

Análisis de la variabilidad genética de la anemia de Fanconi en España

**Dept. de Genètica i Microbiologia
Universitat Autònoma de Barcelona**

**Tesis doctoral
Maria Castellà Castellà
Noviembre 2009**



Universitat Autònoma de Barcelona

Facultat de Biociències
Departament de Genètica i Microbiologia
Unitat de Genètica

ANÁLISIS DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA DE LA ANEMIA DE FANCONI EN ESPAÑA

Memoria presentada por MARIA CASTELLÀ CASTELLÀ, en el marco del programa de tercer ciclo de Genética de la Universitat Autònoma de Barcelona para optar al grado de Doctor en Genética por la Universitat Autònoma de Barcelona

Director de tesis

Autora

Dr. Jordi Surrallés Calonge
Catedrático de Genética
UAB

Maria Castellà Castellà

**A todos los pacientes de anemia de Fanconi
de España y a sus familias**

TABLA DE CONTENIDOS

ABREVIATURAS.....	V
I. INTRODUCCIÓN	1
I.1. GENERALIDADES SOBRE LA ANEMIA DE FANCONI	3
I.2. SINTOMATOLOGÍA CLÍNICA	4
I.2.1. Disfunciones hematológicas	4
I.2.2. Malformaciones congénitas.....	5
I.2.3. Disfunciones endocrinas.....	6
I.2.4. Tumores sólidos	7
I.2.5. Variabilidad clínica en función del grupo de complementación	7
I.3. TERAPIAS DE LOS PACIENTES DE AF	8
I.3.1. Andrógenos y transfusiones	8
I.3.2. Transplante de médula ósea.....	9
I.3.3. Alternativas al TMO de donante no emparentado.....	10
I.4. DIAGNÓSTICO DE AF	11
I.4.1. Diagnóstico citogenético	11
I.4.2. Otras técnicas diagnósticas: análisis del ciclo celular y monoubiquitinación de FANCD2	12
I.5. MOSAICISMO SOMÁTICO.....	14
I.5.1. Diagnóstico de pacientes mosaico	15
I.6. FENOTIPO DE LAS CÉLULAS AF.....	16
I.6.1. Telómeros.....	17
I.6.2. Daño oxidativo	17
I.6.3. Producción de citoquinas pro-apoptóticas	18
I.7. CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE LOS PACIENTES DE AF	19
I.7.1. Grupos de complementación	19
I.7.1.1 Grupos de complementación en la población española	21
I.7.2. Análisis mutacional	22
I.7.2.1 Aplicaciones del análisis mutacional	24
I.8. BIOLOGÍA MOLECULAR DE LA AF	26
I.8.1. La ruta FA/BRCA	26
I.8.1.1 Etapa previa a la activación de FANCD2/FANCI	28

I.8.1.2	El complejo ID y su regulación por monoubiquitinación	31
I.8.1.3	Etapa posterior a la monoubiquitinación de FANCD2/FANCI	32
I.8.2.	Activación de la ruta FA/BRCA.....	33
I.8.3.	Función de la ruta FA/BRCA	34
II.	OBJETIVOS.....	37
III.	MATERIALES Y MÉTODOS	41
III.1.	PACIENTES Y MUESTRAS.....	43
III.1.1.	Obtención de LCLs.....	43
III.1.2.	Extracción de ADN	44
III.2.	TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO Y SUBTIPAJE.....	44
III.2.1.	Ensayo de fragilidad cromosómica.....	44
III.2.2.	Western Blot.....	45
III.2.3.	Análisis del bloqueo del ciclo celular en G2 y citometría	46
III.3.	DETECCIÓN DE MUTACIONES.....	47
III.3.1.	Detección de la mutación c.295C>T en FANCA	47
III.3.2.	Detección de mutaciones en los genes FA.....	47
III.4.	ANÁLISIS DEL HAPLOTIPO ASOCIADO A LA MUTACIÓN C.3788_3790DELCT EN FANCA.....	48
III.4.1.	Detección de la mutación c.3788_3790delTCT.....	48
III.4.2.	DHPLC para la detección de SNPs	48
III.4.3.	Análisis de microsatélites o VNTRs.....	51
III.5.	DETERMINACIÓN DE LOS PUNTOS DE ROTURA DE LA DELECCIÓN EN EX1-20 DEL GEN FANCA.....	52
III.5.1.	Array CGH	52
III.5.2.	Análisis de marcadores genéticos (SNPs)	53
III.5.3.	Cuantificación de dosis génica mediante PCR a tiempo real.....	54
III.5.4.	Amplificación y clonación de la región del punto de rotura.....	56
III.6.	LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE FANCA	57
III.6.1.	Fraccionamiento celular: Núcleo y citoplasma.....	57
III.6.2.	Inmunofluorescencia	58
III.7.	ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE PROTEÍNAS	59
III.8.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	60

IV. RESULTADOS	61
IV.1. DIAGNÓSTICO DE AF	63
IV.1.1. Ensayo de fragilidad cromosómica.....	63
IV.1.1.1. Fragilidad cromosómica inducida por DEB. Discriminación entre individuos no AF, pacientes AF y pacientes AF mosaico.	63
IV.1.1.2. Fragilidad cromosómica espontánea.....	70
IV.1.1.3. Correlación entre fragilidad cromosómica espontánea e inducida por DEB	72
IV.1.2. Viabilidad celular a la MMC.....	73
IV.1.2.1. Correlación entre fragilidad cromosómica inducida por DEB y viabilidad a MMC.....	75
IV.2. CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE LA POBLACIÓN DE AF ESPAÑOLA.....	76
IV.2.1. Determinación del grupo de complementación y frecuencias	76
IV.2.2. Análisis mutacional	80
IV.2.2.1. Espectro mutacional del gen <i>FANCA</i>	82
IV.2.2.2. Mutaciones en otros genes FA.....	92
IV.2.2.3. Caracterización molecular de mutaciones.....	94
IV.3. FACTORES CONDICIONANTES DE LA SENSIBILIDAD CELULAR A ICLs.....	117
IV.3.1. Grupo de complementación.....	117
IV.3.2. Tipo de mutación.....	119
IV.4. FACTORES CONDICIONANTES DE LA SEVERIDAD DEL FENOTIPO CLÍNICO .	120
IV.4.1. Sensibilidad celular: espontánea, al DEB y a la MMC.....	121
IV.4.2. Tipo de mutación.....	122
IV.5. DETERMINACIÓN DE PROCESOS CELULARES DESREGULADOS EN AF.....	123
IV.5.1. Caracterización genética de las LCLs EUFA274 y EUFA450	124
IV.5.2. Expresión diferencial de proteínas.....	126
IV.5.2.1. Expresión diferencial de la AF	129
IV.5.2.2. Expresión diferencial de FA-A y de FA-C	131
V. DISCUSIÓN	137
V.1. ANÁLISIS DE LA VARIABILIDAD EN LA SENSIBILIDAD CELULAR A AGENTES INDUCTORES DE ICLs.	139
V.2. CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE LA POBLACIÓN ESPAÑOLA DE AF	142
V.3. CAUSAS DE VARIABILIDAD EN LA SENSIBILIDAD CELULAR A ICLs EN LOS PACIENTES DE AF	147
V.4. VARIABILIDAD EN LA SEVERIDAD DEL FENOTIPO CLÍNICO.....	150

