstico de la enfermedad (Thurston et al., 1999). Mediante FISH interfásico procedimos al estudio de la presencia de aneuploidía del cromosoma 7, de manera paralela al cromosoma 8 como control interno en muestras de sangre de pacientes FA. En estas mismas muestras, se evaluó la fragilidad cromosómica espontánea y la severidad hematológica en un intento de correlacionar estos factores (**Artículo 4**).

El estudio de las alteraciones numéricas evidenció que no existían diferencias significativas entre FA y controles y tampoco se pudieron correlacionar las diferencias interindividuales con ninguna de las otras variables bajo control, por lo que no parece que exista relación alguna entre los niveles de monosomía en sangre periférica y la severidad hematológica de la enfermedad.

Sin embargo, sí que se encontró una correlación positiva entre las aberraciones cromosómicas espontáneas y la severidad de las variables hematológicas. Este hecho preliminar, corroborado con estudios más amplios y sobre una población de mayor tamaño nos podría llevar a considerar este parámetro como una herramienta con cierto valor pronóstico. En este sentido, la red FA constituye un marco ideal para la continuidad de este trabajo.

PARTE 2

2.1. Análisis de la población Fanconi española

La FA es una enfermedad sobre la cual existen diversas revisiones así como estudios clínicos y poblacionales basados en pacientes de diversos países, sobre todo provenientes de Norteamérica. En el marco de la red Fanconi española, se planteó la posibilidad de desarrollar un estudio detallado y a gran escala en colaboración con distintos centros sobre la población FA española.

Se ha obtenido material de unos cien pacientes afectados de FA o niños con evidencias clínicas de FA con el que se ha creado un biobanco de ADN y de líneas celulares linfoblastoides (LCL). También se ha corroborado el diagnóstico de FA con el test de DEB y, en el laboratorio del Dr. Juan A. Bueren (CIEMAT) se ha realizado el subtipaje genético mediante transfección retroviral.

La principal evidencia que se desprende de este estudio es que la población FA española es altamente heterogénea en diversos aspectos: la mayoría de grupos de complementación descritos hasta ahora se encuentran representados en esta población. Además, a nivel citogenética, es patente la variabilidad interindividual, como se observa en la tabla del **anexo 3** en la que

se muestran los pacientes evaluados a nivel citogenético con el test de DEB. La implicación de esta variabilidad se desconoce, pero como se ha sugerido anteriormente, y aunque sean resultados preliminares, podría estar directamente correlacionada con la evolución de la enfermedad hematológica.

Como cabe esperar, al tratarse de una enfermedad de origen autosómico (al menos en más del 99% de los casos), el porcentaje de hombres y mujeres afectados en nuestra población es del 51% y 49% respectivamente. Asimismo, observamos una prevalencia de pacientes mosaico de un 20% aproximadamente, valor similar al que repetidamente se ha publicado como habitual en la población FA.

Como se demuestra gráficamente en la segunda parte del anexo 3, el análisis citogenético de las muestras es una herramienta perfectamente válida para poder distinguir entre los pacientes FA clásicos y los que presentan algún grado de mosaicismo, así como los individuos sanos. En el primer caso, ya se observa de manera espontánea un grupo de células con más de una aberración cromosómica (AC). Este porcentaje aumenta drásticamente cuando tratamos con DEB, hasta observar más de 5 AC por célula aberrante, con un total de más del 70% de células aberrantes. En el caso de los pacientes mosaico, aunque el número de AC tras el tratamiento con el mutágeno también aumenta mucho con respecto al control sin DEB, se limitan a algo más del 20% de las células del cultivo. En el caso de los individuos sanos, apenas hay células dañadas, tanto con DEB o sin DEB, y en estas células no suele haber más de una AC.

Entre los pacientes evaluados, existen casos que merece la pena destacar por el proceso que se ha llevado a cabo para la concreción del origen de la enfermedad en los mismos. Estos casos están detallados en el **anexo 4**. Para todos ellos, no ha sido posible corregir el fenotipo celular con los retrovirus portadores de los genes *FANCA*, *C*, *G*, *E* y *F*, con lo que el paso siguiente fue el de comprobar por *western blot* la presencia o ausencia de FANCD2 o su forma activa a partir de las LCL. En dos de los 5 casos estudiados, se trata de pacientes pertenecientes al grupo de complementación FA-D2, lo cual quedó patente tras comprobar la ausencia de proteína y la posterior secuenciación. En los otros tres casos, fuimos capaces de mostrar la proteína FANCD2 intacta y monoubiquitinada, lo cual descarta la presencia de

mutaciones en cualquiera de las proteínas del complejo FA. La enfermedad podría estar causada, pues, por mutaciones en *BRCA2(FANCD1)*, *FANCI* o algún otro gen, todavía sin describir, cuyo producto actúa en la ruta por debajo de *FANCD2*. En el caso del paciente FA 62 se recopilaron los datos del historial clínico, tanto del paciente (fallecido de tumor de Wilms) como de familiares, y se evidenció la elevada frecuencia de tumores en esta familia, uno de ellos con cáncer de mama bilateral, lo cual es típico de mutaciones en el gen de susceptibilidad al cáncer de pecho *BRCA2(FANCD1)*. Otra prueba a la que se sometieron estas células fue el análisis de la presencia de focos de RAD51 tras el tratamiento con MMC. Se sabe que, en ausencia de *BRCA2*, la formación de estos cúmulos de proteína está severamente afectada. Como era de esperar, tras el tratamiento con dicho mutágeno, no se observa un aumento en el número de focos. El análisis definitivo se realizó por *western blot* y evidenció la ausencia de esta proteína en dicho paciente. Tras varios estudios de secuenciación, actualmente se sabe que este paciente es portador de dos deleciones en dos regiones adyacentes. Este hallazgo es importante no sólo a nivel del paciente y para el caso de una futura selección de embriones, sino también para la familia debido a las fatales consecuencias que conlleva el ser portador de una mutación en este gen, ya que predispone a un elevado riesgo de padecer cáncer de mama y de ovario.

En último lugar, se detectaron dos pacientes de un grupo de complementación distinto a FA-A, -C, -G, -E, -F y que, como se comprobó por *western blot*, mantienen la proteína *FANCD2* y su monoubiquitinación intacta. En estos casos, no había antecedentes familiares de cáncer asociado a *BRCA2* y se descartó la posibilidad de que portaran mutaciones en este gen, tanto por *western blot* como por el análisis de focos de RAD51. Por lo tanto, nos podríamos encontrar ante pacientes pertenecientes al grupo de complementación FA-J o a un nuevo grupo de complementación, pero serán necesarios más estudios (ya iniciados) antes de poder llegar a una conclusión definitiva.

2.2. Análisis mutacional de pacientes FANCA españoles

De entre los 11 genes causantes de FA descritos hasta el momento, el gen *FANCA* es el más frecuente entre la población afectada, y se estima que provoca un 65% del total de los casos según el registro norteamericano de la enfermedad (Kutler et al., 2003). Sin embargo, este porcentaje varía según la población de estudio y en España se calcula que alrededor del 85% de los casos pertenecen a este grupo de complementación (Casado et al., 2001).

El análisis mutacional de estos pacientes es de indudable interés ante todo para las familias afectadas y, principalmente, en los casos en que se desea tener un nuevo hijo libre de la enfermedad, pero esta tarea es muy complicada debido al heterogéneo espectro de mutaciones descritas en el gen *FANCA* y a que, dentro de estas mutaciones, podemos encontrar de todos los tipos posibles. Una proporción importante corresponde a grandes deleciones, difícilmente detectables por técnicas convencionales, y originadas debido a que *FANCA* es un gen rico en secuencias *Alu* que recombinan entre ellas produciendo la deleción de estos fragmentos grandes.

Dentro del marco de la red Fanconi, y con las muestras recogidas hasta el momento, se pretende caracterizar clínica y mutacionalmente a estos pacientes, creando una base de datos con la información más relevante de cada uno de ellos. Una vez subtipados un número determinado de pacientes, se tomaron aquellos que pertenecían al grupo de complementación FA-A y se analizaron 25 de ellos mediante una PCR múltiple cuantitativa y fluorescente, siguiendo la metodología propuesta en el trabajo de (Morgan et al., 1999) con pequeñas modificaciones, tal como describimos en el **artículo 5**. Aplicando esta técnica hemos comprobado que aproximadamente un 30% de los pacientes FANCA españoles son portadores en heterocigosis de una gran deleción, lo que concuerda con resultados encontrados en otras poblaciones. De todas formas, este porcentaje podría ser algo mayor si tenemos en cuenta que con los cebadores utilizados quedan áreas del genoma sin cubrir y que podrían estar igualmente afectadas por deleciones. Aun así, podemos concluir en la idoneidad de este método para la detección de este tipo de mutaciones que pueden afectar a otros genes causantes de otras enfermedades, tanto en el diagnóstico de enfermos, de portadores y en análisis prenatal o postnatal. La

heterogeneidad de las características de la población Fanconi española queda también patente tras este análisis, donde se ve que el espectro de mutaciones en FANCA es muy variado (**Anexo 5**).

2.3. La población FA gitana española: la mayor frecuencia de portadores del mundo

Una vez obtenido un número elevado de muestras FA, se vio que gran parte de ellas pertenecían a pacientes de etnia gitana. Mientras que en España se calcula que la población gitana es un 1% del total, cerca de un 25% de los pacientes FA registrados son miembros de esta etnia. Así pues, consideramos que sería de interés un análisis más detallado de estas muestras y se procedió al subtipaje y posterior secuenciación del gen implicado en la enfermedad, que resultó ser *FANCA* en todos los casos.

Los detalles de este trabajo aparecen descritos en el **artículo 6** presentado en esta tesis doctoral. Después del análisis de 9 pacientes FA gitanos de distintas áreas geográficas de todo el país, los resultados obtenidos nos permiten extrapolar que toda la población gitana FA española comparte la misma mutación, una mutación puntual no descrita hasta el momento y que provoca la aparición de un codón *stop* a nivel del exón 4 (y, por tanto, una proteína truncada). Este resultado se ha corroborado mediante análisis por *western blot*, tanto de la proteína FANCD2 de la cual sólo aparecía una de sus dos isoformas, como del extremo C-terminal de FANCA, que no da señal alguna.

Esta mutación, no sólo es común a todos los gitanos FA españoles, sino que es exclusiva de esta población, ya que se realizó una extensa búsqueda de otros pacientes gitanos en las bases de datos de toda Europa y Estados Unidos, siguiendo la ruta migracional de los gitanos desde la India, y de las pocas muestras registradas, ninguna de ellas es portadora de la mutación en cuestión. Tampoco otros pacientes FA españoles no gitanos o individuos sanos son portadores de esta mutación y todos los portadores obligados la portan en heterocigosis. Esto refuerza la hipótesis de un efecto fundador como origen de esta mutación en España cuando, a partir de principios del siglo XV, se tiene constancia por primera vez de la presencia de gitanos en nuestro país. Para

reafirmar este punto, se llevó a cabo el análisis de haplotipos utilizando para ellos varios microsátélites altamente polimórficos que flanquean el gen *FANCA*. Todos los pacientes gitanos españoles (entre los que se encuentra uno de origen portugués), comparten el mismo haplotipo, el cual es claramente distinguible del haplotipo de otros pacientes gitanos extranjeros o individuos sanos. Este dato indica que todos estos pacientes comparten un ancestro común y que por consanguinidad se ha ido manteniendo esta mutación entre la población a lo largo del tiempo.

La frecuencia de portadores de esta mutación entre la población gitana se ha estimado que oscila entre 1/65 y 1/70 habitantes, lo cual la convierte en la población con mayor frecuencia de portadores de mutaciones en un gen *FA* del mundo. Hasta ahora, las poblaciones de judíos Ashkenazi y Afrikaner de Sudáfrica eran las poblaciones con mayor frecuencia de portadores, 1/90 y 1/77 respectivamente (Whitney et al., 1993, Tipping et al., 2001).

Así pues, las características de la etnia gitana española la hacen una población ideal como modelo para el estudio de otras enfermedades genéticas o para el análisis del papel que tiene esta mutación en heterocigosis en distintos cánceres. El hecho de compartir esta mutación también supone una ventaja y facilita la tarea a la hora de analizar la presencia de portadores en las familias o del diagnóstico prenatal y preimplantacional en familias afectadas.

V. CONCLUSIONES

De los resultados presentados y la discusión de los mismos se derivan las siguientes conclusiones:

1. La ruta FA distribuye su función de manera desigual en el genoma en función de la estructura de la cromatina.
2. De manera similar a la respuesta frente a la MMC, la ruta FA participa en el proceso de reconocimiento/ reparación de las lesiones producidas por UV-C, de manera supeditada a la activación de FANCD2 por parte del complejo FA. En esta ruta es igualmente esencial la activación de la histona H2AX.
3. Los individuos FA presentan un acortamiento telomérico acelerado mediado tanto por un exceso de acortamiento replicativo como por un exceso de roturas en la secuencia telomérica.
4. Las fusiones terminales en los cromosomas observadas en pacientes FA ocurren de manera independiente a la proteína TRF2, de protección del telómero.
5. La proteína FANCD2 se une al telómero de las células ALT preferentemente durante la fase G2 del ciclo celular e interacciona con TRF2, lo que sugiere un papel de la ruta FA en el mantenimiento telomérico por recombinación en ausencia de telomerasa.
6. Con las técnicas empleadas en este trabajo, no se ha visto que exista ninguna correlación entre el fenotipo telomérico, las anomalías cromosómicas numéricas y la severidad hematológica de la enfermedad. Si que existe, en cambio, una correlación positiva entre la severidad hematológica y la frecuencia espontánea de aberraciones cromosómicas.

7. La población FA española es genéticamente muy heterogénea, habiendo pacientes de varios grupos de complementación, así como diversas mutaciones dentro de gen *FANCA*.
8. Aproximadamente un 30% de los pacientes españoles del grupo de complementación FA-A son portadores en heterocigosis de grandes deleciones en el gen *FANCA*.
9. Los pacientes FA españoles de etnia gitana presentan la mayor frecuencia de portadores de mutación en el gen *FANCA* descrita hasta ahora. En todos los casos, y de manera exclusiva de esta población, se observa una misma mutación fundadora ancestral, no descrita hasta ahora. Se trata de una mutación puntual que determina un codon *stop* a nivel del exón 4, que trunca la proteína *FANCA* y en consecuencia interrumpe la ruta FA.

BIBLIOGRAFÍA

- Abraham RT. Cell cycle checkpoint signalling through the ATM and ATR kinases. *Genes Dev.* 15, 2177-2196 (2001)
- Akkari YM, Bateman RL, Reifsteck CA, D'Andrea AD, Olson SB, Grompe M. The 4N cell cycle delay in Fanconi anemia reflects growth arrest in late S phase. *Mol. Genet. Metab.* 74, 403-412 (2001)
- Allsopp RC, Vaziri H, Patterson C, Goldstein S, Younglai EV, Futcher AB, Greider CW, Harley CB. Telomere length predicts replicative capacity of human fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89, 10114-10118 (1992)
- Andreassen PR, D'Andrea AD, Taniguchi T. ATR couples FANCD2 monoubiquitination to the DNA-damage response. *Genes Dev.* 18, 1958-1963 (2004)
- Auerbach AD, Buchwald M, Joenje H, Volgestein B, Kinzler KW (eds): *The Genetic Basis of Human Cancer.* McGraw-Hill, New York, 317 (1993)
- Auerbach AD. A test for Fanconi's anemia. *Blood* 72, 366-367 (1988)
- Balajee AS, Bohr VA. Genomic heterogeneity of nucleotide excision repair. *Gene* 250, 15-30 (2000)
- Ball SE, Gibson FM, Rizzo S, Tooze JA, Marsh JC, Gordon-Smith EC. Progressive telomere shortening in aplastic anemia. *Blood.* 91, 3582-3592 (1998)
- Barnes DE. Non-homologous end joining as a mechanism of DNA repair. *Curr. Biol.* 11, R455-457 (2001)
- Barzilai A, Rotman G, Shiloh Y. ATM deficiency and oxidative stress: a new dimension of defective response to DNA damage. *DNA Repair* 1, 3-25 (2002)
- Bernardi R, Scaglioni PP, Bergmann S, Horn HF, Vousden KH, Pandolfi PP. PML regulates p53 stability by sequestering Mdm2 to the nucleolus. *Nat. Cell Biol.* 6, 665-722 (2004)
- Blackburn EH. Structure and function of telomeres. *Nature* 350: 569-573 (1991)
- Blasco MA. Telomeres in cancer therapy. *J. Biomed. Biotechnol.* 1, 3-4 (2001)

- Bobabilla-Morales L, Corona-Rivera A, Corona-Rivera JR, Buenrostro C, Garcia-Cobian TA, Corona-Rivera E, Cantu-Garza JM, Garcia-Cruz D. Chromosome instability induced in vitro with mitomycin C in five Seckel syndrome patients. *Am. J. Med. Genet.* 123A, 148-152 (2003)
- Bochar DA, Wang L, Beniya H, Kinev A, Xue Y, Lane WS, Wang W, Kashanchi F, Shiekhattar R. BRCA1 is associated with a human SWI/SNF-related complex: linking chromatin remodeling to breast cancer. *Cell* 102, 257-265 (2000)
- Bohr VA, Brosh RM Jr, von Kobbe C, Opresko P, Karmakar P. Pathways defective in the human premature aging disease Werner syndrome. *Biogerontology* 3, 89-94 (2002)
- Bootsma D, Kreaemer HH, Cleaver JE, Hoeijmakers JHJ. Nucleotide excision repair syndromes: xeroderma pigmentosum, Cockayne syndrome, and trichothiodystrophy. In *The Genetic Basis of Human Cancer*, B. Vogelstein and K.W.Kinzler, eds. (New York: McGraw-Hill) 245-274 (1998)
- Broccoli D, Smogorzewska A, Chong L, de Lange T. Human telomeres contain two distinct Myb-related proteins, TRF1 and TRF2. *Nat. Genet.* 17, 231-235 (1997)
- Brown EJ, Baltimore D. ATR disruption leads to chromosomal fragmentation and early embryonic lethality. *Genes Dev.* 14, 397-402 (2000)
- Bryan TM, Englezou A, Gupta J, Bacchetti S, Reddel RR. Telomere elongation in immortal human cells without detectable telomerase activity *EMBO J.* 14, 4240-4248 (1995)
- Bryan TM, Englezou A, Dalla-Pozza L, Dunham MA, Reddel RR. Evidence for an alternative mechanism for maintaining telomere length in human tumors and tumor-derived cell lines. *Nat. Med.* 3, 1271-1274 (1997b)
- Bryan TM, Marusic L, Bacchetti S, Namba M, Reddel RR. The telomere lengthening mechanism in telomerase-negative immortal human cells do not involve the telomerase RNA subunit. *Hum. Mol. Genet.* 6, 921-926 (1997a)
- Caldecott KW. Protein-protein interactions during mammalian DNA single-strand break repair. *Biochem. Soc. Trans.* 31, 247-251 (2001)
- Callén E, Samper E, Ramírez MJ, Creus A, Marcos R, Ortega JJ, Olivé T, Badell I, Blasco MA, Surrallés J. Breaks at telomeres and TRF2-