V.5. DETERMINACIÓN DE PROCESOS CELULARES DESREGULADOS EN LAS CÉLULAS AF.....	151
VI. CONCLUSIONES	155
VII. BIBLIOGRAFIA	161
VIII. ANEXOS.....	182

ABREVIATURAS

8OHdG	8-hidroxi-2'-desoxiguanosina
ADN	Ácido desoxi-ribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
AF	Anemia de Fanconi
BRCA	<i>del inglés</i> , Susceptibilidad al cáncer de mama
CFI	<i>del inglés</i> , Índice de fragilidad cromosómica
CGH	<i>del inglés</i> , Hibridación genómica comparada
DEB	Diepoxibutano
DIGE	<i>del inglés</i> , Electroforesis diferencial en gel
DPI	Diagnóstico pre-implantacional
EBV	<i>del inglés</i> , Virus Epstein-Barr
EICH	Enfermedad de injerto contra huésped
FAAP	<i>del inglés</i> , Proteína asociada al complejo FA
HRR	<i>del inglés</i> , Reparación por recombinación homóloga
HU	Hidroxiurea
ICL	<i>del inglés</i> , Enlace cruzado intercatenario
IFN- γ	Interferón gamma
IL-	Interleucina
LCL	Línea celular linfoblastoide
LMA	Leucemia mieloide aguda
MMC	Mitomicina C
NER	<i>del inglés</i> , Reparación por escisión de nucleótidos
NLS	<i>del inglés</i> , Señal de localización nuclear
PI	<i>del inglés</i> , Ioduro de propidio
PCR	<i>del inglés</i> , Reacción en cadena de la polimerasa
ROS	<i>del inglés</i> , Especies reactivas de oxígeno
SCC	<i>del inglés</i> , Carcinoma escamoso de cabeza y cuello
SD	<i>del inglés</i> , Desviación estándar
SMD	Síndrome mielodisplásico
SNP	<i>del inglés</i> , Polimorfismo de un solo nucleótido
TA	Temperatura ambiente
TLS	<i>del inglés</i> , Síntesis de ADN translesión
TMO	Transplante de médula ósea
TNF α	<i>del inglés</i> , Factor de necrosis tumoral alfa

Abreviaturas

VNTR	<i>del inglés</i> , Número variable de repeticiones en tándem
WB	Westren Blot

I. INTRODUCCIÓN

I.1. GENERALIDADES SOBRE LA ANEMIA DE FANCONI

La anemia de Fanconi (AF) fue descrita por primera vez en 1927 por el pediatra Suizo Guido Fanconi en una familia con tres hermanos que presentaban una variedad de anomalías congénitas, anemia severa, infecciones recurrentes y sangrados espontáneos, finalmente resultando en una muerte prematura (Fanconi 1927).

En 1966 se produjo el primer gran hallazgo en el estudio de esta enfermedad, cuando Schroeder describió que estaba asociada a fragilidad cromosómica y reconoció un patrón de herencia autosómica recesiva (Schroeder 1966). Tres años más tarde, Schuler y colaboradores aportaron la primera herramienta para el diagnóstico de la enfermedad al observar que las células de estos pacientes eran altamente sensibles a agentes alquilantes, de modo que la fragilidad cromosómica se incrementaba de forma muy evidente al ser tratadas con este tipo de agentes (Schuler *et al.* 1969). Esta técnica es la que se sigue utilizando actualmente para el diagnóstico de esta enfermedad, con algunos cambios y estandarizaciones, la mayoría de ellos introducidos por Auerbach unos años más tarde (Auerbach 1988).

La era de la biología molecular de la AF empezó en 1992 cuando se identificó el primer gen causante de la enfermedad, *FANCC* (Strathdee *et al.* 1992a). A partir de entonces, le han seguido 11 genes más, poniendo de manifiesto la gran complejidad genética de esta enfermedad. Estos 11 genes, y probablemente otros aún sin identificar, colaboran en la ruta de reparación denominada Fanconi/Susceptibilidad al cáncer de mama (FA/BRCA). Así pues, hoy en día se cree que la AF está causada por la disfunción de la ruta FA/BRCA, resultando en la incapacidad de las células de reparar enlaces cruzados intercatenarios (ICLs) del ADN y comprometiendo así su viabilidad. Este fallo en la reparación parece ser el causante de la aparición de un síndrome caracterizado por fallo medular progresivo y predisposición al cáncer.

Actualmente, la terapia de estos pacientes se dirige básicamente a la paliación del fallo medular. Así pues, gran parte de los esfuerzos realizados desde la investigación se dirigen a la mejora de los protocolos de transplante de médula ósea de donante para estos pacientes y al desarrollo de técnicas alternativas de obtención de células sanas como la terapia génica.

I.2. SINTOMATOLOGÍA CLÍNICA

La AF es una enfermedad rara que afecta de 1 a 5 individuos por cada millón de habitantes y la frecuencia de portadores se calcula en 1/300 (Joenje y Patel 2001), aunque puede ser más elevada en grupos altamente consanguíneos como los Judíos Ashkenazis o los Gitanos españoles, donde la frecuencia de portadores llega a ser de 1/67, la más elevada del mundo (Callen *et al.* 2005).

Los síntomas clínicos y la severidad de los pacientes de AF son muy heterogéneos, lo que complica mucho el diagnóstico y el tratamiento. Podemos agrupar los síntomas clínicos de la AF en cuatro grupos:

I.2.1. Disfunciones hematológicas

Las disfunciones hematológicas son el síntoma más característico de la AF y la aparición de estas, muchas veces lleva al diagnóstico. Casi todos los pacientes presentan un fallo medular progresivo que implica una severa trombopenia o pancitopenia en la mayoría de los casos. Aunque la edad de aparición de las primeras disfunciones hematológicas es altamente variable, el 75% de los pacientes experimentan un fallo medular en su primera década de vida, y más del 90% de ellos presentan algún problema hematológico en la edad de 40 años. A parte de la citopenia, otros desordenes hematológicos característicos de la AF son el síndrome mielodisplásico (SMD) y la leucemia mieloide aguda (LMA) que se presentan en un 33% de los pacientes a la edad de 40 años (Butturini *et al.* 1994; Kutler *et al.* 2003b). La detección precoz del SMD o la LMA es crucial, ya que su aparición requiere un trasplante de médula urgente. La aparición de clones en la médula ósea con ganancias de la región 3q se usa actualmente como marcador de un elevado riesgo de desarrollo de SMD y LMA en los pacientes de AF (Tonnes *et al.* 2003).

1.2.2. Malformaciones congénitas

Entre un 60 y un 75% de los pacientes presentan una o más malformaciones congénitas que pueden ser de tipo muy variado. En la Tabla 1 se puede ver un listado de las malformaciones más comunes y su incidencia en los pacientes de AF.

Tabla 1. Malformaciones congénitas más frecuentes en los pacientes de AF (Dokal 2000).

Malformación	Frecuencia (%)
Esquelética (extremidades superiores, cadera, costillas)	71
Pigmentación de la piel (manchas “café con leche”, hiper y hipopigmentación)	64
Baja estatura	63
Microoftalmia	38
Defectos en el tracto urinario	34
Malformaciones en los genitales masculinos	20
Retraso mental	16
Malformaciones en el tracto gastrointestinal (anorectal, atresia duodenal)	14
Anomalías cardíacas	13
Anomalías del oído	11
Anomalías del sistema nervioso central (microcefalia, hidrocefalo, septum pellucidum)	8
Sin anomalías	30

Las anomalías congénitas más comunes, que podemos observar en la Figura 1, incluyen las manchas “café con leche” de la piel y anomalías esqueléticas en las extremidades superiores como la hipoplasia de radio y las anomalías de los pulgares, comprendiendo desde ausencia total o hipoplasia hasta pulgares supernumerarios (De Kerviler *et al.* 2000). Los pacientes también presentan un conjunto de características faciales muy particular y típico de la enfermedad.



Figura 1. Características clínicas típicas de los pacientes de AF: rasgos faciales, extremidades superiores y manchas café con leche de la piel.

No obstante, estas malformaciones congénitas no se atribuyen únicamente a la AF si no que caracterizan también otras enfermedades. Además, un 30% de los enfermos de AF no presentan ninguna anomalía congénita. Así pues, aunque las malformaciones congénitas son una característica de la AF, no pueden ser usadas por si solas como criterio diagnóstico de esta enfermedad.

1.2.3. Disfunciones endocrinas

El 80% de los pacientes presentan algún tipo de endocrinopatología. La deficiencia de hormona del crecimiento (GH) es la más relevante (53% de los pacientes), aunque también se puede presentar frecuentemente hipotiroidismo (37%), un metabolismo de la glucosa y insulina alterado (normalmente aparece como una intolerancia a la glucosa y diabetes) en un 39% de los pacientes, obesidad (27%) y dislipemia (55%). El 92% de los pacientes mayores de 18 años presentan también osteopenia u osteoporosis y el 65% disfunción gonadal. En las mujeres con AF aparece también una menopausia prematura, aunque la alteración endocrina subyacente no ha sido aún identificada (Wajnrajch *et al.* 2001; Giri *et al.* 2007).

I.2.4. Tumores sólidos

La AF se caracteriza también por un riesgo muy elevado de padecer cáncer a partir de la segunda década de vida. A parte de los tumores hematológicos ya descritos anteriormente (representan un 60% de todos los tumores), los tumores sólidos también se presentan con una elevada frecuencia. Alrededor de un 35% de los pacientes presentan algún tumor sólido a la edad de 40 años, siendo los más frecuentes los carcinomas escamosos de cabeza y cuello (SCC) esófago, ano o ginecológico (42% de los tumores sólidos) (Kutler *et al.* 2003a). Los tumores del hígado representan el 29% de los tumores sólidos, aunque su aparición ha sido directamente relacionada con el tratamiento de andrógenos que reciben algunos de los pacientes (Johnson *et al.* 1972). Hace ya un tiempo se detectó que la edad de aparición de tumores sólidos en los pacientes de AF, fundamentalmente el SCC, estaba condicionada por el hecho que el paciente hubiera recibido un transplante de médula ósea, apareciendo unos 16 años antes en el grupo de pacientes transplantados respecto a los no transplantados, como se describe en el Anexo 1 (van Zeeburg *et al.* 2008). Recientemente, se ha podido comprobar que la aparición del SCC está más directamente relacionada con el desarrollo de la enfermedad de injerto contra huésped (EICH) que se produce en algunos pacientes después del transplante (Rosenberg *et al.* 2005).

I.2.5. Variabilidad clínica en función del grupo de complementación

Una pequeña parte de la variabilidad clínica que observamos en los pacientes se debe a la existencia de distintos grupos de complementación (véase capítulo 7). Así pues, algunas de las características clínicas descritas en los apartados anteriores están asociadas o son más comunes en pacientes pertenecientes a un subtipo específico, aunque no siempre los datos son concordantes entre estudios realizados en poblaciones distintas. Parece claro que los pacientes que pertenecen a los grupos de complementación FA-D1 y FA-N presentan un fenotipo atípico y más severo, caracterizado por tumores sólidos (típicamente meduloblastoma o tumor de Wilms) a edades muy tempranas (Hirsch *et al.* 2004; Reid *et al.* 2007). Los pacientes FA-D2 se

caracterizan por presentar microcefalia, baja estatura, hiperpigmentación de la piel, malformaciones del radio y microftalmia más frecuentemente que otros grupos de complementación. Así pues, mientras que el 30% de la población general de AF no presenta ninguna anomalía congénita, todos los pacientes FA-D2 descritos hasta el momento presentan una o más (Kalb *et al.* 2007). Existe bastante controversia en lo que se refiere a diferencias en la severidad clínica de pacientes con mutaciones en genes que forman el complejo FA. En este sentido, según la cohorte Norte Americana los pacientes FA-C presentan las primeras disfunciones hematológicas a edades más tempranas y una supervivencia menor comparado con pacientes FA-A y FA-G (Kutler *et al.* 2003b; Kalb *et al.* 2007), mientras que el mismo análisis en la cohorte Europea indica que son los pacientes FA-G los que presentan una citopenia más severa y un mayor índice de LMA y SMD (Faivre *et al.* 2000). Estas discrepancias, como los mismos autores apuntan, pueden ser debidas al tipo de mutaciones que se han fijado en las distintas poblaciones.

I.3. TERAPIAS DE LOS PACIENTES DE AF

El tratamiento actual para los pacientes de AF se dirige a la curación del fallo medular. Se considera fallo medular cuando los recuentos de neutrófilos $<1000/\text{mm}^3$, plaquetas $<50000/\text{mm}^3$ o hemoglobina $<8\text{g/dl}$. El trasplante de medula ósea (TMO) es el único tratamiento curativo que existe, aunque es muy común la administración de andrógenos como tratamiento paliativo, cuando aparecen los primeros síntomas de fallo medular.