- independent end fusions in Fanconi anemia. *Hum. Mol. Genet.* 11, 439-444 (2002)
- Callén E, Surrallés J. Telomere dysfunction in genome instability syndromes. *Mutat Res.* 567, 85-104 (2004)
- Callén E, Tischkowitz MD, Creus A, Marcos R, Bueren JA, Casado JA, Mathew CG, Surrallés J. Quantitative PCR analysis reveals a high incidence of large intragenic deletions in the FANCA gene in Spanish Fanconi anemia patients. *Cytogenet. Genome Res.* 104, 341-345 (2004)
- Carney JP, Maser RS, Olivares H, Davis EM, Le Beau M, Yates JR 3rd, Hays L, Morgan WF, Petrini JH. The hMre11/hRad50 protein complex and Nijmegen breakage syndrome: linkage of double-strand break repair to the cellular DNA damage response, *Cell* 93, 477-486 (1998)
- Casado JA, Segovia JC, Lamana M, Lozano ML, Callén E, Surrallés J, Lobitz S, Hanenberg H, Bueren JA. Subtyping of Fanconi Anemia patients from Spain using the retroviral complementation assay. *Fanconi Anemia Research Fund Symposium, Abstract Book, Portland, Oregon* (2001).
- Chan SR., Blackburn EH, Telomeres and telomerase. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. Biol. Sci.* 359, 109-121 (2004)
- Charames GS, Bapat B. Genomic instability and cancer *Curr. Mol. Med.* 3, 589-96 (2003)
- Chen PL, Chen CF, Chen Y, Xiao J, Sharp ZD, Lee WH. The BRC repeats in BRCA2 are critical for RAD51 binding and resistance to methyl methanesulfonate treatment *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95, 5287-5292 (1998)
- Counter CM, Avilion AA, LeFeuvre CE, Stewart NG, Greider CW, Harley CB, Bacchetti S. Telomere shortening associated with chromosome instability is arrested in immortal cells which express telomerase activity, *EMBO J.* 11, 1921-1929 (1992)
- Counter CM, Gupta J, Harley CB, Leber B, Bacchetti S. Telomerase activity in normal leukocytes and in hematologic malignancies. *Blood* 85, 2315-2320 (1995)
- Critchlow SE, Bowater RP, Jackson SP. Mammalian DNA double-strand break repair protein XRCC4 interacts with DNA ligase IV. *Curr. Biol.* 7, 588-598 (1997)

- D'Andrea AD. The Fanconi road to cancer. *Genes Dev.* 17, 1933-1936 (2003)
- d'Adda di Fagagna F, Hande MP, Tong WM, Roth D, Lansdorp PM, Wang ZQ, Jackson SP. Effects of DNA nonhomologous end-joining factors on telomere length and chromosomal stability in mammalian cells. *Curr. Biol.* 11, 1192-1196 (2001)
- Davalos AR, Campisi J. Bloom syndrome cells undergo p53-dependent apoptosis and delayed assembly of BRCA1 and NBS1 repair complexes at stalled replication forks. *J. Cell Biol.* 162, 1197-1209 (2003)
- de Lange T. Protection of mammalian telomeres. *Oncogene* 21, 532-540 (2002)
- de Winter JP, Waisfisz Q, Rooimans MA, van Berkel CG, Bosnoyan-Collins L, Alon N, Carreau M, Bender O, Demuth I, Schindler D, Pronk JC, Arwert F, Hoehn H, Digweed M, Buchwald M, Joenje H. The Fanconi anaemia group G gene FANCG is identical with XRCC9. *Nat. Genet.* 20, 281-283 (1998)
- Degan P, Bonassi S, De Caterina M, Korkina LG, Pinto L, Scopacasa F, Zatterale A, Calzone R, Pagano G. In vivo accumulation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in DNA correlates with release of reactive oxygen species in Fanconi's anaemia families. *Carcinogenesis* 16, 735-41 (1995)
- Digweed M, Reis A, Sperling K. Nijmegen breakage syndrome: consequences of defective DNA double strand break repair. *Bioessays* 21, 649-656 (1999)
- Dronkert ML, Kanaar R. Repair of DNA interstrand cross-links. *Mutat. Res.* 486, 217-247 (2001)
- Dudas A, Chovanec M. DNA double-strand break repair by homologous recombination *Mutat. Res.* 566, 131-167 (2004)
- Dunham MA, Neumann AA, Fasching CL, Reddel RR. Telomere maintenance by recombination in human cells. *Nat. Genet.* 26, 447-450 (2000)
- Dutertre S, Ababou M, Onclercq R, Delic J, Chatton B, Jaulin C, Amor-Gueret M. Cell cycle regulation of the endogenous wild type Bloom's syndrome DNA helicase. *Oncogene* 19, 2731-2738 (2000)
- Dutrillaux B, Aurias A, Dutrillaux AM, Buriot D, Prieur M. The cell cycle of lymphocytes in Fanconi anemia. *Hum. Genet.* 62, 327-332 (1982)
- Elledge SJ. Cell cycle checkpoints: preventing an identity crisis. *Science* 274, 1664-1672 (1996)

- Ellis NA, Groden J, Ye TZ, Straughen J, Lennon DJ, Ciocchi S, Proytcheva M, German J. The Bloom's syndrome gene product is homologous to RecQ helicases. *Cell* 83, 655-666 (1995)
- Espejel S, Franco S, Rodriguez-Perales S, Bouffler SD, Cigudosa JC, Blasco MA. Mammalian Ku86 mediates chromosomal fusions and apoptosis caused by critically short telomeres. *EMBO J.* 21, 2207-2219 (2002a)
- Espejel S, Franco S, Sgura A, Gae D, Bailey SM, Taccioli GE, Blasco MA. Functional interaction between DNA-PKcs and telomerase in telomere length maintenance. *EMBO J.* 21, 6275-6287 (2002b)
- Faivre L, Le Merrer M, Lyonnet S, Plauchu H, Dagonneau N, Campos-Xavier AB, Attia-Sobol J, Verloes A, Munnich A, Cormier-Daire V. Clinical and genetic heterogeneity of Seckel syndrome. *Am. J. Med. Genet.* 112, 379-383, (2002)
- Feng J, Funk WD, Wang SS, Weinrich SL, Avilion AA, Chiu CP, Adams RR, Chang E, Allsopp RC, Yu J. The RNA component of human telomerase. *Science* 269, 1236-1241 (1995)
- Ford D, Easton DF, Stratton M, Narod S, Goldgar D, Devilee P, Bishop DT, Weber B, Lenoir G, Chang-Claude J, Sobol H, Teare MD, Struewing J, Arason A, Scherneck S, Peto J, Rebbeck TR, Tonin P, Neuhausen S, Barkardottir R, Eyfjord J, Lynch H, Ponder BA, Gayther SA, Zelada-Hedman M, et al. Genetic heterogeneity and penetrance analysis of the BRCA1 and BRCA2 genes in breast cancer families. The Breast Cancer Linkage Consortium. *Am. J. Hum. Genet.* 62, 676-689 (1998)
- Fortini P, Pascucci B, Parlanti E, D'Errico M, Simonelli V, Dogliotti E. 8-Oxoguanine DNA damage: at the crossroad of alternative repair pathways. *Mutat. Res.* 531, 127-39 (2003a)
- Fortini P, Pascucci B, Parlanti E, D'Errico M, Simonelli V, Dogliotti E. The base excision repair: mechanisms and its relevance for cancer susceptibility. *Biochimie* 85, 1053-1071 (2003b)
- Franchitto A, Pichierri P. Bloom's syndrome protein is required for correct relocalization of RAD50/MRE11/NBS1 complex after replication fork arrest. *J. Cell Biol.* 157, 19-30 (2002)

- Franco S, Van De Vrugt HJ, Fernandez P, Aracil M, Arwert F, Blasco MA. Telomere dynamics in fancg-deficient mouse and human cells. *Blood Online* Aug 19, (2004)
- Friedberg EC. The discovery that xeroderma pigmentosum (XP) results from defective nucleotide excision repair. *DNA Repair (Amst)*. 3, 183-95 (2004)
- Futaki M, Liu JM. Chromosomal breakage syndromes and the BRCA1 genome surveillance complex. *Trends Mol. Med.* 7, 560-565 (2001)
- Futaki M, Igarashi T, Watanabe S, Kajigaya S, Tatsuguchi A, Wang J, Liu JM. The FANCG Fanconi anemia protein interacts with CYP2E1: possible role in protection against oxidative DNA damage. *Carcinogenesis* 23, 67-72 (2002)
- Garcia-Cao M, O'Sullivan R, Peters AH, Jenuwein T, Blasco MA. Epigenetic regulation of telomere length in mammalian cells by the Suv39h1 and Suv39h2 histone methyltransferases. *Nat. Genet.* 36, 94-99 (2004)
- Garcia-Higuera I, Taniguchi T, Ganesan S, Meyn MS, Timmers C, Hejna J, Grompe M, D'Andrea AD. Interaction of the Fanconi anemia proteins and BRCA1 in a common pathway. *Mol. Cell* 7, 249-262 (2001)
- German J. Bloom syndrome: a mendelian prototype of somatic mutational disease. *Medicine (Baltimore)* 72, 393-406 (1993)
- Gilley D, Tanaka H, Hande MP, Kurimasa A, Li GC, Oshimura M, Chen DJ. DNA-PKcs is critical for telomere capping *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 98, 15084-15088 (2001)
- Goto M, Miller RW, Ishikawa Y, Sugano H. Excess of rare cancers in Werner syndrome (adult progeria). *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 5, 239-246 (1996)
- Grawunder U, Wilm M, Wu X, Kulesza P, Wilson TE, Mann M, Lieber MR. Activity of DNA ligase IV stimulated by complex formation with XRCC4 protein in mammalian cells. *Nature* 388, 492-495 (1997)
- Gregory JJ Jr, Wagner JE, Verlander PC, Levran O, Batish SD, Eide CR, Steffenhagen A, Hirsch B, Auerbach AD. Somatic mosaicism in Fanconi anemia: evidence of genotypic reversion in lymphohematopoietic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 98, 2532-2537 (2001)
- Gregory RC, Taniguchi T, D'Andrea AD. Regulation of the Fanconi anemia pathway by monoubiquitination. *Sem. Cancer Biol.* 13, 77-82 (2003)

- Greider CW, Blackburn EH. Identification of a specific telomere terminal transferase activity in Tetrahymena extracts. *Cell* 43, 405-413 (1985)
- Griffith JD, Comeau L, Rosenfield S, Stansel RM, Bianchi A, Moss H, de Lange T. Mammalian telomeres end in a large duplex loop. *Cell* 97, 503-514 (1999)
- Grobelny JV, Godwin AK, Broccoli D. ALT-associated PML bodies are present in viable cells and are enriched in cells in the G(2)/M phase of the cell cycle. *J. Cell. Sci.* 113, 4577-4585 (2000)
- Gross M, Hanenberg H, Lobitz S, Friedl R, Herterich S, Dietrich R, Gruhn B, Schindler D, Hoehn H. Reverse mosaicism in Fanconi anemia: natural gene therapy via molecular self-correction. *Cytogenet. Genome Res.* 98, 126-135 (2002)
- Grosschedl R, Giese K, Pagel J. HMG domain proteins: architectural elements in the assembly of nucleoprotein structures. *Trends Genet.* 10, 94-100 (1994)
- Haber JE. The many interfaces of Mre11. *Cell* 95, 583-586 (1998)
- Haber JE. DNA recombination: the replication connection. *Trends Biochem. Sci.* 24, 271-275 (1999)
- Haber JE. Partners and pathways repairing a double-strand break. *Trends Genet.* 16, 259-264 (2000)
- Hahn WC. Role of telomeres and telomerase in the pathogenesis of human cancer, *J. Clin. Oncol.* 31, 2034-2043 (2003).
- Hanada K., Ukita T, Kohno Y, Saito K, Kato J, Ikeda H. RecQ DNA helicase is a suppressor of illegitimate recombination in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94, 3860-3865 (1997)
- Hande MP, Balajee AS, Tchirkov A, Wynshaw-Boris A, Lansdorp PM. Extrachromosomal telomeric DNA in cells from *Atm* ^{-/-} mice and patients with ataxia-telangiectasia. *Hum. Mol. Genet.* 10 519-528 (2001)
- Hanson H, Mathew CG, Docherty Z, Mackie Ogilvie C. Telomere shortening in Fanconi anaemia demonstrated by a direct FISH approach. *Cytogenet. Cell Genet.* 93, 203-206 (2001)
- Harley CB, Futcher AB, Greider CW. Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature* 345, 458-460 (1990)
- Hartwell LH, Kastan MB. Cell cycle control and cancer. *Science* 266, 1821-1828 (1994)

- Heinrich MC, Hoatlin ME, Zigler AJ, Silvey KV, Bakke AC, Keeble WW, Zhi Y, Reifsteck CA, Grompe M, Brown MG, Magenis RE, Olson SB, Bagby GC. DNA cross-linker-induced G2/M arrest in group C Fanconi anemia lymphoblasts reflects normal checkpoint function. *Blood* 91, 275-287 (1998)
- Herrera E., Samper E, Martín-Caballero J, Flores JM, Lee HW, Blasco MA. Disease states associated with telomerase deficiency appear earlier in mice with short telomeres. *EMBO J.* 18, 2950-2960 (1999)
- Hoatlin ME, Christianson TA, Keeble WW, Hammond AT, Zhi Y, Heinrich MC, Tower PA, Bagby GC Jr. The Fanconi anemia group C gene product is located in both the nucleus and cytoplasm of human cells. *Blood* 91, 1418-1425 (1998)
- Hodges M, Tissot C, Howe K, Grimwade D, Freemont PS. Structure, organization, and dynamics of promyelocytic leukemia protein nuclear bodies. *Am. J. Hum. Genet.* 63, 297-304 (1998)
- Hoeijmakers JH. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature* 411, 366-374 (2001)
- Holt SE, Shay JW. Role of telomerase in cellular proliferation and cancer. *J. Cell Physiol.* 180, 10-18 (1999)
- Howlett NG, Taniguchi T, Olson S, Cox B, Waisfisz Q, De Die-Smulders C, Persky N, Grompe M, Joenje H, Pals G, Ikeda H, Fox EA, D'Andrea AD. Biallelic inactivation of BRCA2 in Fanconi anemia. *Science* 297, 606-609 (2002)
- Hsu HL, Gilley D, Blackburn EH, Chen DJ. Ku is associated with the telomere in mammals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96, 12454-12458 (1999)
- Ishov AM, Sotnikov AG, Negorev D, Vladimirova OV, Neff N, Kamitani T, Yeh ET, Strauss JF 3rd, Maul GG. PML is critical for ND10 formation and recruits the PML-interacting protein daxx to this nuclear structure when modified by SUMO-1. *J. Cell Biol.* 147, 221-234 (1999)
- Jaco I, Muñoz P, Goytisolo F, Wesoly J, Bailey S, Taccioli G, Blasco MA. Role of mammalian Rad54 in telomere length maintenance. *Mol. Cell Biol.* 23, 5572-5580 (2003)
- Jeggo P. DNA breakage and repair. *Adv. Genet.* 38, 185-218 (1998)
- Jhanwar-Uniyal M. BRCA1 in cancer, cell cycle and genomic stability *Front Biosci.* 8, s1107-1117 (2003)

- Joenje H, Arwert F, Eriksson AW, de Koning H, Oostra AB. Oxygen-dependence of chromosomal aberrations in Fanconi's anaemia. *Nature* 290, 142-143 (1981)
- Joenje H, Patel KJ. The emerging genetic and molecular basis of Fanconi anaemia. *Nat. Rev. Genet.* 2, 446-457 (2001)
- Johnson RD, Jasin M. Sister chromatid gene conversion is a prominent double-strand break repair pathway in mammalian cells. *EMBO J.* 19, 3398-3407 (2000)
- Karlseder J, Broccoli D, Dai Y, Hardy S, de Lange T. p53- and ATM-dependent apoptosis induced by telomeres lacking TRF2. *Science* 283, 1321-1325 (1999)
- Karow JK, Chakraverty RK, Hickson ID. The Bloom's syndrome gene product is a 3'-5' DNA helicase *J. Biol. Chem.* 272, 30611-30614 (1997)
- Karow JK, Constantinou A, Li JL, West SC, Hickson ID. The Bloom's syndrome gene product promotes branch migration of holliday junctions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97, 6504-6508 (2000)
- Kastan MB, Lim DS. The many substrates and functions of ATM. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 1, 179-186 (2000).
- Khanna KK. Cancer risk and the ATM gene: a continuing debate. *J. Natl. Cancer. Inst.* 92. 795-802 (2000)
- Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, Harley CB, West MD, Ho PL, Coviello GM, Wright WE, Weinrich SL, Shay JW. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science* 266, 2011-2015 (1994)
- King MC, Marks JH, Mandell JB; New York Breast Cancer Study Group. Breast and ovarian cancer risks due to inherited mutations in BRCA1 and BRCA2. *Science* 302, 643-646 (2003)
- Kraemer KH, Lee MM, Scotto J. Xeroderma pigmentosum. Cutaneous, ocular, and neurologic abnormalities in 830 published cases. *Arch. Dermatol.* 123, 241-250 (1997)
- Krokan HE, Nilsen H, Skorpen F, Otterlei M, Slupphaug G. Base excision repair of DNA in mammalian cells. *FEBS Lett.* 476, 73-77 (2000)
- Kruk PA., Rampino NJ, Bohr VA. DNA damage and repair in telomeres: relation to aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 258-262 (1995)

- 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* 92, 3050-3056 (1998)
- Kurihara T, Tatsumi K, Takahashi H, Inoue M. Sister-chromatid exchanges induced by ultraviolet light in Bloom's syndrome fibroblasts. *Mutat. Res.* 183, 197-202 (1987)
- Kutler DI, Singh B, Satagopan J, Batish SD, Berwick M, Giampietro PF, Hanenberg H, Auerbach AD. A 20-year perspective on the International Fanconi Anemia Registry (IFAR). *Blood* 101, 1249-1256 (2003)
- Lahue RS, Slater DL. DNA repair and trinucleotide repeat instability. *Front Biosci.* 8, 653-665 (2003)
- Lansdorp PM. Repair of telomeric DNA prior to replicative senescence. *Mech. Ageing Dev.* 118, 23-34 (2000)
- Lanza A, Lagomarsini P, Casati A, Ghetti P, Stefanini M. Chromosomal fragility in the cancer-prone disease xeroderma pigmentosum preferentially involves bands relevant for cutaneous carcinogenesis. *Int. J. Cancer.* 74, 654-663 (1997)
- Laquerbe A, Moustacchi E, Fuscoe JC, Papadopoulo D. The molecular mechanism underlying formation of deletions in Fanconi anemia cells may involve a site-specific recombination. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92, 831-835 (1995)
- Laquerbe A, Sala-Trepat M, Vives C, Escarceller M, Papadopoulo D. Molecular spectra of HPRT deletion mutations in circulating T-lymphocytes in Fanconi anemia patients. *Mutat. Res* 431, 341-350 (1999)
- Lavin MF, Shiloh Y. The genetic defect in ataxia-telangiectasia. *Annu. Rev. Immunol.* 15, 177-202 (1997)
- Le S, Moore JK, Haber JE, Greider CW. RAD50 and RAD51 define two pathways that collaborate to maintain telomeres in the absence of telomerase. *Genetics* 152, 143-152 (1999)
- Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. Genetic instabilities in human cancers. *Nature* 396, 643-649 (1998)

- Leteurtre F, Li X, Guardiola P, Le Roux G, Sergere JC, Richard P, Carosella ED, Gluckman E. Accelerated telomere shortening and telomerase activation in Fanconi's anaemia. *Br. J. Haematol.* 105, 883-893 (1999)
- Levitus M, Meetei AR, Xue Y, Medhurst A, Zwaan M, Ling C, Rooimans MA, Bier P, Hoatlin M, Pals G, de Winter JP, Wang W, Joenje H. Identification of the Fanconi Anemia group B gene. *Fanconi Anemia Research Fund Symposium, Abstract Book, Cambridge, Massachusetts* (2004).
- Levrán O, Doggett NA, Auerbach AD. Identification of *Alu*-mediated deletions in the Fanconi anemia gene FAA. *Hum. Mutat.* 12, 145-152 (1998)
- Levy MZ, Allsopp RC, Futcher AB, Greider CW, Harley CB. Telomere end-replication problem and cell aging. *J. Mol. Biol.* 225, 951-960 (1992)
- Li X, Leteurtre F, Rocha V, Guardiola P, Berger R, Daniel MT, Noguera MH, Maarek O, Roux GL, de la Salmoniere P, Richard P, Gluckman E. Abnormal telomere metabolism in Fanconi's anaemia correlates with genomic instability and the probability of developing severe aplastic anaemia. *Br. J. Haematol.* 120, 836-845 (2003)
- Lieber MR, Ma Y, Pannicke U, Schwarz K. Mechanism and regulation of human non-homologous DNA end-joining. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 4, 712-720 (2003)
- Lim DS, Kim ST, Xu B, Maser RS, Lin J, Petrini JH, Kastan MB. ATM phosphorylates p95/nbs1 in an S-phase checkpoint pathway. *Nature* 404, 613-617 (2000)
- Liu Y, West SC. Distinct functions of BRCA1 and BRCA2 in double-strand break repair. *Breast Cancer Res.* 4, 9-13 (2002)
- Ludwig T, Chapman DL, Papaioannou VE, Efstratiadis A. Targeted mutations of breast cancer susceptibility gene homologs in mice: lethal phenotypes of *Brca1*, *Brca2*, *Brca1/Brca2*, *Brca1/p53*, and *Brca2/p53* nullizygous embryos. *Genes Dev.* 11, 1226-1241 (1997)
- Lundblad V. DNA ends: maintenance of chromosome termini versus repair of double strand breaks. *Mutat. Res.* 451, 227-240 (2000)
- Luo G, Yao MS, Bender CF, Mills M, Bladl AR, Bradley A, Petrini JH. Disruption of *mRad50* causes embryonic stem cell lethality, abnormal embryonic development, and sensitivity to ionizing radiation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 96, 7376-7381 (1999)