I.3.1. Andrógenos y transfusiones

Los andrógenos actúan incrementando los recuentos celulares de eritrocitos y plaquetas, y en algunos pacientes, también de neutrófilos (Shahidi y Diamond 1961; Diamond y Shahidi 1967). El mecanismo de la efectividad de los andrógenos en el tratamiento de citopenias es desconocido, aunque recientemente se ha descrito una activación de la actividad telomerasa en las células en respuesta al tratamiento con andrógenos que

podría explicar, al menos en parte, este efecto (Calado *et al.* 2009). Se calcula que aproximadamente el 50% de los pacientes responde al tratamiento con andrógenos, aunque una parte de los pacientes que responden inicialmente, pueden dejar de responder con el tiempo. Los andrógenos más utilizados para el tratamiento de citopénias son la oximetolona y la prednisolona (Dufour y Svahn 2008). El tratamiento puede tener algunos efectos no deseados, como la masculinización, ictericia o la aparición de adenoma hepático. Otro problema del tratamiento con andrógenos es que no previene la progresión a SMD o LMA y además, se ha correlacionado el tratamiento previo con andrógenos con un mayor riesgo en el TMO. Alternativamente, y mientras se espera poder realizar un TMO, se pueden realizar transfusiones sanguíneas para mantener un nivel de celularidad aceptable en el paciente.

1.3.2. Transplante de médula ósea

Mediante TMO se consigue curar el fallo medular de los pacientes, aunque no tiene efecto sobre otras complicaciones no-hematopoyéticas que se presentan en la AF. Pacientes más jóvenes y sin otras complicaciones hematopoyéticas (SMD o AML) y aquellos que no hayan recibido tratamiento con andrógenos o transfusiones presentan un mejor pronóstico de éxito del TMO, por lo que se recomienda a las familias iniciar la búsqueda de donante cuanto antes si aparecen síntomas de fallo medular. Los pacientes de AF, debido a su defecto en la reparación de daño en el ADN, presentan una elevada toxicidad a la quimioterapia y a la radiación, usados en protocolos estándar de acondicionamiento previo al transplante. Así pues, el transplante de pacientes AF, requiere un régimen de acondicionamiento especial, con tratamientos menos agresivos. Se han conseguido excelentes resultados en el TMO de donantes emparentados, como se revisa en (Dufour y Svahn 2008), y se están consiguiendo mejorar los resultados en TMO de donantes no relacionados, a partir de la introducción de algunas modificaciones en el régimen de acondicionamiento, como es el uso de Fludarabina y la reducción de la dosis de radiación (Dalle 2008). El TMO también puede presentar algunos efectos no deseados, como el EICH, que se ha relacionado directamente con una mayor predisposición a desarrollar SCC (Byun *et al.* 2008; Rizzo *et al.* 2009). Actualmente se están introduciendo mejoras en los protocolos de transplante para intentar reducir al mínimo los casos y la severidad del EICH en los pacientes

transplantados utilizando por ejemplo, medulas de donante deplecionadas de células T (Chaudhury *et al.* 2008).

I.3.3. Alternativas al TMO de donante no emparentado

El TMO de donante no emparentado conlleva, aún hoy en día, un riesgo muy elevado para la vida del paciente. Una de las vías de obtención de un donante emparentado, es la selección embrionaria mediante diagnóstico preimplantacional (DPI). Se seleccionan embriones que no padezcan la AF y que sean HLA-idénticos con el hermano. Con estos requerimientos, solo 3/16 embriones serán óptimos para ser transferidos a la madre. Es un procedimiento largo y con probabilidades de éxito bajas, en el que la edad materna es un factor determinante para conseguir el mayor número de oocitos en cada ciclo realizado.

Otras alternativas en las que se está trabajado, actualmente en fase de investigación o de ensayo clínico, es la obtención de células sanas del propio paciente, que puedan ser utilizadas en el TMO evitando así, cualquier problema derivado de la incompatibilidad entre donante y receptor. Las células sanas del individuo se consiguen mediante terapia génica celular, es decir, corrección *in vitro* del defecto genético. Para ello se han desarrollado vectores virales seguros que permiten la introducción en la célula de copias normales del gen mutado. El protocolo de TMO a partir de células hematopoyéticas corregidas por terapia génica ha sido completado con éxito en roedores, como se muestra en Anexo 2, (Rio *et al.* 2008), paso previo a la autorización de ensayos clínicos en humanos. Los protocolos propuestos hasta el momento aplican la terapia génica sobre progenitores hematopoyéticos del paciente. Alternativamente, se ha conseguido también la corrección de células reprogramadas derivadas de otro tejido, en este caso, fibroblastos de piel o queratinocitos (ver Anexo 3) (Raya *et al.* 2009), evitando así tener que disponer de una buena reserva de células madre hematopoyéticas del paciente.

I.4. DIAGNÓSTICO DE AF

Las células AF, o deficientes en uno de los genes FA, son altamente sensibles a drogas que inducen ICLs en el ADN debido a su incapacidad de reparar este tipo de daño (Sasaki 1975). Los ICLs son altamente dañinos para la célula porque constituyen un impedimento para el avance de la horquilla de replicación y además, afectan a las dos cadenas de ADN, complicando la correcta reparación. Esta hipersensibilidad de las células a agentes como el diepoxibutano (DEB), mitomicina C (MMC), psoralenos fotoactivados o cis-platino (CisPt) es específica de AF, permitiendo así desarrollar un test diagnóstico para la enfermedad.

I.4.1. Diagnóstico citogenético

El ensayo tradicional y también el más utilizado para el diagnóstico de AF es el diagnóstico citogenético. Al tratar las células AF con DEB o MMC, la incapacidad de éstas de reparar los ICLs hace que se generen roturas de tipo cromatídico que pueden derivar en la formación de estructuras tri- y tetra-radiales como resultado de la mala unión de extremos rotos (Figura 2).

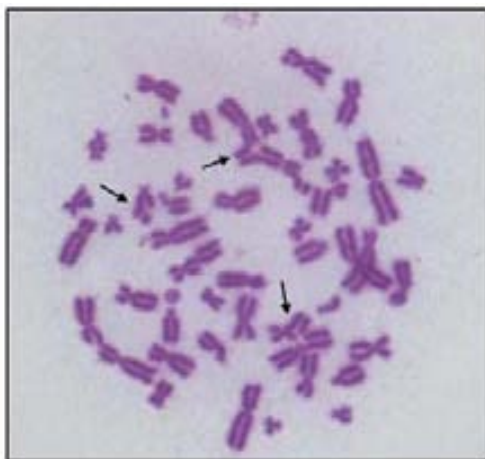


Figura 2. Metafase típica de un paciente AF después de ser tratada con DEB. Las flechas indican roturas cromatídicas y figuras.