- Ma Y, Pannicke U, Schwarz K, Lieber MR. Hairpin opening and overhang processing by an Artemis/ DNA-dependent protein kinase complex in nonhomologous end joinig and V(D)J recombination. *Cell* 108, 781-794 (2002)
- Marciniak RA, Lombard DB, Johnson FB, Guarente L. Nucleolar localization of the Werner syndrome protein in human cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 6887-6892 (1998)
- Marnett LJ. Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis* 21, 361-70 (2000)
- Marx J. Debate surges over the origins of genomic defects in cancer. *Science* 297, 544-546 (2002)
- Masters JR, Koberle B. Curing metastatic cancer: lessons from testicular germ-cell tumours. *Nat. Rev. Cancer.* 3, 517-525 (2003)
- Masutomi K, Hahn WC. Telomerase and tumorigenesis. *Cancer Lett.* 194, 163-172 (2003)
- McHugh PJ, Spanswick VJ, Hartley JA. Repair of DNA interstrand crosslinks: molecular mechanisms and clinical relevance. *Lancet Oncol.* 2, 483-490 (2001)
- Meetei AR, Sechi S, Wallish M, Yang D, Young MK, Joenje H, Hoatlin ME, Wang W. A multiprotein nuclear complex connects Fanconi anemia and Bloom syndrome. *Mol. Cell Biol.* 23, 3417-3426 (2003a)
- Meetei AR, de Winter JP, Medhurst AL, Wallisch M, Waisfisz Q, van de Vrugt HJ, Oostra AB, Yan Z, Ling C, Bishop CE, Hoatlin ME, Joenje H, Wang W. A novel ubiquitin ligase is deficient in Fanconi anemia. *Nat. Genet.* 35, 165-170 (2003b)
- Meetei AR, Levitus M, Xue Y, Medhurst AL, Zwaan M, Ling C, Rooimans MA, Bier P, Hoatlin M, Pals G, de Winter JP, Wang W, Joenje H. X-linked inheritance of Fanconi anemia complementation group B. *Nat. Genet.* (2004)
- Metcalf JA, Parkhill J, Campbell L, Stacey M, Biggs P, Byrd PJ, Taylor AM. Accelerated telomere shortening in ataxia telangiectasia. *Nat. Genet.* 13, 350-353 (1996)
- Miki Y, Swensen J, Shattuck-Eidens D, Futreal PA, Harshman K, Tavtigian S, Liu Q, Cochran C, Bennett LM, Ding W. A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science* 266, 66-71 (1994)

- Mohaghegh P, Hickson ID. DNA helicase deficiencies associated with cancer predisposition and premature ageing disorders. *Hum. Mol. Genet.* 10, 741-746 (2001)
- Mol CD, Parikh SS, Putnam CD, Lo TP, Tainer JA. DNA repair mechanisms for the recognition and removal of damaged DNA bases. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 28, 101-128 (1999)
- Morgan NV, Tipping AJ, Joenje H, Mathew CG. High frequency of large intragenic deletions in the Fanconi anemia group A gene. *Am. J. Hum. Genet.* 65, 1330-1341 (1999)
- Morgan WF, Corcoran J, Hartmann A, Kaplan MI, Limoli CL, Ponnaiya B. DNA double-strand breaks, chromosomal rearrangements, and genomic instability. *Mutat. Res.* 404, 125-128 (1998)
- Motoyama N, Naka K. DNA damage tumor suppressor genes and genomic instability. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 14, 11-16 (2004)
- Moynahan ME, Chiu JW, Koller BH, Jasin M. Brca1 controls homology-directed DNA repair. *Mol. Cell* 4, 511-518 (1999)
- Moynahan ME, Pierce AJ, Jasin M. BRCA2 is required for homology-directed repair of chromosomal breaks. *Mol. Cell* 7, 263-272 (2001)
- Moyzis RK, Buckingham JM, Cram LS, Dani M, Deaven LI, Jones MD, Moyne J, Ratcliff RL, Wu JR. A highly conserved repetitive DNA sequence, (TTAGGG)_n, present at the telomeres of human chromosomes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 85, 6622-6626 (1988)
- Nakanishi K, Taniguchi T, Ranganathan V, New HV, Moreau LA, Stotsky M, Mathew CG, Kastan MB, Weaver DT, D'Andrea AD. Interaction of FANCD2 and NBS1 in the DNA damage response. *Nat. Cell. Biol.* 4, 913-920 (2002)
- Nathanson KL, Wooster R, Weber BL. Breast cancer genetics: what we know and what we need. *Nat. Med.* 7, 552-556 (2001)
- Nijman SMB, Huang TT, Dirac AM, Brummelkamp TR, Kerkhoven RM, D'Andrea AD, Bernards R. A genetic screen identifies a de-ubiquitinating enzyme as a regulator of FANCD2 monoubiquitination. *Fanconi Anemia Research Fund Symposium, Abstract Book, Cambridge, Massachusetts* (2004).
- Norgauer J, Idzko M, Panther E, Hellstern O, Herouy Y. Xeroderma Pigmentosum. *Eur. J. Dermatol.* 13, 4-9 (2003)

- Notaro R, Cimmino A, Tabarini D, Rotoli B, Luzzatto L. In vivo telomere dynamics of human hematopoietic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94, 13782-13785 (1997)
- O'Driscoll M, Ruiz-Perez VL, Woods CG, Jeggo PA, Goodship JA. A splicing mutation affecting expression of ataxia-telangiectasia and Rad3-related protein (ATR) results in Seckel syndrome. *Nat. Genet.* 33, 497-451 (2003)
- Oikawa S, Kawanishi S. Site-specific DNA damage at GGG sequence by oxidative stress may accelerate telomere shortening. *FEBS Lett.* 453, 365-368 (1999)
- Olive PL. The role of DNA single- and double-strand breaks in cell killing by ionizing radiation. *Radiat. Res.* 150, 542-551 (2000)
- Osborn AJ, Elledge SJ, Zou L. Checking on the fork: the DNA-replication stress-response pathway. *Trends Cell Biol.* 12, 509-516 (2002)
- Otsuki T, Nagakura S, Wang J, Bloom M, Grompe M, Liu JM. Tumor necrosis factor-alpha and CD95 ligation suppress erythropoiesis in Fanconi anemia C gene knockout mice. *J. Cell. Physiol.* 179, 79-86 (1999)
- Patel KJ, Yu VP, Lee H, Corcoran A, Thistlethwaite FC, Evans MJ, Colledge WH, Friedman LS, Ponder BA, Venkitaraman AR. Involvement of BRCA2 in DNA repair. *Mol. Cell* 1, 347-357 (1998)
- Paull TT, Gellert M. The 3' to 5' exonuclease activity of Mre11 facilitates repair of DSB. *Mol. Cell* 1, 969-979 (1998)
- Paull TT, Rogakou EP, Yamazaki V, Kirchgessner CU, Gellert M, Bonner WM. A critical role for histone H2AX in recruitment of repair factors to nuclear foci after DNA damage *Curr. Biol.* 10, 886-895 (2000)
- Petersen S, Saretzki G, von Zglinicki T. Preferential accumulation of single-stranded regions in telomeres of human fibroblasts. *Exp. Cell Res.* 239, 152-160 (1998)
- Pichierri P, Franchitto A, Mosesso P, Palitti F. Werner's syndrome cell lines are hypersensitive to camptothecin-induced chromosomal damage. *Mutat. Res.* 456, 45-47 (2000)
- Pichierri P, Rosselli F. The DNA crosslink-induced S-phase checkpoint depends on ATR-CHK1 and ATR-NBS1-FANCD2 pathways. *EMBO J.* 23, 1178-1187 (2004)

- Pichierri P, Franchitto A, Rosselli F. BLM and the FANC proteins collaborate in a common pathway in response to stalled replication forks. *EMBO J.* 23, 3154-3163 (2004)
- Pristos CA, Sartorelli AC. Generation of reactive oxygen radicals through bioactivation of mitomycin antibiotics. *Cancer Res.* 46, 3528-32 (1986)
- Ranganathan V, Heine WF, Ciccone DN, Rudolph KL, Wu X, Chang S, Hai H, Ahearn IM, Livingston DM, Resnick I, Rosen F, Seemanova E, Jarolim P, DePinho RA, Weaver DT. Rescue of a telomere length defect of Nijmegen breakage syndrome cells requires NBS and telomerase catalytic subunit. *Curr. Biol.* 11, 962-966 (2001)
- Reuter TY, Medhurst AL, Waisfisz Q, Zhi Y, Herterich S, Hoehn H, Gross HJ, Joenje H, Hoatlin ME, Mathew CG, Huber PA. Yeast two-hybrid screens imply involvement of Fanconi anemia proteins in transcription regulation, cell signalling, oxidative metabolism, and cellular transport. *Exp. Cell Res.* 289 211-21 (2003)
- Rufer N, Dragowska W, Thornbury G, Roosnek E, Lansdorp PM. Telomere length dynamics in human lymphocyte subpopulations measured by flow cytometry. *Nature Biotechnol.* 16, 743-747 (1998)
- Ruppitsch W, Meisslitzer C, Weirich-Schwaiger H, Klocker H, Scheidereit C, Schweiger M, Hirsch-Kauffmann M. The role of oxygen metabolism for the pathological phenotype of Fanconi anemia. *Hum. Genet.* 99, 710-719 (1997)
- Saito H, Hammond AT, Moses RE. Hypersensitivity to oxygen is a uniform and secondary defect in Fanconi anemia cells. *Mutat. Res.* 294, 255-262 (1993)
- Sala-Trepat M, Rouillard D, Escarceller M, Laquerbe A, Moustacchi E, Papadopoulo D. Arrest of S-phase progression is impaired in Fanconi anemia cells. *Exp. Cell Res.* 260, 208-215 (2000)
- Salk D, Au K, Hoehn H, Martin GM. Cytogenetic aspects of Werner syndrome. *Adv. Exp. Med. Biol.* 190, 541-546(1985)
- Salk D. Werner's syndrome: a review of recent research with an analysis of connective tissue metabolism, growth control of cultured cells, and chromosomal aberrations. *Hum. Genet.* 62, 1-5 (1982)
- Samper E, Goytisolo FA, Slijepcevic P, van Buul PP, Blasco MA. Mammalian Ku86 protein prevents telomeric fusions independently of the length of

- TTAGGG repeats and the G-strand overhang. *EMBO Rep.* 1, 244-252 (2000)
- Sancar A, Lindsey-Boltz LA, Unsal-Kaccmaz K, Linn S. Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annu. Rev. Biochem.* 73, 39-85 (2004)
- Savino M, Ianzano L, Strippoli P, Ramenghi U, Arslanian A, Bagnara GP, Joenje H, Zelante L, Savoia A. Mutations of the Fanconi anemia group A gene (FAA) in Italian patients. *Am. J. Hum. Genet.* 61, 1246-1253 (1997)
- Savitsky K., Bar-Shira A, Gilad S, Rotman G, Ziv Y, Vanagaite , Tagle DA, Smith S, Uziel T, Sfez S. A single ataxia telangiectasia gene with a product similar to PI-3 kinase. *Science* 268, 1749-1753 (1995)
- Schindler D, Hoehn H. Fanconi anemia mutation causes cellular susceptibility to ambient oxygen. *Am. J. Hum. Genet.* 43, 429-435 (1988)
- Schofield MJ, Hsieh P. DNA mismatch repair: molecular mechanisms and biological function. *Annu. Rev. Microbiol.* 57, 579-608 (2003)
- Scully R, Anderson SF, Chao DM, Wei W, Ye L, Young RA, Livingston DM, Parvin JD. BRCA1 is a component of the RNA polymerase II holoenzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94, 5605-5610 (1997)
- Shampay J, Blackburn EH. Generation of telomere-length heterogeneity in *Saccharomyces cerevisiae* *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 85, 534-538 (1988)
- Shen JC, Gray MD, Oshima J, Kamath-Loeb AS, Fry M, Loeb LA. Werner syndrome protein. I. DNA helicase and DNA exonuclease reside on the same polypeptide, *J. Biol. Chem.* 273, 34139-34144 (1998)
- Shiloh Y. ATM and ATR: networking cellular responses to DNA damage. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 11, 71-77 (2001)
- Slupphaug G, Kavli B, Krokan HE. The interacting pathways for prevention and repair of oxidative DNA damage. *Mutat. Res.* 531, 231-251 (2003)
- Smith SA, Easton DF, Evans DG, Ponder BA. Allele losses in the region 17q12-21 in familial breast and ovarian cancer involve the wild-type chromosome. *Nat. Genet.* 2, 128-131 (1992)
- Smogorzewska A, van Steensel B, Bianchi A, Oelmann S, Schaefer MR, Schnapp G, de Lange T. Control of human telomere length by TRF1 and TRF2. *Mol. Cell Biol.* 20, 1659-1668 (2000)

- Stavropoulos DJ, Bradshaw PS, Li X, Pasic I, Truong K, Ikura M, Ungrin M, Meyn MS. The Bloom syndrome helicase BLM interacts with TRF2 in ALT cells and promotes telomeric DNA synthesis. *Hum. Mol. Genet.* 11, 3135-3144 (2002)
- Surrallés J, Darroudi F, Natarajan AT. Low level of DNA repair in human chromosome 1 heterochromatin. *Genes Chromosomes Cancer* 20, 173-184 (1997)
- Surrallés J, Hande MP, Marcos R, Lansdorp PM. Accelerated telomere shortening in the human inactive X chromosome. *Am. J. Hum. Genet.* 65, 1617-1622 (1999)
- Surrallés J, Jackson SP, Jasin M, Kastan MB, West SC, Joenje H. Molecular cross-talk among chromosome fragility syndromes. *Genes Dev.* 18, 1359-70 (2004)
- Surrallés J, Ramírez MJ, Marcos R, Natarajan AT, Mullenders LH. Clusters of transcription-coupled repair in the human genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 99, 10571-10574 (2002)
- Suzuki A, de la Pompa JL, Hakem R, Elia A, Yoshida R, Mo R, Nishina H, Chuang T, Wakeham A, Itie A, Koo W, Billia P, Ho A, Fukumoto M, Hui CC, Mak TW. BRCA2 is required for embryonic cellular proliferation in the mouse *Genes Dev.* 11, 1242-1252 (1997)
- Taalman RD, Jaspers NG, Scheres JM, de Wit J, Hustinx TW. Hypersensitivity to ionizing radiation, in vitro, in a new chromosomal breakage disorder, the Nijmegen Breakage Syndrome. *Mutat. Res.* 112, 23-32 (1983)
- Taniguchi T, Garcia-Higuera I, Xu B, Andreassen PR, Gregory RC, Kim ST, Lane WS, Kastan MB, D'Andrea AD. Convergence of the Fanconi anemia and ataxia telangiectasia signaling pathways. *Cell* 109, 459-472 (2002)
- Tarsounas M, Muñoz P, Claas A, Smiraldo PG, Pittman DL, Blasco MA, West SC. Telomere maintenance requires the RAD51D recombination/repair protein. *Cell* 117, 337-47 (2004)
- The New York Breast Cancer Study Collaborative Group. Breast and ovarian cancer risks among women with BRCA1 and BRCA2 mutations in the New York Breast Cancer Study (NYBCS). *Am. J. Hum. Genet.* 68, 292 (2001)
- Thurston VC, Ceperich TM, Vance GH, Heerema NA. Detection of monosomy 7 in bone marrow by fluorescence in situ hybridization. A study of Fanconi

- anemia patients and review of the literature. *Cancer Genet. Cytogenet.* 109, 154-160 (1999)
- Tipping AJ, Pearson T, Morgan NV, Gibson RA, Kuyt LP, Havenga C, Gluckman E, Joenje H, de Ravel T, Jansen S, Mathew CG. Molecular and genealogical evidence for a founder effect in Fanconi anemia families of the Afrikaner population of South Africa. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 98, 5734-5739 (2001)
- Tischkowitz MD, Hodgson SV. Fanconi anaemia. *J. Med. Genet.* 40, 1-10 (2003)
- Traverso G, Bettgowda C, Kraus J, Speicher MR, Kinzler KW, Vogelstein B, Lengauer C. Hyper-recombination and genetic instability in BLM-deficient epithelial cells. *Cancer Res.* 63, 8578-8581 (2003)
- Tsutsui T, Kumakura S, Tamura Y, Tsutsui TW, Sekiguchi M, Higuchi T, Barrett JC. Immortal, telomerase-negative cell lines derived from a Li-Fraumeni syndrome patient exhibit telomere length variability and chromosomal and minisatellite instabilities. *Carcinogenesis* 24, 953-965 (2003)
- Tsuzuki T, Fujii Y, Sakumi K, Tominaga Y, Nakao K, Sekiguchi M, Matsushiro A, Yoshimura Y, Morita T. Targeted disruption of the Rad51 gene leads to lethality in embryonic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93, 6236-6240 (1999)
- van der Burgt I, Chrzanowska KH, Smeets D, Weemaes C. Nijmegen breakage syndrome. *J. Med. Genet.* 33, 153-156 (1996)
- van Steensel B, de Lange T. Control of telomere length by the human telomeric protein TRF1. *Nature* 385, 740-743 (1997)
- van Steensel B, Smogorzewska A, de Lange T. TRF2 protects human telomeres from end-to-end fusions. *Cell* 92, 401-413 (1998)
- Varon R, Vissinga C, Platzer M, Cerosaletti KM, Chrzanowska KH, Saar K, Beckmann G, Seemanova E, Cooper PR, Nowak NJ, Stumm M, Weemaes CM, Gatti RA, Wilson RK, Digweed M, Rosenthal A, Sperling K, Concannon P, Reis A. Nibrin, a novel DNA double-strand break repair protein, is mutated in Nijmegen breakage syndrome. *Cell* 93, 467-476 (1998)
- Venkitaram AR. Cancer susceptibility and the functions of BRCA1 and BRCA2. *Cell* 108, 171-182 (2002)
- Venkitaraman AR. Tracing the network connecting BRCA and Fanconi anaemia proteins. *Nat. Rev. Cancer* 4, 266-276 (2004)

- Volker M, Mone MJ, Karmakar P, van Hoffen A, Schul W, Vermeulen W, Hoeijmakers JH, van Driel R, van Zeeland AA, Mullenders LH. Sequential assembly of the nucleotide excision repair factors in vivo. *Mol. Cell* 8, 213-224 (2001)
- Von Zglinicki T, Pilger R, Sitte N. Accumulation of single-strand breaks is the major cause of telomere shortening in human fibroblasts. *Free. Radic. Biol. Med* 28, 64-74 (2000a)
- Von Zglinicki T. Role of oxidative stress in telomere length regulation and replicative senescence. *Ann. NY. Acad. Sci.* 908, 99-110 (2000b)
- Wagner JE, Tolar J, Levrán O, Scholl T, Deffenbaugh A, Satagopan J, Ben-Porat L, Mah K, Batish SD, Kutler DI, MacMillan ML, Hanenberg H, Auerbach AD. Germline mutations in BRCA2: shared genetic susceptibility to breast cancer, early onset leukemia, and Fanconi anemia. *Blood* 103, 3226-3229 (2004)
- Waisfisz Q, Morgan NV, Savino M, de Winter JP, van Berkel CG, Hoatlin ME, Ianzano L, Gibson RA, Arwert F, Savoia A, Mathew CG, Pronk JC, Joenje H. Spontaneous functional correction of homozygous Fanconi anaemia alleles reveals novel mechanistic basis for reverse mosaicism. *Nat. Genet.* 22, 379-383 (1999)
- Waljer JR, Corpina RA, Goldberg J. Structure of the Ku heterodimer bound to DNA and its implications for double-strand repair. *Nature* 412, 607-614 (2001)
- Wang RC, Somogorzewska A, de Lange T. Homologous recombination generates T-loop-sized deletions at human telomeres. *Cell* 119, 355-368 (2004)
- Wang SC, Lin SH, Su LK, Hung MC. Changes in BRCA2 expression during progression of the cell cycle. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 234, 247-251 (1997)
- Wang X, Andreassen PR, D'Andrea AD. Functional interaction of monoubiquitinated FANCD2 and BRCA2/FANCD1 in chromatin. *Mol. Cell. Biol.* 24, 5850-5862 (2004)
- Wang X, D'Andrea AD. The interplay of Fanconi anemia proteins in the DNA damage response. *DNA Repair* 3, 1063–1069 (2004)

- Wang Y, Cortez D, Yazdi P, Neff N, Elledge SJ, Qin J. BASC, a super complex of BRCA1-associated proteins involved in the recognition and repair of aberrant DNA structures. *Genes Dev.* 14, 927-939 (2000)
- Wei C, Skopp R, Takata M, Takeda S, Price CM. Effects of double-strand break repair proteins on vertebrate telomere structure, *Nucleic Acids Res.* 30, 2862-2870 (2002)
- Welch PL, King M-C. BRCA1 and BRCA2 and the genetics of breast and ovarian cancer *Hum. Mol. Genet.* 10, 705-713 (2001)
- Welch PL, Owens KN, King M-C. Insights into the functions of BRCA1 and BRCA2. *Trends Genet.* 16, 69-74 (2000)
- Weng NP, Levine BL, June CH, Hodes RJ. Human naive and memory T lymphocytes differ in telomeric length and replicative potential. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 92, 11091-11094 (1995)
- Whitney MA, Saito H, Jakobs PM, Gibson RA, Moses RE, Grompe M. A common mutation in the FANCC gene causes Fanconi anaemia in Ashkenazi Jews. *Nat. Genet.* 4, 202-205 (1993)
- Wijker M, Morgan NV, Herterich S, van Berkel CG, Tipping AJ, Gross HJ, Gille JJ, Pals G, Savino M, Altay C, Mohan S, Dokal I, Cavenagh J, Marsh J, van Weel M, Ortega JJ, Schuler D, Samochatova E, Karwacki M, Bekassy AN, Abecasis M, Ebell W, Kwee ML, de Ravel T, Mathew CG et al. Heterogenous spectrum of mutations in the Fanconi anaemia group A gene. *Eur. J. Hum. Genet.* 7, 52-59 (1999)
- Wilson DM 3rd, Sofinowski TM, McNeill DR. Repair mechanisms for oxidative DNA damage. *Front Biosci.* 8, d963-981 (2003)
- Wolner B, van Komen S, Sung P, Peterson CL. Recruitment of the recombinational repair machinery to a DNA double-strand break in yeast. *Mol. Cell* 12, 221-232 (2003)
- Wooster R, Bignell G, Lancaster J, Swift S, Seal S, Mangion J, Collins N, Gregory S, Gumbs C, Micklem G. Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA2. *Nature* 378, 789-792 (1995)
- Wright WE, Shay JW. Cellular senescence as a tumor-protection mechanism: the essential role of counting. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 11, 98-103 (2001)
- Wu G, Lee WH, Chen PL. NBS1 and TRF1 colocalize at promyelocytic leukemia bodies during late S/G2 phases in immortalized telomerase-

- negative cells. Implication of NBS1 in alternative lengthening of telomeres. *J. Biol. Chem.* 275, 30618-30622 (2000)
- Wu G, Jiang X, Lee WH, Chen PL. Assembly of functional ALT-associated promyelocytic leukemia bodies requires Nijmegen Breakage Syndrome 1. *Cancer Res.* 63, 2589-2595 (2003)
- Yeager TR, Neumann AA, Englezou A, Huschtscha LI, Noble JR, Reddel RR. Telomerase-negative immortalized human cells contain a novel type of promyelocytic leukemia (PML) body. *Cancer Res.* 59, 4175-4179 (1999)
- Young BR, Painter RB. Radioresistant DNA synthesis and human genetic diseases. *Hum. Genet.* 82, 113-117 (1989)
- Zhao S, Weng YC, Yuan SS, Lin YT, Hsu HC, Lin SC, Gerbino E, Song MH, Zdzienicka MZ, Gatti RA, Shay JW, Ziv Y, Shiloh Y, Lee EY. Functional link between ataxia-telangiectasia and Nijmegen breakage syndrome gene products. *Nature* 405, 473-477 (2000)
- Zhong Z, Shiue L, Kaplan S, de Lange T. A mammalian factor that binds telomeric TTAGGG repeats in vitro. *Mol. Cell Biol.* 12, 4834-4843 (1992)
- Zhu XD, Kuster B, Mann M, Petrini JH, de Lange T. Cell-cycle-regulated association of RAD50/MRE11/NBS1 with TRF2 and human telomeres. *Nat. Genet.* 25, 347-352 (2000)

*Downstream Involvement of Histone H2AX in the
Fanconi Anaemia/BRCA Pathway*

Massimo Bogliolo¹, Elsa Callén¹, Maria Castellà¹, Amadeu
Creus¹, Ricard Marcos¹, Reinhard Kalb², Kornelia Neveling², José
A. Casado³, Juan A. Bueren³, Helmut Hanenberg⁴, Detlev
Schindler² and Jordi Surrallés^{1,5}

M.B and E.C. contributed equally to this work

¹Group of Mutagenesis, Department of Genetics and Microbiology, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Barcelona, Spain; ²Department of Human Genetics, University of Wurzburg, Wurzburg, Germany; CIEMAT/Fundación Marcelino Botín, Madrid, Spain; ⁴Heinrich-Heine-Universität, Dusseldorf, Germany.

⁵Corresponding author

Tel: int.+ 34 93 581 18 30

Fax: int.+ 34 93 581 23 87

E-mail: jordi.surralles@uab.es

Running title: H2AX is a component of the FA/BRCA pathway

Abstract

Fanconi anemia (FA) is a rare genetic disease characterized by chromosome fragility, bone marrow failure, congenital abnormalities and high predisposition to cancer. Here we studied the dynamics and genetic regulation of FANCD2 relocation to DNA damage in nuclei locally exposed to ultraviolet radiation (UVR). We show that UVR induces phosphorylation-dependent FANCD2 monoubiquitination in a timing consistent with the dynamics of its relocation to the site of damage. FANCD2 relocation to UVR-induced damage strictly depends on FANCA, FANCD2 K561, BRCA1 and ATR but is independent of ATM, suggesting that all the components of the FA/BRCA pathway participate in response to UVR. Interestingly, the analysis of MEFs deficient in the ATR substrate histone H2AX indicates that H2AX is required for FANCD2 relocation but is dispensable for FANCD2 monoubiquitination. Thus, FANCD2 monoubiquitination is necessary but not sufficient for FANCD2 functioning at the site of DNA damage. In addition, our data suggests that FANCD2 relocation requires ATR-mediated H2AX phosphorylation. Consistently H2AX^{-/-} MEFs showed an FA-like cellular phenotype including cellular and chromosomal hypersensitivity to MMC. Analysis of 11 FA patients with functional BRCA2 and proficient in FANCD2 monoubiquitination revealed that none of them have mutation in H2AX. In conclusion, H2AX is a novel component of the FA/BRCA pathway downstream FANCD2 activation and, although H2AX is a candidate FA gene, all FA patients studied to date have normal H2AX.

Introduction

Fanconi anaemia (FA) is a rare genetic disease characterized by chromosome fragility, congenital malformations, progressive pancytopenia and cancer susceptibility (Kutler et al., 2003). There are at least eleven independent FA complementation groups (A, B, C, D1, D2, E, F, G, I, J, L) each connected with a distinct disease gene (Levitus et al., 2004). All these genes but *FANCI* have been cloned and characterized. The FA proteins FANCA, C, E, F, G, and L, assemble in a nuclear complex (FA complex), which is required, in concert with BRCA1, for FANCD2 activation via monoubiquitination at the residue K561 in response to DNA damage or during S-phase (Garcia-Higuera et al., 2001; Taniguchi et al., 2002). FANCL is most probably the monoubiquitin ligase that activates FANCD2 (Meetei et al., 2003a,b).

The *FANCD2* gene is thought to be a key player in the FA pathway (reviewed in Bogliolo and Surrallés, 2004). Together with *FANCL*, it is the only FA gene conserved in evolution. We recently cloned and sequenced the *Drosophila* FANCD2 gene and those functionally important features, such as the residue K561, are highly conserved (Castillo et al., 2003). In addition, the FA protein complex is assembled in the absence of FANCD2 indicating that FANCD2 is downstream in the FA pathway (Garcia-Higuera et al., 2001). FANCD2 associates with the breast cancer susceptibility and the double strand break (DSB) repair proteins BRCA1, Rad51 (Garcia-Higuera et al., 2001; Taniguchi et al., 2002) and BRCA2 (Hussain et al., 2004; Wang et al., 2004) in DNA damage-induced nuclear *foci* or during S-phase. BRCA1 is in turn also involved in FANCD2 monoubiquitination (Garcia-Higuera et al., 2001).

FA-D1 cells express truncated BRCA2 protein indicating that *BRCA2* is a FA gene (Howlett et al., 2002). This result is consistent with the fact that mice with truncating mutations in *BRCA2* express a FA-like phenotype (Connor et al., 1997).

Both BRCA1 and BRCA2 interact with the recombination protein Rad51 and are involved in DSB repair by homologous recombination (HR) (Patel et al., 1998; Venkitaraman, 2003). Repair by HR predominates during S/G2 phase of the cell cycle when sister chromatids, the preferred substrate for error-free exchange, are present. The fact that FANCD2 forms nuclear *foci* with BRCA1 and Rad51 during S-phase, suggests that the FA/BRCA pathway is involved in HR repair of DSB during S-phase (Taniguchi et al., 2002a; D'Andrea, 2003; D'Andrea and Grompe, 2003). Indeed, a number of recent publications suggest that FANCD2 participate in the recovery of stalled replication forks (Andreassen et al., 2004; Pichierri et al., 2004; Rothfuss and Grompe, 2004; Hussain et al., 2004; Wang et al., 2004) possibly by ensuring correct replication fork repair by homologous recombination (HR) (reviewed by Pichierri and Rosselli, 2004a). DNA interstrand cross links (ICL) halt the progression of the replicative helicases and stop the ongoing fork probably as a result of nucleolytic attack of unprotected ssDNA regions (McGlynn and Lloyd, 2002). ATR but not ATM is present at stalled replication forks (Abraham, 2001; Lupardus et al., 2002; Tercero et al., 2003) and, consistently, the ICL-activated kinase is ATR and not ATM (Pichierri and Rosselli, 2004b). Once activated, ATR phosphorylates FANCD2 probably allowing subsequent monoubiquitination of FANCD2 (Andreassen et al., 2004). Interestingly, ATR-mediated FANCD2 phosphorylation in response to ICL depends on both an intact FA complex and NBS1, the product of the gene mutated in Nijmegen breakage syndrome (Pichierri and Rosselli, 2004) and NBS1 interacts with FANCD2 after DNA damage (Nakanishi et al., 2002). In turn, Rad50- Mre11-NBS1 (RMN) foci formation after ICL requires the FA complex (Pichierri et al., 2002). Consistent with a molecular cross talk between ATR, NBS and the FA/BRCA pathways, not only FA cells but also NBS and Seckle syndrome (SS) cells with a leaky splicing mutation leading to low levels of ATR

are hypersensitive to MMC (Nakanishi et al., 2002; O’Driscoll et al., 2003) and NBS, SS and FA patients share some clinical features. In addition, FA proteins also crosstalk with other proteins involved in maintaining chromosome stability such as ATM and BLM (Taniguchi et al., 2002b; Meteei et al., 2003; Pichierri et al., 2004) making an integrated network of genome stability pathways (Surrallés et al., 2004; Venkitaraman, 2004).

Exposure to ultraviolet radiation (UVR) results in replication arrest since most of the DNA polymerases are unable to replicate templates containing UV-induced DNA lesions (Ward and Chen, 2001). Consistent with the above discussed role for the FA pathway at stalled replication forks, FANCD2 becomes monoubiquitinated and forms foci in response not only to MMC and X-rays, but also to UVR (Garcia-Higuera et al., 2001; Pichierri et al., 2004). In order to improve our understanding of the molecular biology of the FA/BRCA pathway, here we have studied dynamics and regulation of FANCD2 relocation to DNA damage in nuclei locally treated with UVR. These studies led us to uncover that the ATR substrate histone H2AX is a novel component of the FA/BRCA pathway downstream FANCD2 activation.

Materials and Methods

General experimental design for protein relocation studies

A discrete nuclear area of human fibroblasts of diverse genetic backgrounds and under various culture conditions was locally irradiated with UVC light by covering the cells during irradiation with a filter with 5 µm diameter pores. The site of irradiation (UV-spot) was visualized with antibodies against cyclobutane pyrimidine dimers (CPD) and the relocation of FANCD2 or other proteins to the site of damage was measured at different times using specific antibodies. All the relocation experiments were repeated at

least 3 times and 200 irradiated nuclei per time-point and experiment were analysed to measure the percentage of UV-spots containing the protein of interest.

Cell lines and culturing

The following human transformed fibroblasts cell lines were used in this study: MRC5 (wild type); PD20 (FANCD2^{-/-}); PD20 retrovirally corrected with pMMp-FANCD2 cDNA; PD20 transduced with pMMp-FANCD2/K561R; PD20 transduced with the empty pMMP vector; FANCA^{-/-} transformed fibroblasts; FANCA^{-/-} retrovirally corrected with wtFANCA cDNA; CAPAN-1 (BRCA2^{-/-}); HCC1937 (BRCA1^{-/-}); HCC1937 corrected for BRCA1 deficiency by microcell mediated chromosome transfer; XP25RO (XPA^{-/-}); AT-7 (ATM^{-/-}) and F02/98 (ATR^{-/-}). In addition we used mouse embryonic fibroblasts (MEFs) derived from histone H2AX KO mice and wild type genetically matched counterparts. All the cell lines were cultivated as we described previously (Bogliolo et al., 2000; Callén et al. 2002; Surralles et al., 2002).

Local UV irradiation

The local UVC irradiation was performed essentially by the method of Volker and co-workers (Volker et al., 2001) with some minor modifications. Briefly, cells were seeded on 18x18 mm sterile coverslips and grown to near-confluence and, prior to irradiation, medium was aspirated and the cells washed with PBS. The cells on the coverslips were then covered with an isopore polycarbonate filter with pores of 5 µm diameter (Millipore, Badford, MA, USA) and exposed to UVR from above with a Philips 15W UV-C lamp G15-T8. The UVC radiation dose was measured with a VLX-3W radiometer with a CX-254 sensor (Vilber Lourmat, France). Following this procedure, only the light passing through the pores locally irradiated a 5 µm diameter area of the nuclei. The size of the irradiated area was confirmed by confocal microscopy

measurements (data not shown). At the density of cells and type of filter used, an average of >70% of the cells received a local irradiation. Subsequently, the filter was removed, fresh prewarmed medium was added back to the cells, and cells were returned to culture conditions or immediately processed.

Immunohistochemistry and microscopy

Cells were washed with PBS and subsequently fixed by adding PBS containing 4% formaldehyde (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) for 10 min at room temperature (RT). Cells were washed with PBS and incubated with PBS, 0.5% Triton (Sigma-Aldrich) for 15 min at RT. In order to visualize the site of UV-irradiation, cells were washed twice with PBS, treated with 1M HCl for 5 min at RT to denature the DNA, and washed once with PBS. Cells were subsequently rinsed with a washing buffer (WB) consisting of 3% bovine albumin (Sigma-Aldrich Corp) and 0.05% Tween-20 (Fluka Chemika) in PBS, incubated with a mouse primary antibody anti CPD in a 1:200 dilution in WB for 45 min at 37° C, and washed for 15 min in WB with gentle agitation. In experiments requiring double labelling, the primary rabbit antibodies against the specific proteins were mixed in WB in the appropriate dilutions and incubated simultaneously with the anti CPD antibody. The antibodies used and the corresponding working dilutions were as follows: anti-FANCD2 (Abcam, Cambridge, UK; 1:200; polyclonal); anti-FANCD2 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA; 1:200; monoclonal) anti- γ H2AX (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA; 1:100). Incubation with secondary antibodies anti-mouse Alexa Fluor 488 (Molecular Probes) and anti-rabbit Alexa Fluor 546 (Molecular Probes) diluted in WB was performed at 37° C for 20 min followed by a 15 min washing step in WB with gentle agitation. After the last antibody labelling step, the preparations were mounted in mounting medium containing

4'-6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI) as a DNA counter stain (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). Using this colour combination, nuclei were visualized in blue colour, the site of UV irradiation in green/yellow colour, and the specific proteins in red colour. Microscope analysis and quantification were performed in an Olympus BX-50 fluorescence microscope. Images were captured with either a laser confocal microscope TCS 4D (Leica Microsystems GmbH, Heidelberg, Germany) or a Leica DMRB epifluorescence microscope equipped with a DC 200 digital camera and the Leica DC Viewer capturing software. Images were finally computer-edited using the Adobe Photodeluxe 7.0 program.

FANCD2 immunoblotting

Cell extracts were prepared basically by the method of Tanaka and co-workers (Tanaka et al., 1992) with some modifications. Briefly, harvested cells were washed three times with PBS and resuspended in a buffer made of 10 mM Tris-HCl pH 7.8 and 200 mM KCl at a cell density of 5×10^7 cells/ml. After the addition of an equal volume of a second buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.8, 200 mM KCl 2 mM EDTA, 40% glycerol, 0.2% Nonidet P-40, 2 mM dithiothreitol, 0.5 mM PMSF, 10 µg/ml aprotinin, 5 µg/ml leupeptin, 1 µg/ml pepstatin), the cell suspension was stirred for 1 h at 4° C and centrifuged at 16,000 g for 10 min. The total protein concentration in the supernatant was then measured using the Bio-Rad Protein Assay (Biorad Laboratories, Hercules, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. 50-100 µg of total proteins were then loaded on a discontinuous 4–6% SDS–PAGE minigel and electrophoresed at 30 mA for 15 min followed by 15 mA for about 1 h using a Mini PROTEAN 3 electrophoretic cell (Biorad Laboratories). Proteins were electroblotted in a trans-blot electrophoretic transfer cell (Biorad Laboratories) onto Immun-Blot PVDF membranes

(Biorad Laboratories) in the presence of 25 mM Tris, 192 mM glycine, 20% methanol for 1 h at 100 V. Membranes were blocked for 1 h at RT in Tris-buffered saline containing 0.1% Tween and 2% skimmed dried milk. Membranes were incubated with gentle agitation overnight at 4° C with monoclonal anti human FANCD2 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA; 1:500). Immunocomplexes were visualized by GAM-Immun-Star-AP Chemiluminescent Kit (Biorad Laboratories) according to the manufacturer's instructions.