El protocolo más utilizado fue inicialmente descrito por Auerbach (Auerbach 1988) e incluye el tratamiento de las células con DEB. Se realiza normalmente en sangre periférica de los pacientes, aunque también se puede realizar en fibroblastos o amniocitos si el caso lo requiere. Después de 48h de tratamiento, las células AF

presentan un número de roturas hasta cien veces mayor que las células de un individuo no AF.

La MMC también es usada en el análisis citogenético por algunos laboratorios. Los resultados que se obtienen son parecidos a los de DEB, aunque el uso de la MMC presenta algunas dificultades técnicas añadidas. En primer lugar, la MMC es un compuesto mucho más inestable que el DEB, perdiendo actividad a medida que pasa el tiempo. Además, existe en la población una variabilidad importante en el metabolismo de la MMC de modo que, dentro de unos parámetros, hay personas sanas que presentan una mayor sensibilidad a este compuesto, pudiendo dar lugar a resultados dudosos o falsos positivos. Esto conlleva el uso de varias dosis de MMC en un mismo ensayo para cada paciente y control, multiplicando en número de muestras a analizar para poder dar un diagnóstico fiable.

1.4.2. Otras técnicas diagnósticas: análisis del ciclo celular y monoubiquitinación de FANCD2

La alteración del ciclo celular es también una característica de las células AF, de modo que su análisis es un indicador adicional del diagnóstico. Como resultado de la acumulación de daño y de la incapacidad de las células AF de repararlo, la fase G2 del ciclo celular se alarga más de lo normal como consecuencia de la activación del punto de control G2/M (Dutrillaux *et al.* 1982; Kubbies *et al.* 1985). Así pues, tal y como se observa en la Figura 3, un elevado porcentaje de las células de un paciente de AF se encuentran en fase G2 después de 48h de tratamiento con un agente inductor de ICLs, típicamente MMC o Melfalán. Aunque en muchos laboratorios esta técnica se usa de forma complementaria al diagnóstico por análisis citogenético, su gran simplicidad y rapidez hacen que sea una técnica muy utilizada.

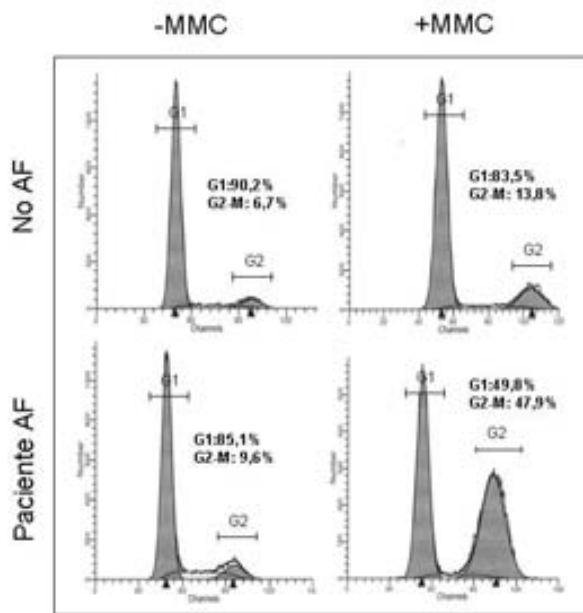


Figura 3. Análisis del ciclo celular mediante citometría de flujo de un paciente de AF y de un individuo sano, con y sin tratamiento de MMC.

En determinados casos se puede utilizar también el análisis de la activación de la ruta FA/BRCA (ver capítulo 8) como herramienta diagnóstica (Soulie *et al.* 2005; Pilonetto *et al.* 2009). La activación de la proteína FANCD2 por monoubiquitinación, que se produce en células de un individuo sano después de ser tratadas con agentes inductores de ICLs, requiere la funcionalidad de todas las proteínas que forman el complejo FA y también de FANCI. Esta activación puede ser analizada fácilmente mediante un Western Blot (WB) o visualizando la formación de focos de FANCD2 en el sitio del daño por inmunofluorescencia (IF). En el caso del WB, la no aparición de la banda correspondiente a la forma monoubiquitinada de FANCD2 o la ausencia total de proteína FANCD2 indica que el individuo está afectado por AF, aportando además, información sobre el grupo de complementación (Figura 4a). En el caso de la IF, la no formación de focos de FANCD2 en células tratadas con agentes inductores de ICLs (García-Higuera *et al.* 2001) o la no relocalización de FANCD2 a sitios de daño localizado inducido por UVC (Figura 4b) y Anexo 4 (Bogliolo *et al.* 2007), indican igualmente que el paciente está afectado por AF. Aún así, los pacientes de AF pertenecientes a los grupos de complementación FA-D1, FA-J y FA-N (3-7% de los pacientes) no serían detectados mediante estas técnicas, y por tanto, no son utilizadas por sí solas como técnicas diagnósticas.

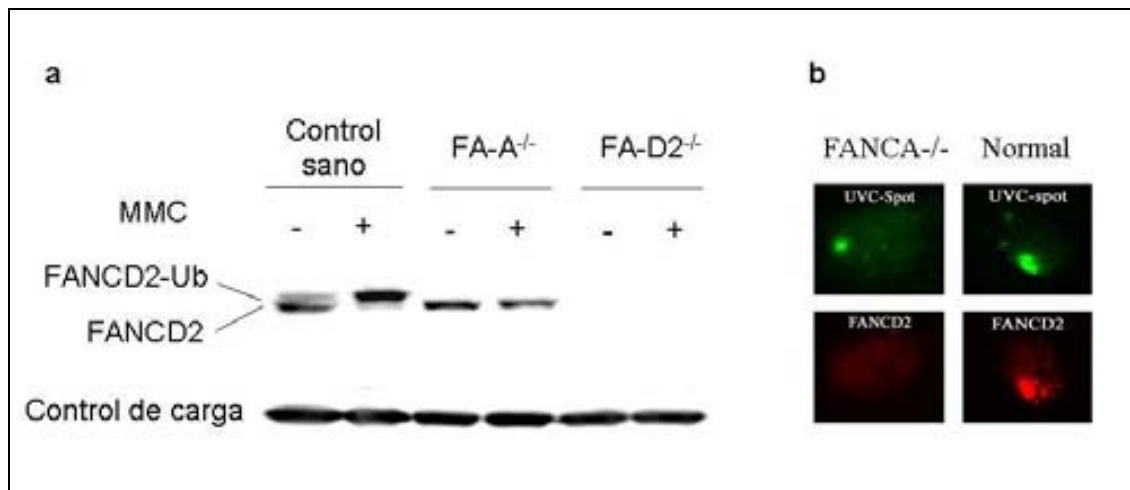


Figura 4. Detección de la activación de FANCD2 por Western Blot (a) o por inmunofluorescencia (b).