Cytogenetic and cell viability assays for MMC sensitivity

Exponentially growing cells were allowed to attach to slides for 24h and subsequently treated with 50nM MMC for two days. Concurrently growing cultures were left untreated. Cells were then harvested and GIEMSA stained following standard cytogenetic methods. A total of 20-60 well spread metaphases were scored per treatment point and all the experiments were repeated 2-4 times. For cell growth/viability assay, cells were seeded in 96 wells ELISA microtiter plates at a density of 2000 cells in a final volume of 100 µl culture medium per well. The cells were allowed to grow for 24 h and MMC was added at increasing concentrations ranging from 0 to 1000nM for one week. Then the viability of the cells was assessed with Cell Proliferation KitII (XTT) (Roche, Basel, Switzerland) according to the manufacturer's instructions. The plates were then read with a microtiter plate ELISA reader. A total of 48 wells per dose and cell line were measured.

Analysis of H2AX in putative FA patients

Genomic DNA was prepared using a modified salting-out technique (Miller et al., 1988). PCR primers were H2AXfor 5'-GCGTCTGTTCTAGTGTTTGAGCCG-3' and H2AXrev 5'- GAAGCGGCTCAGCTCTTTCCATGAG-3'. The reaction was conducted using Pfx DNA polymerase (Invitrogen). Reaction conditions were: Initial

denaturation for 2 min at 94 °C; 10 cycles with denaturation for 35 s at 94 °C, annealing for 30 s at 62 °C – 0.5 °C per cycle and elongation for 55 s at 72 °C; followed by 26 cycles using the same conditions except annealing for 30 s at 58 °C. The PCR products were purified using the GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham).

Automated direct DNA sequencing of the PCR products was performed using ABI-PRISM big-dye terminator chemistry (BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit, version 1.1). In addition to the PCR primers, two internal sequencing primers were designed and variably used to obtain full-length sequence information: H2AXint/for 5'-GCCCCGCGACAACAAGAAGACG-3' and H2AXint/rev 5'-TGGTCTTCTTGGGCAGCAGCAC-3'. The annealing temperature for cycle sequencing was 58 °C. Sequence acquisition was with a ABI PRISM 310 Genetic Analyzer instrument with pertinent capillaries, polymer and buffers (all Applied Biosystems, Darmstadt, Germany).

Results

FANCD2 dynamically relocates to UV induced DNA damage

In a first series of experiments, wild-type cells were locally irradiated with 20, 40 or 60 J/m² of UVC radiation through a filter with 5 µm-diameter pores and the locally irradiated nuclear areas were visualized with antibodies against CPD. At the pore size and density used, over 70% of nuclei presented an UV-spot, as shown in table 1. FANCD2 presented a diffuse nuclear pattern in non-irradiated cells or in cells immediately after irradiation but relocated to the site of UV-induced damage few hours after irradiation (Fig.1a). FANCD2 relocation followed a specific and consistent dynamic (Fig. 1b): immediately after irradiation, no FANCD2 signal was observed at

the site of damage but the percentage of UV-spots containing FANCD2 signal progressively increased until reaching a plateau 6h after irradiation, when 70-80% of UV-spots presented FANCD2 signal. FANCD2 signal was present at the site of irradiation as long as the CPD were detectable, up to 48h after irradiation (table 1). 6h after irradiation, we observed a one-to-one correspondence between cells staining positive for both CPD at the irradiation site and FANCD2 and no FANCD2 spots were detected in cells without UV-spots. These results indicate that FANCD2 relocation correlates with the presence of CPD and that once the CPD are repaired, FANCD2 disassociates from the irradiated sites

FANCD2 relocates to UVR-induced stalled replication forks independently of NER

It is known that UVR induces stalled replication forks (see Introduction) and therefore, we hypothesize that FANCD2 mainly relocates to stalled replication forks. Consistent with this notion, the pattern of UVR-induced FANCD2 relocation correlates with the pattern of Rad51 and PCNA staining (Fig. 2a), a marker of stalled replication forks. In order to disregard the possibility that this pattern of PCNA staining is related to the resynthesis step of nucleotide excision repair (NER) of UVR-induced CPD, we studied the dynamics of FANCD2 relocation in a XPA cells completely deficient in NER. As shown in figure 2b, FANCD2 normally relocates to UV spots even in the absence of a functional NER.

FANCD2 relocation to UV-spots requires FANCA, BRCA1 and FANCD2 lysine

561

We then dissected the genetic control of FANCD2 relocation to the site of UV-induced damage by studying FANCD2 relocation in cells deficient in FANCA, BRCA1,

BRCA2/FANCD1, and in FANCD2 deficient cells stably transduced with a FANCD2 cDNA lacking the residue of FANCD2 monoubiquitination, K561. As shown in Figure 2, FANCD2 do not relocate in BRCA1^{-/-} and FANCA^{-/-} cells, but it normally relocates to the UV-spot in FANCA deficient cells functionally corrected by retroviral-mediated FANCA cDNA transduction (Fig. 3) or in BRCA1^{-/-} cells functionally corrected by microcell mediated chromosome transfer (data not shown). FANCA cDNA transduction in FANCA deficient cells resulted in the recovery of MMC resistance, FANCD2 monoubiquitination and chromosome stability after DEB treatment (data not shown). In addition, FANCD2 K561 is required for FANCD2 relocation as FANCD2 does not relocate in the FANCD2^{-/-} cell line retrovirally transduced with the FANCD2 K561R cDNA (Fig. 3). FANCD2 normally relocates to UV-spots in FANCD2 deficient cells functionally corrected with the wild-type FANCD2 cDNA by retroviral transduction (data not shown). Similarly, FANCD2 normally relocates to UV-spots in cells deficient in BRCA2/FANCD1 indicating that BRCA2/FANCD1 is not required for normal FANCD2 relocation to the site of UVR induced damage (Fig. 3). Thus, all the components required to activate FANCD2 in response to DNA crosslinks (FANCA as key component of the FA core complex, BRCA1, and K561 of FANCD2; Garcia-Higuera et al. 2001) are also required for FANCD2 relocation in response to UVR.

FANCD2 relocation after UVR correlates with FANCD2 phosphorylation and monoubiquitination

Our results suggest that FANCD2 relocates to the site of UVR-induced damage only after highly regulated monoubiquitination of FANCD2. We challenge this statement by checking whether the dynamics of FANCD2 posttranslational modifications coincides with the dynamics of its relocation to the site of damage. As seen in figure 4a, the short

and the long (monoubiquitinated) FANCD2 isoforms appear not immediately but between 1 and 3 hours after UVR. A double band shift upwards was observed when the two isoforms were induced (Fig. 4a). This band shift of the two isoforms was sensitive to λ -phosphatase treatment suggesting FANCD2 phosphorylation. Thus FANCD2 phosphorylation is coupled in time with FANCD2 monoubiquitination after UVR.

ATR but not ATM is required for UVR-induced FANCD2 activation and relocation

We then checked the requirement of the DNA damage response kinases ATR and ATM in FANCD2 relocation after UVR. As shown in figure 5a, FANCD2 relocation is greatly impaired, although not completely abolished, in SS cells deficient in ATR but normal in ATM cells. This little FANCD2 relocation (<10%) detected in SS cells is consistent with the fact that these cells bear a leaky splicing mutation in ATR leaving some residual (<10%) kinase activity (O'Driscoll et al., 2003). It is known that UVC induces ATR kinase activity at stalled replication forks, and recent results with MMC show that FANCD2 phosphorylation and monoubiquitination are greatly impaired in SS (Andreassen et al., 2004). Thus, stalled replication forks at the site of irradiation once the cell enters in S-phase, is probably the signal that activates the FA/BRCA pathway via ATR-mediated FANCD2 phosphorylation, 1 to 3h after UVR-radiation.

Histone H2AX is required for FANCD2 relocation but not for FANCD2 activation

ATR inactivation leads to the inhibition of histone H2AX phosphorylation and phosphorylated H2AX (γ H2AX) foci formation upon treatment with hydroxyurea (HU) or UVR, suggesting that H2AX is phosphorylated by ATR in response to replication blocks (Ward and Chen, 2001). Conversely, ATM is not required for H2AX phosphorylation following UVR or HU replication block (Ward and Chen, 2001). Many

components of the DNA damage response including BRCA 1, the MRN complex, 53BP1, MDC1 and Rad51 form foci that colocalize with pre-existing γ H2AX foci (Fernandez-Capetillo et al., 2004). Therefore we checked whether H2AX is required for FANCD2 relocation after UVR. As shown in figure 6a, FANCD2 does not relocate to the site of UVR-induced damage in H2AX^{-/-} MEF. However, normal FANCD2 relocation was observed in genetically matched wt MEF, indicating a critical role for H2AX in FANCD2 relocation. A possible explanation is that H2AX is required for FANCD2 activation by monoubiquitination. However, we disregarded this possibility, as FANCD2 is normally monoubiquitinated in response to UVR even in the absence of H2AX (figure 6b). Thus, FANCD2 monoubiquitination and, therefore, ATR, the FA complex, BRCA1 and K561 of FANCD2, are necessary but not sufficient for FANCD2 relocation to the site of UVR-induced damage.

Equal dynamics of FANCD2 relocation and histone H2AX phosphorylation

It is known that histone H2AX is rapidly (within minutes) phosphorylated in the chromatin surrounding a DSB (Rogakou et al., 1998) or at UVR-induced stalled replication forks at its serine 139 residue present within its conserved C-ter tail. In addition ATR is the kinase that phosphorylates H2AX in response to UVR-induced stalled replication forks (Ward and Chen, 2001; Shiloh, 2001). As γ H2AX is required for the accumulation of several DNA repair/damage response factors (reviewed by Fernandez-Capetillo et al., 2004), it seems logical to hypothesize that FANCD2 also requires prior phosphorylation of H2AX to accumulate at the site of UV irradiation. We challenge this model by comparing the dynamics of FANCD2 relocation and H2AX phosphorylation at the site of local irradiation using antibodies specific for H2AX phosphorylated at serine 139. Interestingly, the dynamics of FANCD2 relocation is

identical to the dynamics of H2AX phosphorylation at the site of damage (figure 7a,b) indicating that H2AX phosphorylation and FANCD2 relocation are synchronized.

Histone H2AX phosphorylation is reduced in Seckle syndromes cells

We next checked whether H2AX phosphorylation is partly impaired in SS cells. As shown in figure 8, the level of H2AX phosphorylation at the site of UV irradiation is greatly reduced in SS cells expressing low levels of functional ATR. As previously mentioned, ATR phosphorylates H2AX at stalled replication forks, thus further supporting the notion that stalled replication forks are the initiating signal for ATR-mediated H2AX phosphorylation and subsequent FANCD2 relocation to the irradiated site.

H2AX^{-/-} cells have a FA-like cellular phenotype

FA cells are phenotypically characterized by an increased sensitivity to the chromosome breaking ability of DNA crosslinkers such as MMC. In fact, the final diagnostic confirmation of FA is an excess of chromatid type aberrations such as radial figures after treating the patients' cells with crosslinking agents. Our data on the requirement of γ H2AX for FANCD2 relocation but not for FANCD2 monoubiquitination strongly suggest that H2AX is a novel component of the FA/BRCA pathway downstream FANCD2. Consistently, H2AX^{-/-} MEF have a an excess of chromatid type aberrations, including radial figures, after MMC treatment compared to genetically matched wild type MEF (Fig. 9a,b,c). In addition, H2AX^{-/-} MEF are hypersensitive to the cytotoxic effects of MMC (Fig. 9d), another hallmark of FA. Thus, all avenues lead to the conclusion that H2AX^{-/-} MEF have a FA-like cellular phenotype suggesting that H2AX

is a candidate FA gene downstream FANCD2 monoubiquitination different from FANCI as FANCI is not H2AX (Joenje personal communication).

Analysis of H2AX in candidate FA patients

In order to determine whether H2AX mutations lead to FA in humans, we analysed H2AX in 11 putative patients of unassigned group after subtyping 436 FA patients. In these 11 patients all genes upstream D2 ubiquitination, FANCD2, and BRCA2 were previously disregarded using a combination of retroviral subtyping, FANCD2 and BRCA2 immunoblotting, DNA sequencing and MMC-induced Rad51 foci formation (data not shown). These patients therefore have mutations in a yet uncloned FA gene downstream D2 ubiquitination. H2AX immunoblotting revealed that all 11 patients have H2AX band at the expected size (Figure 10). We detected some heterogeneity in the intensity of the H2AX bands but it was not reproducible in repeated western blots and it was also found in control samples. Full length DNA sequencing of H2AX in all 11 samples confirmed that no H2AX mutations were present in these patients.

Discussion

Understanding the role of the FA/BRCA pathway is essential not only for finding a cure for the disease but also for the general population as the FA pathway is a central node in a complex network of tumour suppressor and genome stability pathways (Surralles et al. 2004; Venkitaraman, 2004). However, the downstream function/s of the FA proteins is/are still a mystery. Here we have focussed our attention into the functional requirements of FANCD2, a key protein of this pathway as it is placed at the convergence point between ATM, ATR, BRCA1, BRCA2/FANCD1, NBS1, Rad51 and the rest of the upstream FA proteins. In the present investigation, human or mouse

fibroblasts with different genetic backgrounds and under various culture conditions were locally irradiated with UVR and the relocation of FANCD2 and other proteins to the site of damage was measured at different times after irradiation. This approach resulted to be a practical and versatile functional assay for the FA/BRCA pathway as only when all the up-stream components of this pathway are fully functional, FANCD2 does normally relocate to the site of damage. Thus, we provide direct evidences for a highly regulated role of the FA/BRCA pathway in response not only to ICL but also to UVR. The fact that FANCD2 deficient cells are only 10-20% more sensitive to UVC than corrected counterparts (Kalb et al., 2004; data not shown) can be explained by the fact that NER normally eliminates UVR-induced lesions in FA cells, thus preventing replication fork collapse and subsequent FA pathway activation. Consistent with this notion, FANCD2 relocates even faster and more in NER deficient XPA cells (Figure 2b). Considering that the FA pathway is involved in apoptosis (Bogliolo et al., 2002), another non-exclusive possibility is that the FA pathway is required for UVR-induced apoptosis and, therefore, that FA cells keep on dividing even in the presence of UVR-induced replication blocking lesions.

As previously reported for DNA crosslinkers (Andreassen et al., 2004, Pichierri and Rosselli, 2004), ATR is also required for FANCD2 phosphorylation, ubiquitination and subsequent relocation to the site of UVR-induced damage. Our results are consistent with the notion that UVR stalled replication forks induce ATR-mediated FANCD2 phosphorylation and that this initial posttranslational modification promotes subsequent monoubiquitination. This is supported by several lines of evidence: (i) the ATR kinase activity is known to be activated after UVR-induced stalled replication forks (Shiloh, 2001); (ii) ATR has no ubiquitin-ligase activity; and (ii) lack of FANCD2 phosphorylation prevents FANCD2 monoubiquitination (Andreassen et al., 2004). An

interesting possibility is that ATR phosphorylation induces a conformational change in FANCD2 allowing further monoubiquitination by FANCL as part of the FA core complex. Consistent with this notion, the ATR-phosphorylation site of FANCD2 is proximal to its monoubiquitination site (Andreassen et al., 2004). Alternatively, ATR could phosphorylate FA complex proteins or other substrates that once phosphorylated are required for FANCD2 monoubiquitination (Andreassen et al., 2004).

Here we showed that the ATR substrate H2AX is not involved in FANCD2 ubiquitination in response to UVR. However H2AX is strictly required for proper relocation of active FANCD2 to the site of damage. Thus, FANCD2 phosphorylation and monoubiquitination are necessary but not sufficient for FANCD2 relocation to the site of damage. Our observations suggest that (i) FANCD2 relocates to UVR spots in concert with H2AX phosphorylation and (ii) that ATR is required for proper H2AX phosphorylation, suggest that ATR mediated phosphorylation of H2AX at stalled replication forks is the final requirement for ub-FANCD2 relocation. Consistent with this final requirement, H2AX deficient cells have a FA-like cellular phenotype. Thus, the data reported here and previously published studies could be integrated in the following model: UVR induces CPD that block replication forks once the cell enters S-phase. The stalled replication forks activate ATR, which will then phosphorylate both FANCD2 and H2AX. Phosphorylated FANCD2 is then monoubiquitinated at K561 by FANCL in concert with the rest of the FA complex and BRCA1. Phosphorylated H2AX then allows accumulation or retention of active FANCD2 to chromatin at the site of stalled replication forks. Once the CPD are repaired, no signal for ATR activation is present, leading to inactivation of the FA pathway and, therefore, to no further recruitment of FANCD2 to the site of damage. Another possibility is that a modification of chromatin structure at the site of irradiation mediated by γ H2AX allows the

accumulation at the damaged site and subsequent interaction of FANCD2, ATR and the rest of the upstream components of the FA/BRCA pathway. However, our observation that FANCD2 is normally activated in the absence of H2AX is against this second possibility.

The role of H2AX in genome stability is controversial. γ H2AX has been reported to be essential for the recruitment of repair/DNA damage response proteins to the site of DNA damage (Paull et al., 2000) or replication break sites (Furuta et al., 2003). However, it is dispensable for the initial recognition of DNA breaks suggesting that is more involved in the retention or accumulation of repair factors than in the actual recruitment (Celeste et al., 2003; Fernandez-Capetillo et al., 2003). γ H2AX may keep the broken chromosome ends tethered together or prevent the premature separation of chromosome ends as a safeguard against exchanges (Bassing and Alt, 2004; Fernandez-Capetillo et al., 2004). γ H2AX is not essential for NHEJ or HR in mammalian cells but, resembling the FA pathway (Bogliolo and Surralles, 2004), it does appear to modulate both pathways probably because it increases the likelihood of assembling a functional repair complex or prevents the premature separation of chromosome ends by reorganizing the chromatin structure surrounding the DSB (Fernandez-Capetillo et al., 2004). Many components of the DNA damage response including BRCA 1, MRN complex, 53BP1, MDC1 and Rad51 form foci that colocalize with preexisting γ H2AX foci. It is known that FANCD2 binds to chromatin once activated by DNA damage and that FANCD2-Ub then recruits BRCA2 into chromatin complexes suggesting that the FA/BRCA pathway and FANCD2-Ub function to load BRCA2 on to chromatin, a process required for normal homology-directed DNA repair (Wang et al., 2004). It is well possible that γ H2AX is the master of ceremonies in this process. Thus, NBS1 is

known to physically interact with γ H2AX at the FHA/BRCT domain (Kobayashi et al., 2002) and, in turn, NBS1 interacts with FANCD2 (Nakanishi et al., 2002).

It did not escape our notice that H2AX could be a candidate gene downstream FANCD2 monoubiquitination. Indeed, several patients have been described with two FANCD2 isoforms and normal BRCA2 protein, including those already assigned to complementation group FANCI. In addition, and resembling FA^{-/-} KO mice and FA patients, H2AX^{-/-} KO mice are viable and exhibit defects in DNA repair, growth defects, male sterility (small testes), modest radiosensitivity, and hypersensitivity to MMC (Celeste et al., 2002; this study). In addition, H2AX deficiency increases tumour susceptibility in synergisms with P53 deficiency (Celeste et al., 2003 in Cell; Bassing et al., 2003), resembling FANCD2 deficient mice. However, our efforts to find H2AX mutations in putative FA patients were not fruitful. As our data provide strong evidence that H2AX is involved in the FA/BRCA pathway downstream FANCD2 monoubiquitination, H2AX could still be a FA gene.

Acknowledgements

We are grateful to Drs. Barbara Cox (Portland, USA), Alan D. D'Andrea (Boston, USA), Leon Mullenders (Leiden, The Netherlands), Anna Genescà (Barcelona, Spain), Mien-Chie Hung (Houston, USA), Penny Jeggo (Sussex, UK), Andre Nussenzweig and Oscar Fernandez-Capetillo (Bethesda, USA), and Margaret Z. Zdzienicka (Leiden, The Netherlands) for sharing cell lines, to Dr. Tsukasa Matsunaga (Kanazawa, Japan) for the gift of the anti CPD antibodies, and to the Universitat Autònoma de Barcelona (UAB) Microscopy Service for image acquisition. This work was partially funded by the

Generalitat de Catalunya (project SGR-00197-2002), the Spanish Ministry of Health and Consumption (projects FIS PI020145 and Red FIS G03/073), the Spanish Ministry of Science and Technology (projects SAF2001-5138 and SAF2003-020328) and the Commission of the European Union (projects FIGH-CT-2002-00217 and FI6R-CT-2003-508842). MB is supported by a postdoctoral Marie Curie fellowship awarded by the Commission of the European Union (contract number HPMF-CT-2001-01330). JS is supported by a “Ramón y Cajal” project entitled “Genome stability and DNA repair” awarded by the Spanish Ministry of Science and Technology and co-financed by the UAB.