I.5. MOSAICISMO SOMÁTICO

El mosaicismo somático es un fenómeno que afecta de un 15 a un 25% de los pacientes de AF (Lo Ten Foe *et al.* 1997; Soulier *et al.* 2005). Aparece cuando una única célula progenitora hematopoyética revierte espontáneamente la mutación en el gen FA de uno de los dos alelos y por consiguiente, revierte también el fenotipo celular convirtiéndose en una célula normal o sana. Debido a la ventaja proliferativa de esta célula, se expande clonalmente y coloniza la médula ósea del paciente (Kwee *et al.* 1983; Lo Ten Foe *et al.* 1997). El mosaicismo somático no es un fenómeno exclusivo de la AF, si no que se ha observado también en otras enfermedades, pero siempre en tejido hematopoyético dónde la alta proliferación celular y la habilidad de las células de colonizar la médula ósea hacen que este fenómeno sea posible (Hirschhorn *et al.* 1996).

El mosaicismo puede ser detectado en células de sangre periférica en el ensayo de fragilidad cromosómica. Después del tratamiento se observan dos poblaciones de células: una población con varias roturas cromatídicas en cada célula, que corresponde a la población no revertida y otra población sin roturas que corresponde a la población de células revertidas. El grado de colonización de la médula por parte de las células revertidas puede ser muy variable, desde sólo unas pocas células hasta casi la totalidad de la médula, de modo que el diagnóstico en estos casos puede resultar más complicado.

El mosaicismo somático es un fenómeno muy interesante ya que puede tener implicaciones clínicas. La reversión original de la mutación puede producirse en una célula madre o en una célula más diferenciada de alguno de los linajes hematopoyéticos. Dependiendo del estado de diferenciación de la célula, la reversión involucrará todos los linajes hematopoyéticos o sólo parte de ellos. Cuando la reversión se produce a nivel de una célula madre los recuentos hematopoyéticos del paciente vuelven a niveles normales, proceso que se conoce como “terapia génica natural” (Yousoufian 1996; Lo Ten Foe *et al.* 1997).

A nivel molecular, los mecanismos que pueden generar la reversión de la mutación son varios: conversión génica, recombinación intragénica o reversión directa de la mutación generando un alelo completamente normal, mientras que la aparición de mutaciones compensatorias en *cis* puede producir una restitución parcial de la funcionalidad de la proteína (Lo Ten Foe *et al.* 1997; Gross *et al.* 2002).

1.5.1. Diagnóstico de pacientes mosaico

Como se ha mencionado antes, el nivel de repoblación de la médula ósea por parte de las células revertidas puede llegar a ser casi del 100%. Estos pacientes de AF pueden ser fácilmente considerados como no AF en un ensayo regular de fragilidad cromosómica en células de sangre periférica. Además, los pacientes de AF mosaico normalmente presentan un fenotipo celular normal en un ensayo de viabilidad o bloqueo del ciclo celular en G2 en respuesta a MMC o otros agentes inductores de ICLs, y también presentan una monoubiquitinación normal de la proteína FANCD2, conduciendo a un diagnóstico erróneo. Una fracción pequeña de los mosaicos presenta, no obstante, una hipersensibilidad a agentes inductores de ICLs comparable a la de un paciente de AF , como se muestra en el Anexo 5 (Casado *et al.* 2007).

Cuando existe una sospecha clínica de AF en un paciente con un ensayo de fragilidad cromosómica negativo, se deben realizar pruebas adicionales para descartar que se trate de un caso de reversión total. En estos casos, como la reversión se produce solo a nivel hematopoyético, se realizan los análisis de fragilidad cromosómica o bloqueo del ciclo celular en un tejido distinto, normalmente, en fibroblastos de piel.

Dada la gran relevancia que el mosaicismo puede tener a nivel clínico para el paciente, en caso de no observarse disfunciones hematológicas o producirse una mejora de los

recuentos de células sanguíneas, se recomienda repetir el análisis de fragilidad cromosómica para determinar si efectivamente, se está produciendo un fenómeno de mosaicismo somático.

I.6. FENOTIPO DE LAS CÉLULAS AF

Como ya se ha comentado extensamente en el capítulo 4, la principal característica de las células AF es su sensibilidad a ICLs. No obstante, estas células presentan también otras particularidades entre las cuáles destacamos las anomalías a nivel telomérico, la desregulación del metabolismo de especies reactivas de oxígeno (ROS) y la desregulación en la producción de citoquinas apoptóticas. Todas estas características se encuentran relacionadas entre ellas y probablemente, todas explican parte del fenotipo de los pacientes, aunque el grado de contribución de cada una de ellas no es bien conocido (Figura 5).

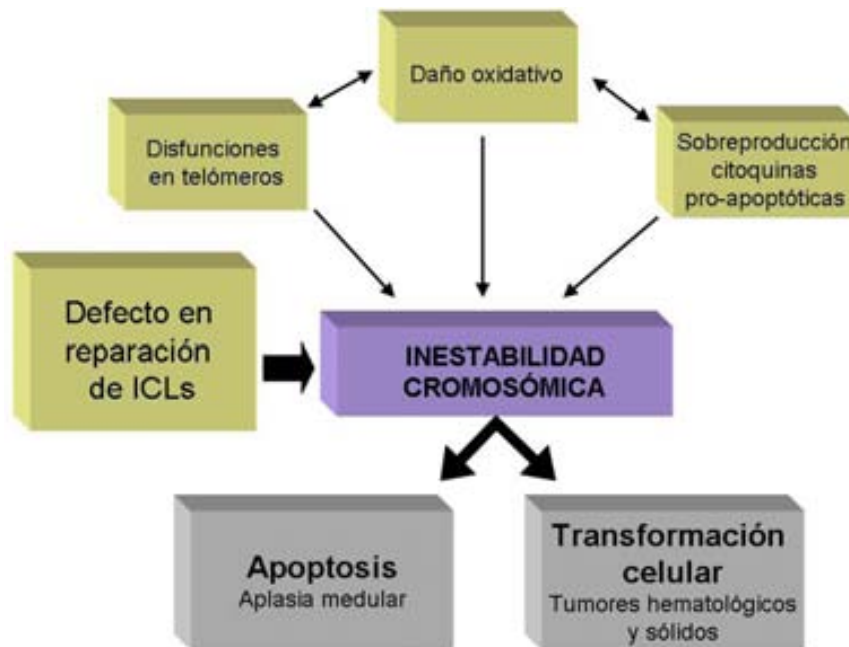


Figura 5. Esquema general de los mecanismos de generación de inestabilidad cromosómica y su consecuencia en las células AF.

I.6.1. Telómeros

Se ha descrito que las células de los pacientes de AF presentan en general unos telómeros más cortos comparados con los de personas sanas de la misma edad (Leteurtre *et al.* 1999; Callen *et al.* 2002). Se ha observado también la presencia de señales de repeticiones TTAGGG extra-teloméricas (extra e intra-cromosómicas) con una elevada frecuencia y también la presencia de extremos de cromosomas sin señal telomérica apreciable, lo que parece indicar que se producen roturas en el telómero de las células AF (Leteurtre *et al.* 1999; Callen *et al.* 2002). Si estas roturas son causa o consecuencia de la inestabilidad cromosómica por la que se caracterizan estas células es un tema aún por dilucidar. Un mecanismo propuesto para explicar el acortamiento acelerado de los telómeros de las células AF es el daño oxidativo (Franco *et al.* 2004). Como se comenta más abajo en este capítulo, las células AF presentan una acumulación de daño oxidativo en su ADN y el daño oxidativo ha sido directamente relacionado con el acortamiento telomérico (von Zglinicki 2002; Uziel *et al.* 2008).

I.6.2. Daño oxidativo

Desde hace ya tiempo se conoce que las células AF presentan un metabolismo de las ROS desregulado (Joenje *et al.* 1981) y ha sido propuesto por algunos autores como un mecanismo complementario a la acción de los ICLs, de inducción de fragilidad cromosómica en las células de los pacientes (Pagano *et al.* 2005). Aunque, la raíz del problema no es aún bien conocida, el daño oxidativo se relaciona con la AF por varios motivos: el estado pro-oxidativo de las células AF, la relación entre algunos de los síntomas clínicos y el daño oxidativo y la interacción a nivel molecular de algunas proteínas FA y proteínas con actividades conocidas en procesos de oxidación-reducción. Se sabe que las células de AF acumulan una gran cantidad de ROS y productos oxidados del ADN como la 8OHdG (Pagano y Korkina 2000), aunque estas células no presentan ningún problema evidente en la reparación de este tipo de daño (Pagano *et al.* 2004). También se ha visto que las células AF son sensibles a elevadas concentraciones de oxígeno y hierro, conocidos agentes oxidantes (Joenje *et al.* 1981; Poot *et al.* 1996). La inestabilidad cromosómica, el bloqueo del ciclo celular y la propensión a la

apoptosis de las células FA han sido corregidos mediante la adición de agentes anti-oxidantes en el medio de cultivo o disminuyendo la concentración de O₂ del ambiente (Nordenson 1977; Joenje *et al.* 1981; Nagasawa y Little 1983; Dallapiccola *et al.* 1985; Poot *et al.* 1996; Saadatzaheh *et al.* 2004). Finalmente, en estudios recientes en modelos murinos *FANCD2*^{-/-}, se ha visto que la adición de anti-oxidantes en la dieta de los animales, retrasaba considerablemente la aparición de tumores (Zhang *et al.* 2008).

Algunas manifestaciones clínicas que presentan los pacientes de AF han sido relacionadas con el daño oxidativo como son el fallo medular (Smith 1996; Umegaki *et al.* 2001), la *diabetes melitus* (Shedder *et al.* 2001; Vlassara y Palace 2002) y el cancer (Floyd 1990; Kaminsky y Spivack 1999; Kovacic y Jacintho 2001).

Finalmente, a nivel molecular se han encontrado interacciones directas entre proteínas FA y proteínas implicadas en procesos de oxidación-reducción. La proteína FANCC interacciona con las proteínas NADPH citocromo P450 reductasa (Kruyt *et al.* 1998) y con GSTP1 (Cumming *et al.* 2001), y la proteína FANCG interacciona con CYP2E1 (Futaki *et al.* 2002).

Conjuntamente, todas estas observaciones demuestran que el daño oxidativo está implicado en la patogenicidad de la AF, aunque queda por definir el grado de su contribución.

I.6.3. Producción de citoquinas pro-apoptóticas

Las células AF presentan una desregulación en la producción de algunas citoquinas apoptóticas tales como IL-6 (Interleucina 6) (Rosselli *et al.* 1992), TNF α (Factor de necrosis tumoral alfa) (Rosselli *et al.* 1994) o IFN- γ (Interferón gamma) (Dufour *et al.* 2003) o IL-1 β (Ibanez *et al.* 2009).

TNF α ha sido hasta el momento la más estudiada de todas las citoquinas. Es una de las citoquinas principales, implicada en hematopoyesis, inflamación y apoptosis. Niveles elevados de TNF α han sido descritos en líneas celulares linfoblásticas (LCLs), en suero fisiológico y en células de la médula ósea de pacientes de AF de distintos grupos de complementación. Niveles altos de TNF α conllevan una sobreactivación de la cascada de señalización en respuesta a estrés MAPK (Wajant *et al.* 2003) y el factor de transcripción NF-kappaB (Osborn *et al.* 1989), ambas rutas previamente relacionadas con el fallo medular y también con procesos de leuquemogénesis. La sobreproducción

de TNF α induce también una mayor producción de ROS y por tanto, podría explicar la acumulación de daño oxidativo en estas células.

La corrección de los niveles de TNF α en células AF mediante el uso de anticuerpos contra esta proteína ha revelado resultados interesantes. En primer lugar corrige parcialmente el fenotipo AF de las células disminuyendo su sensibilidad a la MMC y también la fragilidad cromosómica (Rosselli *et al.* 1994). Más relevante todavía, se ha visto que el uso de anti-TNF α mejora la viabilidad de las células progenitoras hematopoyéticas (Dufour *et al.* 2003) lo que abre las puertas al uso de anti-TNF α en ensayos clínicos con pacientes para prevenir o retrasar el fallo medular.

I.7. CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE LOS PACIENTES DE AF

I.7.1. Grupos de complementación

Hasta la fecha, 12 genes han sido identificados como causantes de la AF. Cada uno de estos genes da lugar a un grupo de complementación, conocidos como FA-A, -B, -C, -D1, -D2, -E, -F, -G, -I, -J, -L y -N. Las frecuencias de los grupos de complementación son similares en las distintas poblaciones, aunque puede haber algunas diferencias tal y como será comentado más adelante. En la Figura 6 se muestran las frecuencias de la población de Estados Unidos, que cuenta con el registro de pacientes de AF más grande de mundo. El grupo de complementación FA-A es el más común, representando el 60% de los pacientes, los genes FA-C y FA-G un 10-15%, los grupos FA-D2 y FA-D1 alrededor de un 5% y los demás grupos son mucho más raros (Kennedy y D'Andrea 2005).