References

- Abraham, R.T (2001) Cell cycle checkpoint signalling through the ATM and ATR kinases. *Genes Dev.*, **15**, 2177-2196.
- Andreassen, P.R., D'Andrea, A.D., and Taniguchi, T (2004) ATR couples FANCD2 monoubiquitination to the DNA-damage response. *Genes Dev.*, **18**, 1958-1963.
- Bassing, C.H., Suh, H., Ferguson, D.O., Chua, K.F., Manis, J., Eckersdorff, M., Gleason, M., Bronson, R., Lee, C., and Alt, F.W. (2003) Histone H2AX: a dosage-dependent suppressor of oncogenic translocations and tumors. *Cell*. **114**, 359-370.
- Bassing, C.H., Alt, F.W (2004) H2AX may function as an anchor to hold broken chromosomal DNA ends in close proximity. *Cell Cycle*, **3**, 149-153.

- Bogliolo, M., Cabré, O., Callén, E., Castillo, V., Creus, A., Marcos, R. and Surrallés, J (2002) The Fanconi anaemia genome stability and tumour suppressor network. *Mutagenesis*, **17**, 529-538.
- Bogliolo, M., Taylor, R.M., Caldecott, K.W. and Frosina, G. (2000) Reduced ligation during DNA base excision repair supported by BRCA2 mutant cells. *Oncogene*, **19**, 5781-5787.
- Bushnell, D.A., Cramer, P. and Kornberg, R.D. (2002) Structural basis of transcription: alpha-amanitin-RNA polymerase II cocrystal at 2.8 Å resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **99**, 1218-1222.
- Callén, E., Samper, E., Ramírez, M.J., Creus, A., Marcos, R., Ortega, J.J., Olivé, T., Badell, I., Blasco, M.A. and Surrallés, J. (2002) Breaks at telomeres and TRF2-independent end fusions in Fanconi anemia. *Hum. Mol. Genet.*, **11**, 439-444.
- Castillo, V., Cabré, O. Marcos, R., and Surrallés, J. (2003) Molecular cloning of the *Drosophila* Fanconi anaemia gene FANCD2 cDNA. *DNA Repair*, **2**, 751-758.
- Celeste, A., Difilippantonio, S., Difilippantonio, M.J., Fernandez-Capetillo, O., Pilch, D.R., Sedelnikova, O.A., Eckhaus, M., Ried, T., Bonner, W.M., and Nussenzweig, A. (2003) H2AX haploinsufficiency modifies genomic stability and tumor susceptibility. *Cell*, **114**, 371-383.
- Celeste, A., Fernandez-Capetillo, O., Kruhlak, M.J., Pilch, D.R., Staudt, D.W., Lee, A., Bonner, R.F., Bonner, W.M., and Nussenzweig, A. (2003) Histone H2AX phosphorylation is dispensable for the initial recognition of DNA breaks. *Nat. Cell. Biol.*, **5**, 675-679.
- Celeste, A., Petersen, S., Romanienko, P.J., Fernandez-Capetillo, O., Chen, H.T., Sedelnikova, O.A., Reina-San-Martin, B., Coppola, V., Meffre, E.,

- Difilippantonio, M.J., Redon, C., Pilch, D.R., Oлару, A., Eckhaus, M., Camerini-Otero, R.D., Tessarollo, L., Livak, F., Manova, K., Bonner, W.M., Nussenzweig, M.C., and Nussenzweig, A. (2002) Genomic instability in mice lacking histone H2AX. *Science*, **296**, 922-927.
- Connor, F., Bertwistle, D., Mee, P.J., Ross, G.M., Swift, S., Grigorieva, E., Tybulewicz, V.L. and Ashworth, A. (1997) Tumorigenesis and a DNA repair defect in mice with a truncating Brca2 mutation. *Nature Genet.*, **4**, 423-430.
- D'Andrea, A.D. (2003) The Fanconi road to cancer. *Genes. Dev.* **15**, 1933-1936.
- D'Andrea, A.D. and Grompe, M. (2003) The Fanconi anaemia/BRCA pathway. *Nat. Rev. Cancer.* **3**, 23-34.
- Dronkert, M.L. and Kanaar, R. (2001) Repair of DNA interstrand cross-links. *Mutat Res.*, **486**, 217-247.
- Fernandez-Capetillo, O., Celeste, A., and Nussenzweig, A. (2003) Focusing on foci: H2AX and the recruitment of DNA-damage response factors. *Cell Cycle*, **2**, 426-427.
- Fernandez-Capetillo, O., Lee, A., Nussenzweig, M., Nussenzweig, A. (2004) H2AX: the histone guardian of the genome. *DNA Repair (Amst)*, **3**, 959-967.
- Furuta, T., Takemura, H., Liao, Z.Y., Aune, G.J., Redon, C., Sedelnikova, O.A., Pilch, D.R., Rogakou, E.P., Celeste, A., Chen, H.T., Nussenzweig, A., Aladjem, M.I., Bonner, W.M., and Pommier, Y. (2003) Phosphorylation of histone H2AX and activation of Mre11, Rad50, and Nbs1 in response to replication-dependent DNA double-strand breaks induced by mammalian DNA topoisomerase I cleavage complexes. *J. Biol. Chem.*, **278**, 20303-20312.

- García-Higuera, I., Taniguchi, T., Ganesan, S., Meyn, M.S., Timmers, C., Hejna, J., Grompe, M. and D'Andrea, A.D. (2001) Interaction of the Fanconi anemia proteins and BRCA1 in a common pathway. *Mol. Cell*, **7**, 249-262.
- Godthelp, B.C., Artwert, F., Joenje, H. and Zdzienicka, M.Z. (2002) Impaired DNA damage-induced nuclear Rad51 foci formation uniquely characterizes Fanconi anemia group D1. *Oncogene*, **21**, 5002-5005.
- Hanenberg H, Batish SD, Pollok KE, Vieten L, Verlander PC, Leurs C, Cooper RJ, Gottsche K, Haneline L, Clapp DW, Lobitz S, Williams DA, Auerbach AD (2002). Phenotypic correction of primary Fanconi anemia T cells with retroviral vectors as a diagnostic tool. *Exp Hematol.*, **30**, 410-420.
- Howlett, N.G., Taniguchi, T., Olson, S., Cox, B., Waisfisz, Q., De Die-Smulders, C., Persky, N., Grompe, M., Joenje, H., Pals, G., Ikeda, H., Fox, E.A. and D'Andrea, A.D. (2002) Biallelic inactivation of BRCA2 in Fanconi anemia. *Science*, **297**, 606-609.
- Hussain, S., Wilson, J.B., Medhurst, A.L., Hejna, J., Witt, E., Ananth, S., Davies, A., Masson, J.Y., Moses, R., West, S.C., de Winter, J.P., Ashworth, A., Jones, N.J., Mathew, C.G. (2004) Direct interaction of FANCD2 with BRCA2 in DNA damage response pathways. *Hum. Mol. Genet.*, **13**, 1241-1248.
- Kalb, R., Duerr, M., Wagner, M., Herterich, S., Gross, M., Digweed, M., Joenje, H., Hoehn, H., and Schindler, D. (2004) Lack of sensitivity of primary Fanconi's anemia fibroblasts to UV and ionizing radiation. *Radiat. Res.*, **161**, 318-325.
- Kobayashi, J., Tauchi, H., Sakamoto, S., Nakamura, A., Morishima, K., Matsuura, S., Kobayashi, T., Tamai, K., Tanimoto, K., and Komatsu, K. (2002) NBS1 localizes to gamma-H2AX foci through interaction with the FHA/BRCT domain. *Curr Biol.*, **12**, 1846-51.

- Kutler, D.I., Singh, B., Satagopan, J., Batish, S.D., Berwick, M., Giampietro, P.F., Hanenberg, H. and Auerbach, A.D. (2003) A 20-year perspective on the International Fanconi Anemia Registry (IFAR). *Blood*, **101**, 1249-1256.
- Levitus, M., Rooimans, M.A., Steltenpool, J., Cool, N.F., Oostra, A.B., Mathew, C.G., Hoatlin, M.E., Waisfisz, Q., Arwert, F., de Winter, J.P., and Joenje, H. (2004) Heterogeneity in Fanconi anemia: evidence for 2 new genetic subtypes. *Blood*, **103**, 2498-2503.
- Lupardus, P.J., Byun, T., Yee, M.C., Hekmat-Nejad, M., and Cimprich, K.A (2002) A requirement for replication in activation of the ATR-dependent DNA damage Checkpoint. *Genes Dev.*, **16**, 2327-2332.
- McGkynn, P., Lloyd, R.G. (2002) Recombinational repair and restart of damage replication forks. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **3**, 859-870.
- Meetei, A.R., de Winter, J.P., Medhurst, A.L., Wallisch, M., Waisfisz, Q., van de Vrugt, H.J., Oostra, A.B., Yan, Z., Ling, C., Bishop, C.E., Hoatlin, M.E., Joenje, H. and Wang, W. (2003a). A novel ubiquitin ligase is deficient in Fanconi anemia. *Nat. Genet.*, **35**, 165-170.
- Meetei, A.R., Sechi, S., Wallisch, M., Yang, D., Young, M.K., Joenje, H., Hoatlin, M.E., and Wang, W. (2003b) A multiprotein nuclear complex connects Fanconi anemia and Bloom syndrome. *Mol. Cell. Biol.*, **23**, 3417-3426.
- Miller, S.A., Dykes, D.D., Polesky, H.F. (1988) A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.*, **16**, 1215.
- Nakanishi, K., Taniguchi, T., Ranganathan, V., New, H.V., Moreau, L.A., Stotsky, M., Mathew, C.G., Kastan, M.B., Weaver, D.T. and D'Andrea, A.D. (2002) Interaction of FANCD2 and NBS1 in the DNA damage response. *Nat. Cell Biol.*, **12**, 913-920.

- O'Driscoll, M., Ruiz-Perez, V.L., Woods, C.G., Jeggo, P.A., and Goodship, J.A. (2003) A splicing mutation affecting expression of ataxia-telangiectasia and Rad3-related protein (ATR) results in Seckel syndrome. *Nat. Genet.*, **33**, 497-501.
- Patel, K.J., Yu, V.P., Lee, H., Corcoran, A., Thistlethwaite, F.C., Evans, M.J., Colledge, W.H., Friedman, L.S., Ponder, B.A. and Venkitaraman, A.R. (1998) Involvement of Brca2 in DNA repair. *Mol. Cell*, **1**, 347-357.
- Paull, T.T., Rogakou, E.P., Yamazaki, V., Kirchgessner, C.U., Gellert, M., and Bonner, W.M (2000) *Curr Biol.*, **10**, 886-895.
- Pichierri, P., and Rosselli, F. (2004a) Fanconi anemia proteins and the S phase checkpoint. *Cell Cycle*, **3**, 698-700.
- Pichierri, P., and Rosselli, F. (2004b) The DNA crosslink-induced S-phase checkpoint depends on ATR-CHK1 and ATR-NBS1-FANCD2 pathways. *EMBO J.*, **10**, 1178-1187.
- Pichierri, P., Averbeck, D., and Rosselli, F. (2002) DNA cross-link-dependent RAD50/MRE11/NBS1 subnuclear assembly requires the Fanconi anemia C protein. *Hum. Mol. Genet.*, **11**, 2531-2546.
- Pichierri, P., Franchitto, A., and Rosselli, F. (2004) BLM and the FANC proteins collaborate in a common pathway in response to stalled replication forks. *EMBO J.*, **23**, 3154-3163.
- Rogakou, E.P., Pilch, D.R., Orr, A.H., Ivanova, V.S., and Bonner, W.M. (1998) DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J. Biol. Chem.*, **273**, 5858-5868.
- Rothfuss, A., and Grompe, M. (2004) Repair kinetics of genomic interstrand DNA cross-links: evidence for DNA double-strand break-dependent activation of the Fanconi anemia/BRCA pathway. *Mol. Cell. Biol.*, **24**, 123-134.

- Shiloh, Y. (2001) ATM and ATR: networking cellular responses to DNA damage. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **11**, 71-77.
- Shimamura, A., de Oca, R.M., Svenson, J.L., Haining, N., Moreau, L.A., Nathan, D.G. and D'Andrea A.D. (2002) A novel diagnostic screen for defects in the Fanconi anemia pathway. *Blood*, **100**, 4649-4654.
- Surrallés, J., Jackson, S.P., Jasin, M., Kastan, M.B., West, S.C., and Joenje, H. (2004) Molecular cross talk among chromosome fragility syndromes. *Genes Dev.*, **18**, 1359-1370.
- Surrallés, J., Ramírez, M.J., Marcos, R., Natarajan, A.T. and Mullenders, L.H.F. (2002) Clusters of transcription-coupled repair in the human genome, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 10571-10574.
- Tanaka, M., Lai, J.S. and Herr, W. (1992) Promoter-selective activation domains in Oct-1 and Oct-2 direct differential activation of an snRNA and mRNA promoter. *Cell*, **68**, 755-767.
- Taniguchi, T., Garcia-Higuera, I., Andreassen, P.R., Gregory, R.C., Grompe, M. and D'Andrea, A.D. (2002a) S-phase-specific interaction of the Fanconi anemia protein, FANCD2, with BRCA1 and RAD51. *Blood*, **100**, 2414-2420.
- Taniguchi, T., Garcia-Higuera, I., Xu, B., Andreassen, P.R., Gregory, R.C., Kim, S.T., Lane, W.S., Kastan, M.B. and D'Andrea, A.D. (2002b) Convergence of the Fanconi anemia and ataxia telangiectasia signaling pathways. *Cell*, **109**, 459-472.
- Tercero, J.A., Longhese, M.P., and Diffley, J.F (2003) A central role for DNA replication forks in checkpoint activation and response. *Mol Cell.*, **11**, 1323-1336.

- Venkitaraman, A.R. (2002) Cancer susceptibility and the functions of BRCA1 and BRCA2. *Cell*, **108**, 171-182.
- Venkitaraman, A.R. (2004) Tracing the network connecting BRCA and Fanconi anaemia proteins. *Nat. Rev. Cancer*, **4**, 266-276.
- Volker, M., Mone, M.J., Karmakar, P., van Hoffen, A., Schul, W., Vermeulen, W., Hoeijmakers, J.H., van Driel, R., van Zeeland, A.A. and Mullenders, L.H. (2001) Sequential assembly of the nucleotide excision repair factors in vivo. *Mol. Cell*, **8**, 213-224.
- Wang, X., Andreassen, P.R., and D'Andrea, A.D. (2004) Functional interaction of monoubiquitinated FANCD2 and BRCA2/FANCD1 in chromatin. *Mol. Cell Biol.*, **24**, 5850-5862.
- Ward, I.M., and Chen, J. (2001) Histone H2AX is phosphorylated in an ATR-dependent manner in response to replicational stress. *J. Biol. Chem.*, **276**, 47759-47762.

Table 1
Long term dynamics of FANCD2 relocation to UVC-induced DNA damage after local irradiation in wild type cells

| Time after UVC (h) | Number of UV-spots per cell (mean \pm SD)* | % of UV-spots with FANCD2 signal (mean \pm SD)* |
|--------------------|----------------------------------------------|---------------------------------------------------|
| 0 | 0.73 \pm 0.08 | 0.5 \pm 0.7 |
| 6 | 0.68 \pm 0.09 | 85.0 \pm 8.9 |
| 12 | 0.54 \pm 0.15 | 88.2 \pm 3.1 |
| 24 | 0.35 \pm 0.11 | 88.9 \pm 1.5 |
| 36 | 0.19 \pm 0.06 | 76.5 \pm 9.2 |
| 48 | 0.05 \pm 0.03 | 76.2 \pm 15.8 |

*mean of 3 experiments

Legend to Figures:

Figure 1:

FANCD2 relocates to the sites of UVC radiation. Cells irradiated through a 5 μ m-pore filter with UVC present FANCD2 signal at the site of damage 6h after irradiation but not immediately after irradiation (1a). FANCD2 relocates to UV-spots in a time-dependent manner, following a specific relocation dynamics. Means and standard deviations of 3 experiments are shown (1b).

Figure 2:

PCNA and Rad51 co-localize with FANCD2 at the site of irradiation following the same dynamics

Figure 3:

FANCD2 relocation to the site of UVR-induced damage is highly regulated. FANCD2 does not relocate to the site of UV irradiation in cells deficient in BRCA1, FANCA or in FANCD2 deficient cells retrovirally transduced with a K561R-FANCD2 cDNA. However, BRCA2 is not required for normal FANCD2 relocation. Means and standard deviations of 3 experiments are shown.

Figure 4:

UVR induces FANCD2 phosphorylation and monoubiquitination in a time dependent manner. Cell extracts were collected immediately or 1, 3 and 6 h after 20J/m² of UVR radiation and incubated with and without lambda-phosphatase (Fig. 4).

Figure 5:

FANCD2 activation and relocation to the site of UV irradiation is mediated by ATR but independent of ATM. ATR dependence in FANCD2 relocation to the site of damage.

Figure 6

Relocation of monoubiquitinated FANCD2 to UV induced damage requires H2AX. FANCD2 does not relocate in H2AX deficient MEFs (6a). H2AX is not required for UVR-induced FANCD2 monoubiquitination (6b).

Figure 7:

FANCD2 relocation dynamics correlates with H2AX phosphorylation. UVC-irradiation results in H2AX phosphorylation at the site of irradiation (7a) and the dynamics of FANCD2 phosphorylation is identical to the dynamics of FANCD2 relocation (means and standard deviations of 3 experiments are shown) (7b). H2AX phosphorylation site is required for FANCD2 relocation (7c)

Figure 8:

ATR but not FANCD2 is required for normal dynamics of H2AX phosphorylation at the site of UV-irradiation.

Figure 9:

Excess of MMC-induced chromatid type aberrations (Fig. 9a) and radials (Fig. 9b,c) in MEF deficient in H2AX. H2AX deficient cells are hypersensitive to MMC (fig 9c).

Figure 10:

Normal H2AX in 11 putative FA patients

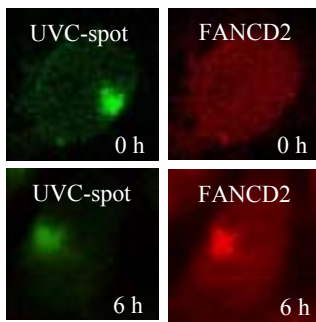
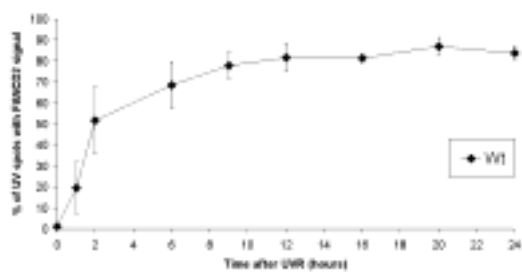
Figure 1:**a****b**

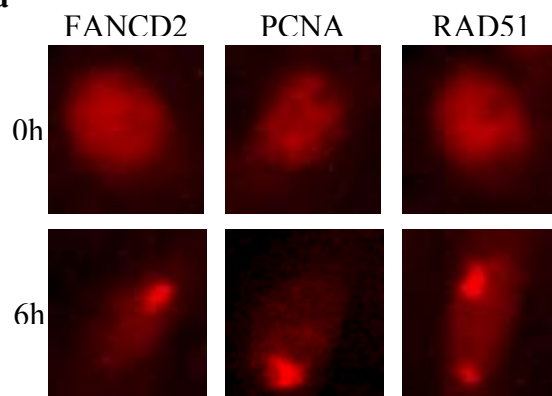
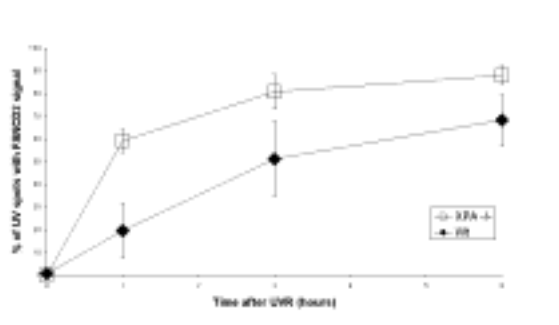
Figure 2:**a****b**

Figure 3

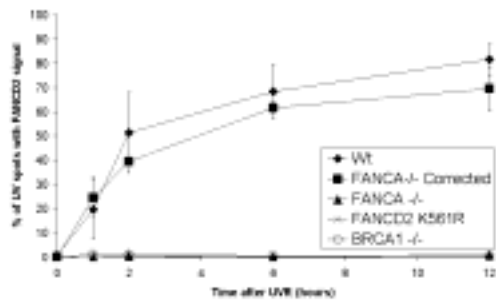


Figure 4:

Figure 5:

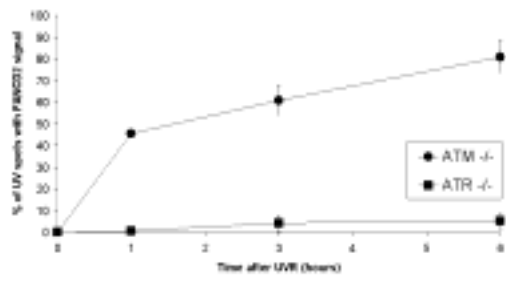
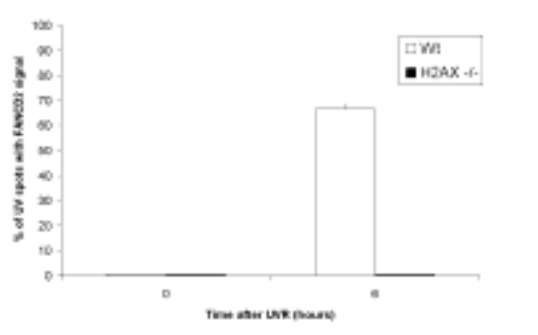


Figure 6

a



b

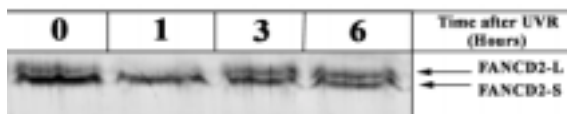


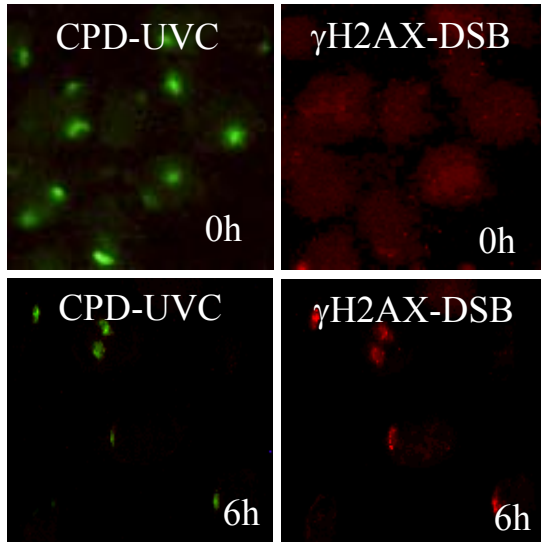
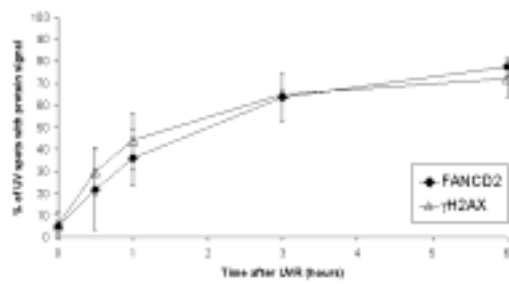
Figure 7:**A****b**

Figure 8:

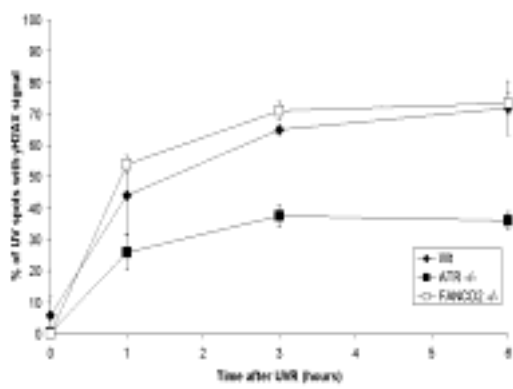


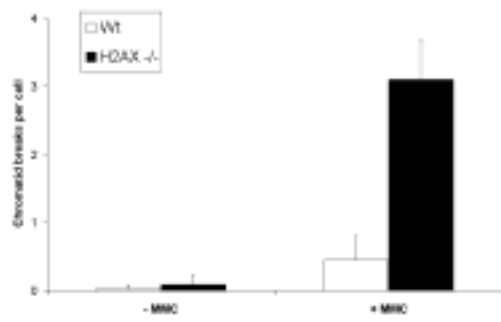
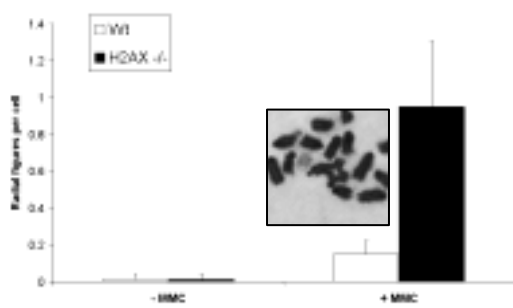
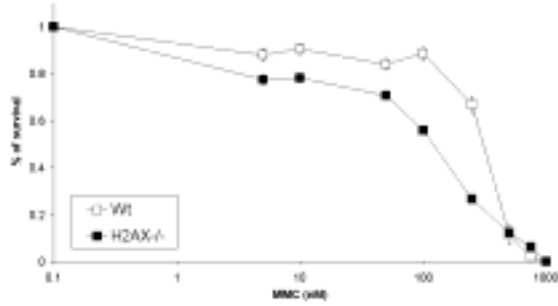
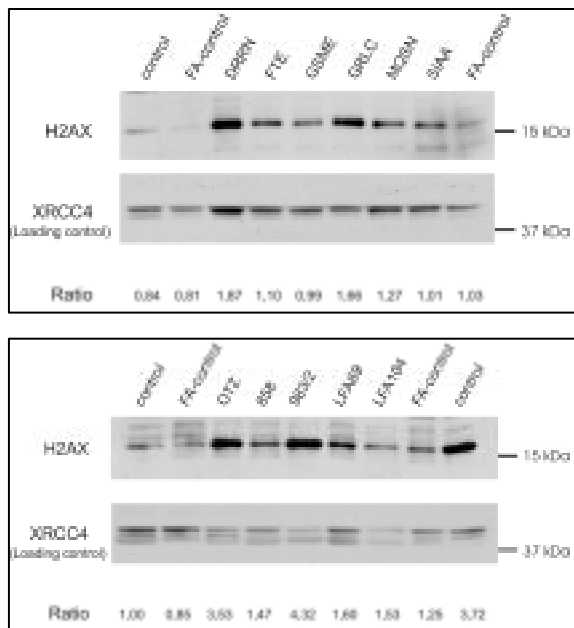
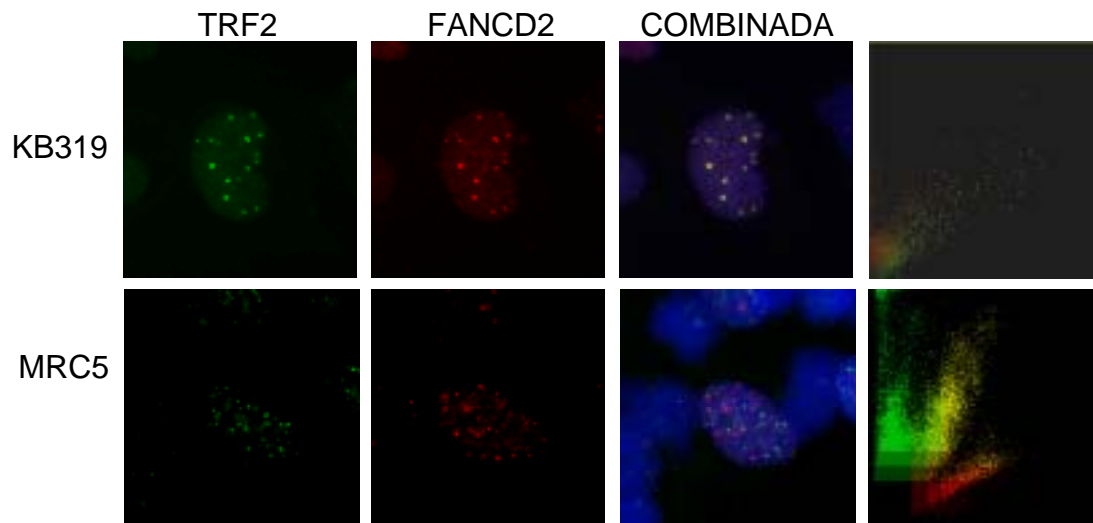
Figure 9:**a****b****c**

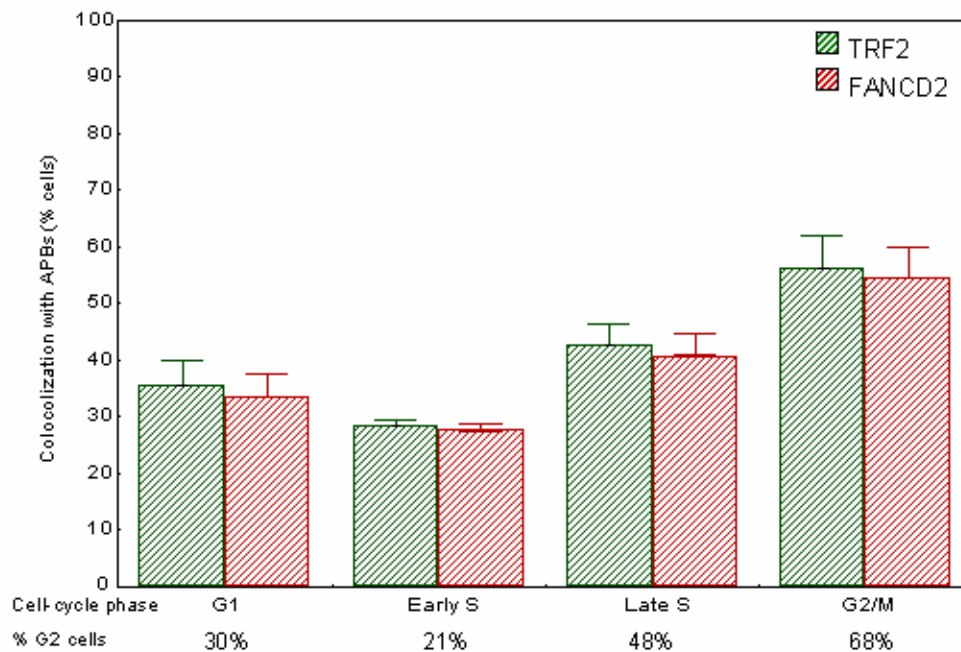
Figure 10

1)



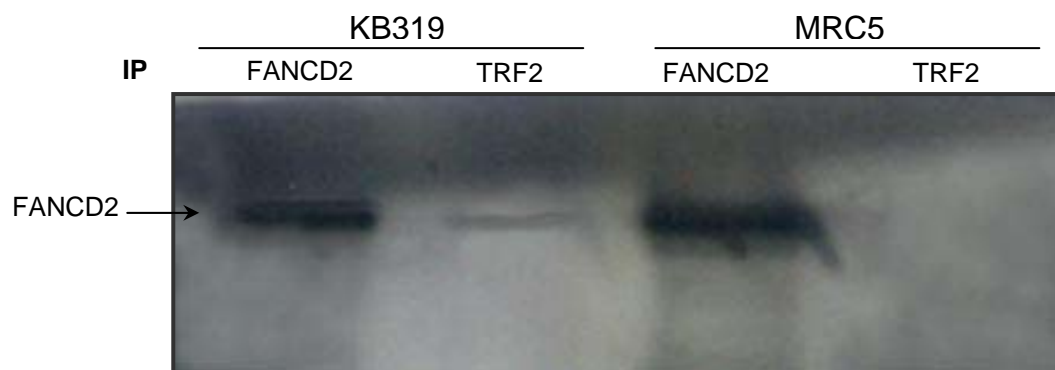
Colocalización de TRF2 y FANCD2 en células ALT (KB319), comparado con células con telomerasa (MRC5), mediante análisis inmunohistoquímico.

2)



La colocalización de FANCD2 con TRF2 es dependiente del ciclo y está correlacionada positivamente con el aumento de células en fase G2.

3)

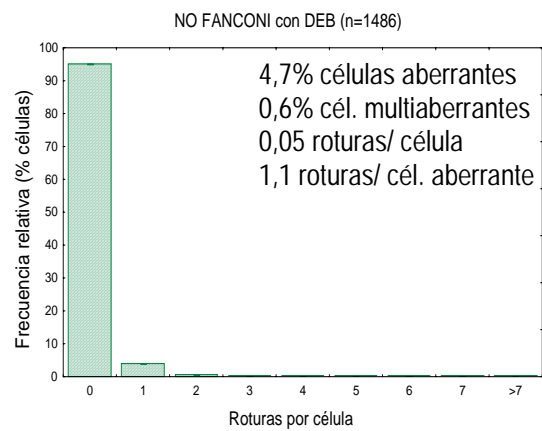
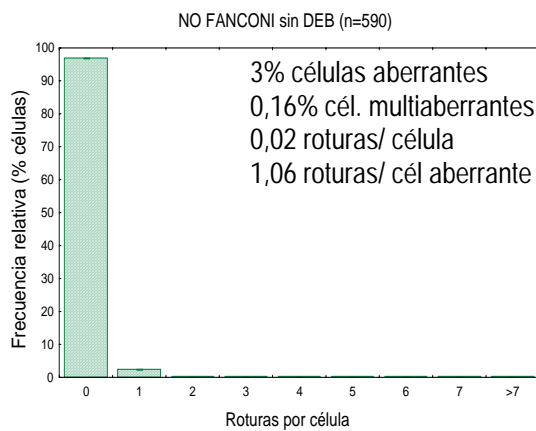
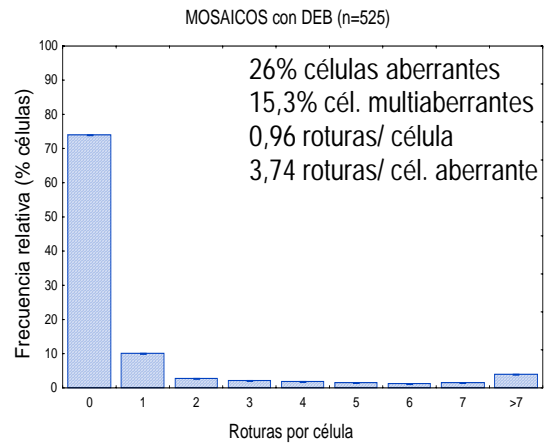
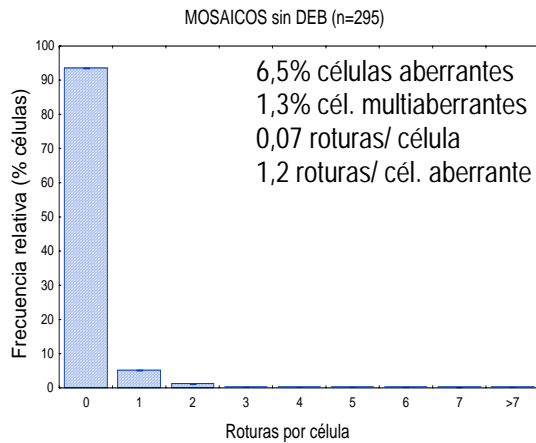
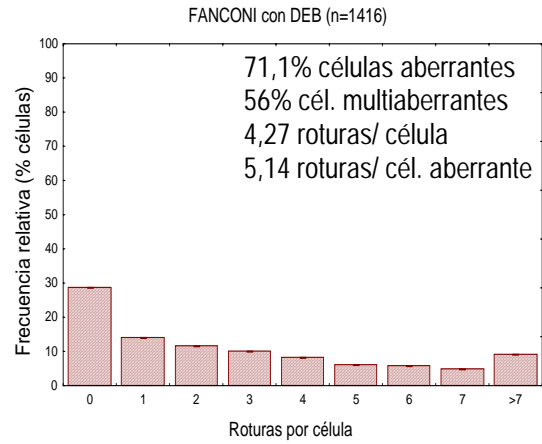
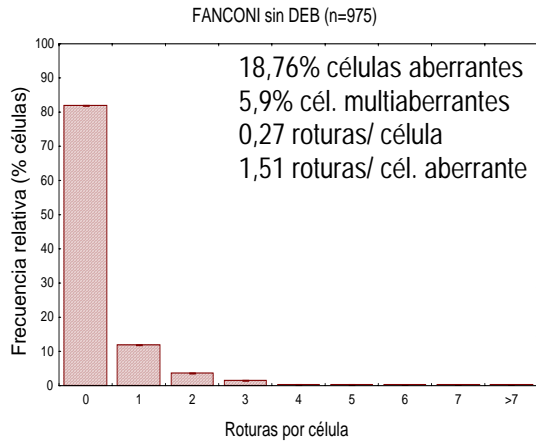


El análisis de FANCD2 por *western blot* tras inmunoprecipitar con TRF2 o FANCD2 en líneas ALT o con telomerasa, nos muestra que FANCD2 únicamente coimmunoprecipita con TRF2 en el caso de las células ALT (línea 2).

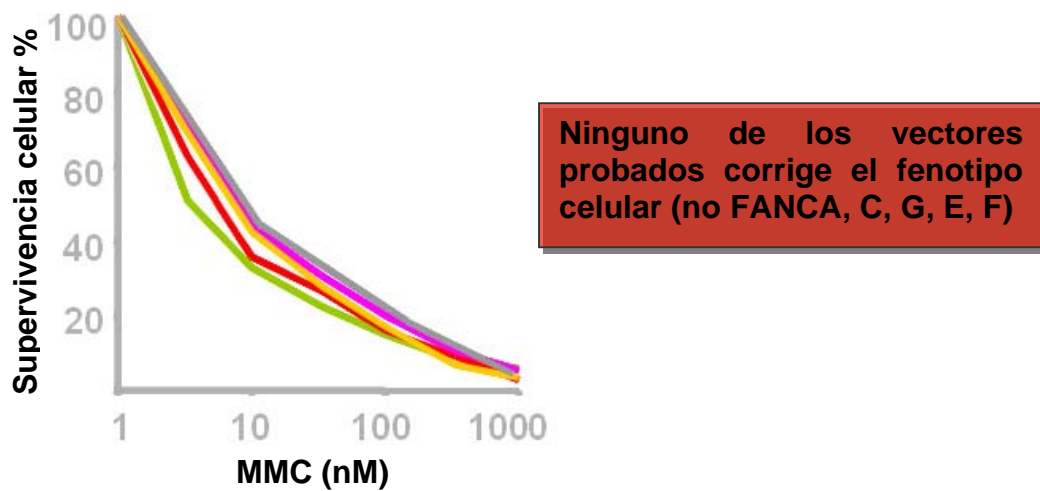
| CÓDIGO | SEXO | ETNIA | AC/ 100 CÉL. | | % CÉL. AB. | | % CÉL. MULTIAB. | | AC/CÉL. | | AC/CÉL. AB. | | DIAGNÓSTICO |
|--------|------|-----------|-----------------|-------|------------|------|-----------------|------|---------|-------|-------------|-------|-------------|
| | | | -DEB | +DEB | -DEB | +DEB | -DEB | +DEB | -DEB | +DEB | -DEB | +DEB | |
| FA 1 | M | Caucásica | 8 | 4 | 8 | 4 | 0 | 0 | 0,08 | 0,04 | 1 | 1 | NO FANCONI |
| FA 5 | F | Caucásica | 4 | 66 | 4 | 20 | 0 | 6 | 0,04 | 0,6 | 1 | 3,13 | MOSAICO |
| FA 13 | M | Caucásica | 24 | 500 | 24 | 88 | 0 | 72 | 0,24 | 5 | 1 | 5,6 | FANCONI |
| FA 27 | M | Caucásica | 20 | 460 | 12 | 88 | 4 | 80 | 0,2 | 4,6 | 1,6 | 5,22 | FANCONI |
| FA 47 | M | Caucásica | 56 | 254 | 32 | 78 | 8 | 60 | 0,56 | 2,54 | 1,75 | 3,25 | FANCONI |
| FA 48 | F | Caucásica | | 212 | | 68 | | 50 | | 2,12 | | 3,11 | FANCONI |
| FA 49 | M | Caucásica | 16 | 48 | 12 | 36 | 0 | 5 | 0,16 | 0,48 | 1,3 | 1,3 | ¿? |
| FA 50 | M | Caucásica | 20 | 112 | 20 | 50 | 0 | 22 | 0,20 | 1,12 | 1 | 2,24 | FANCONI |
| FA 52 | M | Caucásica | 28 | 124 | 24 | 26 | 4 | 18 | 0,28 | 1,24 | 1,16 | 4,76 | MOSAICO |
| FA 55 | M | Gitana | 0 | 244,4 | 0 | 77,7 | 0 | 55,5 | 0 | 2,44 | 0 | 3,14 | FANCONI |
| FA 56 | F | Caucásica | 12 | 338 | 8 | 70 | 0 | 50 | 0,12 | 3,38 | 1,5 | 4,8 | FANCONI |
| FA 58 | F | Caucásica | 16 | 960 | 16 | 100 | 0 | 100 | 0,16 | 9,6 | 1 | 9,6 | FANCONI |
| FA 59 | F | Caucásica | 32 | 680 | 16 | 76 | 8 | 76 | 0,32 | 6,8 | 2 | 8,9 | FANCONI |
| FA 62 | F | Caucásica | 220 | 1212 | 64 | 100 | 44 | 100 | 2,2 | 12,12 | 3,43 | 12,12 | FANCONI |
| FA 66 | M | Caucásica | 8 | 14 | 8 | 10 | 0 | 4 | 0,08 | 0,14 | 1 | 1,4 | NO FANCONI |
| FA 69 | M | Caucásica | 52 | 332 | 32 | 84 | 8 | 76 | 0,52 | 3,32 | 1,62 | 3,9 | FANCONI |
| FA 70 | M | Caucásica | 4 | 178 | 4 | 50 | 0 | 30 | 0,04 | 1,78 | 1 | 3,56 | FANCONI |
| FA 71 | M | Caucásica | 12 | 310 | 12 | 76 | 0 | 54 | 0,12 | 3,1 | 1 | 4,07 | FANCONI |
| FA 72 | F | Caucásica | 44 | 484 | 24 | 100 | 8 | 76 | 0,44 | 4,84 | 1,83 | 6,3 | FANCONI |
| FA 74 | M | Caucásica | 0 | 138 | 0 | 52 | 0 | 26 | 0 | 1,38 | 0 | 2,6 | FANCONI |
| FA 75 | F | Caucásica | 40 | 412 | 24 | 80 | 4 | 64 | 0,4 | 4,12 | 1,62 | 5,15 | FANCONI |
| FA 77 | F | Caucásica | 4 | 2 | 4 | 2 | 0 | 0 | 0,04 | 0,02 | 1 | 1 | NO FANCONI |
| FA 78 | F | Caucásica | 12 | 150 | 8 | 32 | 4 | 20 | 0,12 | 1,5 | 1,5 | 4,6 | MOSAICO |
| FA 79 | M | Caucásica | | 12 | | 8 | | 4 | | 0,12 | | 1,5 | NO FANCONI |
| FA 81 | M | Caucásica | 0 | 8 | 0 | 8 | 0 | 0 | 0 | 0,08 | 0 | 1 | NO FANCONI |
| FA 82 | F | Caucásica | 16 | 236 | 12 | 64 | 4 | 48 | 0,16 | 2,36 | 1,3 | 3,68 | FANCONI |
| FA 83 | F | Caucásica | 8 | 0 | 4 | 0 | 4 | 0 | 0,08 | 0 | 2 | 0 | NO FANCONI |
| FA 84 | F | Caucásica | 28 | 548 | 20 | 84 | 8 | 56 | 0,28 | 5,48 | 1,4 | 6,52 | FANCONI |
| FA 88 | F | Caucásica | 44 | 376 | 32 | 90 | 0 | 64 | 0,44 | 3,76 | 1 | 4,17 | FANCONI |
| FA 89 | F | Caucásica | 4 | 6 | 4 | 6 | 0 | 0 | 0,04 | 0,06 | 1 | 1 | NO FANCONI |
| FA 90 | F | Caucásica | 5 | 104 | 5 | 14,6 | 0 | 10,6 | 0,05 | 1,04 | 1 | 7,12 | MOSAICO |
| FA 91 | M | Caucásica | 36 | 380 | 16 | 70 | 12 | 70 | 0,36 | 3,80 | 2,25 | 5,40 | FANCONI |
| FA 92 | F | Caucásica | 4 | 10 | 4 | 10 | 0 | 0 | 0,04 | 0,1 | 1 | 1 | NO FANCONI |
| FA 94 | F | Caucásica | 0 | 210 | 0 | 36 | 0 | 28 | 0 | 2,1 | 0 | 5,83 | MOSAICO |
| FA 102 | F | Caucásica | 12 | 532 | 8 | 97 | 4 | 80 | 0,12 | 5,32 | 1,5 | 5,48 | FANCONI |
| FA 103 | M | Gitana | 16 | 780 | 16 | 95 | 0 | 95 | 0,16 | 7,8 | 1 | 8,2 | FANCONI |
| FA 104 | F | Caucásica | 20 | 444 | 16 | 92 | 4 | 76 | 0,2 | 4,4 | 1,25 | 4,82 | FANCONI |
| FA 105 | F | Caucásica | 16 | 296 | 12 | 72 | 0 | 48 | 0,16 | 2,96 | 1,3 | 4,1 | FANCONI |

| | | | | | | | | | | | | | |
|--------|---|-----------|-----|------|-----|------|----|------|------|------|-----|------|------------|
| FA 106 | M | Caucásica | 12 | 280 | 8 | 64 | 4 | 46 | 0,12 | 2,48 | 1,5 | 4,37 | FANCONI |
| FA 108 | F | Gitana | 12 | 176 | 12 | 68 | 0 | 44 | 0,12 | 1,70 | 1 | 2,5 | FANCONI |
| FA 109 | F | Gitana | 96 | 372 | 48 | 94 | 28 | 76 | 0,96 | 3,72 | 2 | 3,95 | FANCONI |
| FA 110 | F | Caucásica | 16 | 256 | 16 | 64 | 0 | 52 | 0,16 | 2,56 | 1 | 4 | FANCONI |
| FA 111 | F | Caucásica | 8 | 2 | 8 | 2 | 0 | 0 | 0,08 | 0,02 | 1 | 1 | NO FANCONI |
| FA 114 | F | Caucásica | | 4 | | 4 | | 0 | | 0,04 | | 1 | NO FANCONI |
| FA 116 | M | Caucásica | 12 | 940 | 12 | 100 | 0 | 90 | 0,12 | 9,4 | 1 | 9,4 | FANCONI |
| FA 121 | M | Caucásica | 12 | 60 | 12 | 18 | 0 | 12 | 0,12 | 0,6 | 1 | 3,33 | MOSAICO |
| FA 122 | F | Gitana | 60 | 666 | 36 | 79 | 12 | 75 | 0,6 | 6,6 | 1,6 | 8,4 | FANCONI |
| FA 123 | M | Gitana | 12 | 318 | 8 | 80 | 4 | 62 | 0,12 | 3,18 | 1,5 | 3,97 | FANCONI |
| FA 124 | F | Caucásica | 0 | 90 | 0 | 26 | 0 | 14 | 0 | 0,9 | 0 | 3,46 | MOSAICO |
| FA 125 | F | Caucásica | 0 | 38 | 0 | 10 | 0 | 6 | 0 | 0,38 | 0 | 3,8 | MOSAICO |
| FA 126 | M | Caucásica | 4 | 423 | 4 | 69,2 | 0 | 53,8 | 0,04 | 4,23 | 1 | 6,11 | FANCONI |
| FA 136 | M | Caucásica | 60 | 1000 | 36 | 100 | 12 | 83,3 | 0,6 | 10 | 1,6 | 10 | FANCONI |
| FA 142 | F | Caucásica | | 4 | | 4 | | 0 | | 0,04 | | 1 | NO FANCONI |
| FA 144 | F | Caucásica | 0 | 12 | 0 | 10 | 0 | 2 | 0 | 0,12 | 0 | 1,2 | NO FANCONI |
| FA 145 | F | Caucásica | 24 | 378 | 20 | 82 | 0 | 60 | 0,24 | 3,78 | 1,2 | 4,60 | FANCONI |
| FA 148 | F | Caucásica | | 4 | | 4 | | 0 | | 0,04 | | 1 | NO FANCONI |
| FA 149 | M | Caucásica | 0 | 4 | 0 | 4 | 0 | 0 | 0 | 0,04 | 0 | 1 | NO FANCONI |
| FA 153 | M | Caucásica | | 112 | | 32 | | 20 | | 1,12 | | 3,5 | MOSAICO |
| FA 154 | F | Caucásica | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | NO FANCONI |
| FA 155 | M | Caucásica | 20 | 170 | 8 | 58 | 8 | 36 | 0,2 | 17 | 2,5 | 2,9 | FANCONI |
| FA 156 | F | Caucásica | | 4 | | 4 | | 0 | | 0,04 | | 1 | NO FANCONI |
| FA 157 | F | Caucásica | 16 | 88 | 12 | 36 | 0 | 16 | 0,16 | 0,88 | 1,3 | 2,4 | MOSAICO |
| FA 158 | M | Caucásica | 12 | 106 | 8 | 38 | 4 | 20 | 0,12 | 1,06 | 1,5 | 2,78 | MOSAICO |
| FA 160 | F | Caucásica | 4 | 12 | 4 | 10 | 0 | 2 | 0,04 | 0,12 | 1 | 1,2 | NO FANCONI |
| FA 161 | F | Caucásica | | 6 | | 4 | | 0 | | 0,06 | | 1,5 | NO FANCONI |
| FA 162 | M | Caucásica | 0 | 4 | 0 | 4 | 0 | 0 | 0 | 0,04 | 0 | 1 | NO FANCONI |
| FA 163 | F | Gitana | 16 | 106 | 16 | 44 | 0 | 16 | 0,16 | 1,06 | 1 | 2,4 | FANCONI |
| FA 164 | M | Caucásica | 28 | 580 | 20 | 92 | 8 | 80 | 0,28 | 5,80 | 1,4 | 6,3 | FANCONI |
| FA 166 | F | Caucásica | 84 | 440 | 40 | 80 | 16 | 68 | 0,84 | 4,4 | 2,1 | 5,5 | FANCONI |
| FA 167 | F | Caucásica | | 20 | | 16 | | 4 | | 0,2 | | 1,25 | NO FANCONI |
| FA 178 | M | Caucásica | 8 | 504 | 4 | 97 | 4 | 91 | 0,08 | 5,04 | 2 | 5,1 | FANCONI |
| FA 169 | M | Caucásica | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | NO FANCONI |
| FA 170 | M | Caucásica | 4 | 140 | 4 | 64 | 0 | 24 | 0,04 | 1,4 | 1 | 2,18 | FANCONI |
| FA 171 | M | Caucásica | 6,6 | 10 | 6,6 | 8 | 0 | 2 | 0,06 | 0,1 | 1 | 1,25 | NO FANCONI |
| FA 173 | M | Caucásica | 0 | 8 | 0 | 4 | 0 | 8 | 0 | 0,08 | 0 | 2 | NO FANCONI |
| FA 174 | F | Caucásica | | 4 | | 4 | | 0 | | 0,04 | | 1 | NO FANCONI |
| FA 185 | M | Caucásica | | 6 | | 6 | | 0 | | 0,06 | | 1 | NO FANCONI |

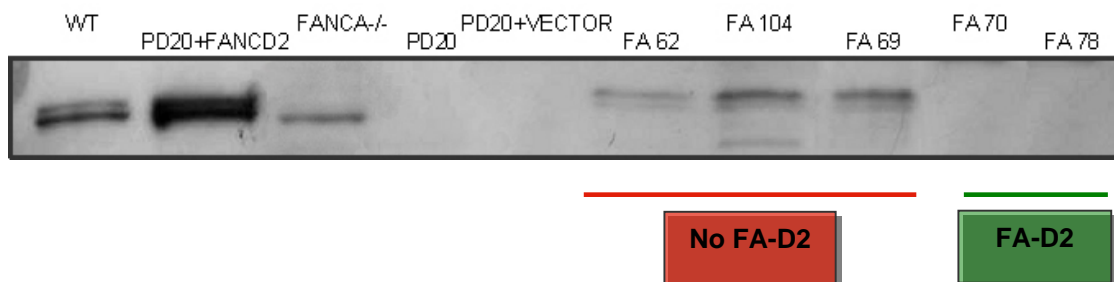
AC, Aberraciones cromosómicas; AB, aberrante



1. Subtipaje mediante trasfección retroviral:



2. Análisis de FANCD2 mediante western blot



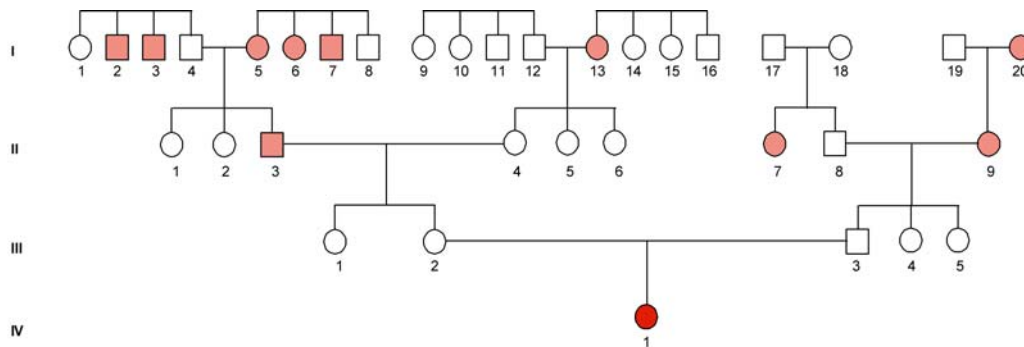
La ausencia de proteína FANCD2 en los carriles correspondientes a los pacientes FA 70 y FA 78 indica que ambos pertenecen al grupo de complementación FA-D2.

Los pacientes FA 62, FA 104 y FA 69 no poseen mutaciones en el gen *FANCD2* o en algún gen del complejo, por lo que se hacen necesarios otros estudios.

3. Estudio del historial familiar de cáncer de los pacientes FA 62, 104 y 69

FA 69 y 104: No se ha descrito ningún caso de cáncer en estas dos familias

FA 62:



I2: Fallecido, cáncer desconocido

I3: Fallecido, cáncer desconocido

I5: Fallecido, cáncer de estómago (56 años)

I6: Fallecido, cáncer desconocido

I7: Fallecido, cáncer desconocido

I13: Vivo, cáncer de piel y tumores locales en la ingle (86 años, primer cáncer diagnosticado a la edad de 78)

I20: Fallecido, diagnóstico de tuberculosis, pero podría tratarse de cáncer (murió con 20-30 años)

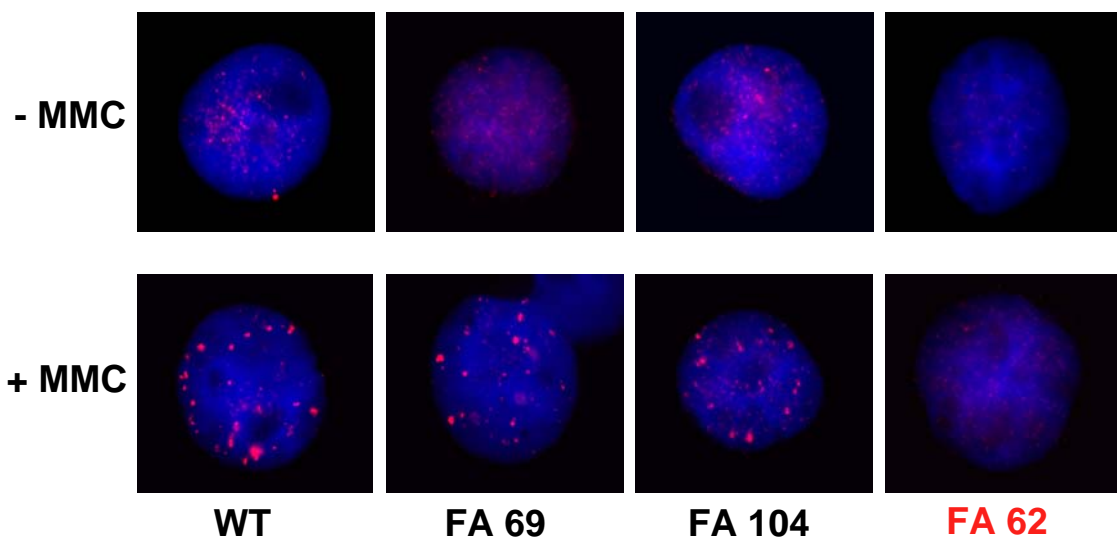
II3: Vivo, cáncer de vejiga (58 años, diagnosticado a la edad de 52)

II7: Fallecido, cáncer de estómago

II9: Vivo, cáncer de pecho bilateral (62 años, diagnosticado a la edad de 55)

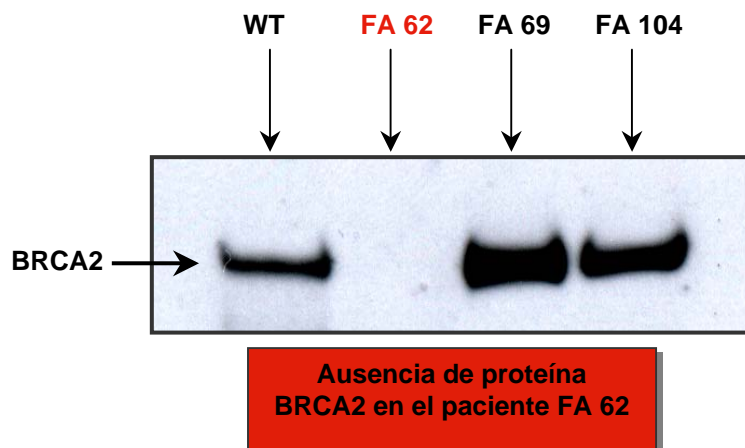
IV1: Fallecido, Fanconi anemia. Causa de la muerte, [tumor de Wilms](#) (1 año)

4. Análisis de la inducción de focos de RAD51 tras el tratamiento con ICLs



En los linfocitos del paciente FA 62 no se induce la formación de focos de RAD51 tras el tratamiento con MMC, propio de mutaciones en BRCA2.

5. Western blot de BRCA2



6. Análisis por western blot de otros candidatos en los pacientes FA 69 y FA 104

SNM1A
XPF
ERCC1
RAD54L
RAD51A
RAD51B
RAD51C
RAD51D
XRCC2
XRCC3
EMSY
H2AX
SCC1...



- Mutación puntual
- Mutación de *splicing*
- ▲ Microdelección
- ▼ Microinserción
- Delección

Esquema del gen *FANCA* en el que se representan las mutaciones halladas hasta la fecha en los pacientes FA españoles analizados.