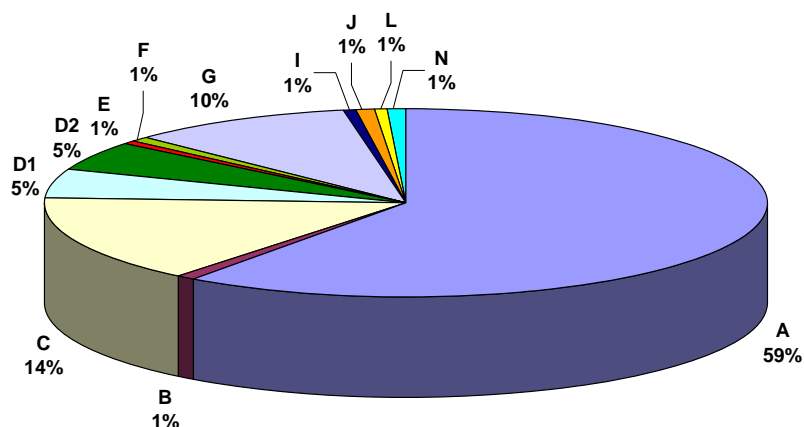


Figura 6. Frecuencias de los grupos de complementación de la población de Estados Unidos.

En la Tabla 2 se proporciona una lista de los 12 genes FA conocidos. El primer gen, *FANCC*, fue clonado en 1992 y el último, *FANCI*, en 2007. Aunque la opinión general de la comunidad científica es que el grupo de genes causantes de AF está próximo a completarse, existen aún algunos pacientes que no pertenecen a ninguno de los grupos de complementación ya descritos, indicando que quedan aún algunos genes FA por identificar.

Tabla 2. Los 12 genes FA.

Grupo de complementación	Gen	Localización cromosómica	Nº de exones	Referencia
A	<i>FANCA</i>	16q24.3	42-43*	(FA/Breast Cancer consortium 1996; Lo Ten Foe <i>et al.</i> 1996)
B	<i>FANCB</i>	Xp22.31	8	(Meetei <i>et al.</i> 2004a)
C	<i>FANCC</i>	9q22.3	14	(Strathdee <i>et al.</i> 1992b)
D1	<i>FANCD1/BRCA2</i>	13q12.3	26	(Howlett <i>et al.</i> 2002)
D2	<i>FANCD2</i>	3p25.3	42-43*	(Timmers <i>et al.</i> 2001)
E	<i>FANCE</i>	6p21.3	10	(de Winter <i>et al.</i> 2000a)
F	<i>FANCF</i>	11p15	1	(de Winter <i>et al.</i> 2000b)
G	<i>FANCG</i>	9p13	14	(de Winter <i>et al.</i> 1998)
I	<i>FANCI</i>	15q26.1	36	(Dorsman <i>et al.</i> 2007; Smogorzewska <i>et al.</i> 2007)
J	<i>FANCI/BRIP1</i>	17q23.2	19	(Levitus <i>et al.</i> 2005; Litman <i>et al.</i> 2005)
L	<i>FANCL</i>	2p16	14	(Meetei <i>et al.</i> 2003a)
N	<i>FANCN/PALB2</i>	16p12.1	13	(Reid <i>et al.</i> 2007; Xia <i>et al.</i> 2007)

*Existe *splicing* alternativo en estos genes.

El subtipaje genético (o determinación del grupo de complementación) se realiza habitualmente mediante el análisis de la reversión del fenotipo celular, usando marcadores tales como la sensibilidad a MMC o el bloqueo del ciclo celular, una vez

introducido en las células del paciente una copia salvaje de cada uno de los genes FA utilizando vectores retrovirales (Hanenberg *et al.* 2002; Casado *et al.* 2007). También es común el uso de técnicas como el WB en el análisis de la expresión del gen en cuestión o el análisis de la monoubiquitinación de FANCD2 para determinar si el defecto está en los genes del complejo FA o los genes que se encuentran por debajo de la monoubiquitinación de FANCD2 (ver capítulo 8). Por último, se puede llegar a la determinación del subtipo genético mediante análisis mutacional de los genes FA, empezando por aquellos más frecuentes en la población (Ameziane *et al.* 2008).

I.7.1.1 Grupos de complementación en la población española

La población española de pacientes de AF presenta algunas diferencias en cuanto a las frecuencias de los grupos de complementación respecto a otras poblaciones tales como la Norte-americana o poblaciones del norte de Europa. Tal y como se describe en el Anexo 5 (Casado *et al.* 2007), la frecuencia de pacientes FA-A es más elevada, llegando a representar el 80% de los pacientes españoles. Frecuencias similares para el grupo FA-A también han sido descritas en otras poblaciones Mediterráneas como Italia (Savoia *et al.* 1996) y Tunicia (Bouchlaka *et al.* 2003). Esta elevada frecuencia de pacientes FA-A se debe, en parte, a la alta incidencia de AF que se encuentra en los pacientes españoles de etnia gitana, los cuales, pertenecen todos a este grupo de complementación. Otra diferencia relevante es que no se ha identificado ningún paciente perteneciente al grupo de complementación FA-C, el cual, representa el 15% de los pacientes en otras poblaciones y la frecuencia de pacientes FA-G, que en otras poblaciones es del 10-15%, también es baja en España. Además, se han identificado también pacientes de los grupos de complementación FA-D1, FA-D2, FA-E y FA-J (Figura 7).

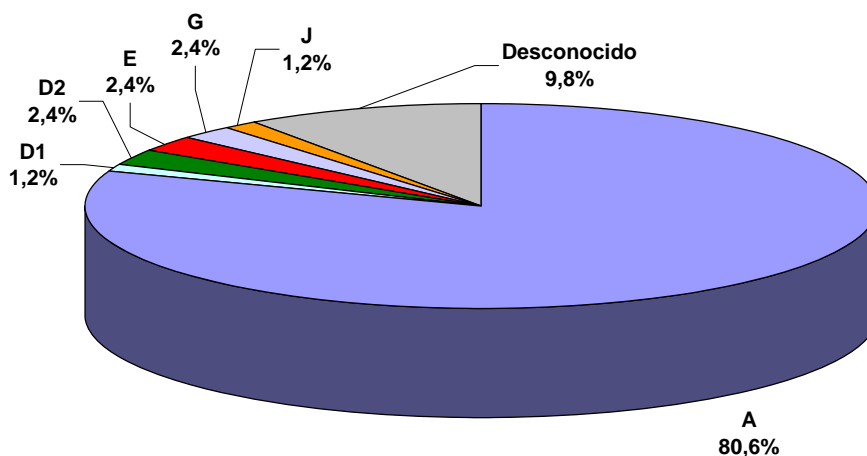


Figura 7. Frecuencias de los grupos de complementación de la población de España (Casado *et al.* 2007).

1.7.2. Análisis mutacional

El análisis mutacional representa la confirmación última del diagnóstico y el subtipo del paciente. Las mutaciones de los pacientes de AF son en muchos casos, privadas, es decir, cada paciente puede presentar mutaciones propias de la familia, por lo que existe una gran diversidad de mutaciones, como demuestran varios estudios de determinación del espectro mutacional realizados en distintas poblaciones (Wijker *et al.* 1999; Demuth *et al.* 2000; Bouchlaka *et al.* 2003; Savino *et al.* 2003; Yagasaki *et al.* 2004; Levran *et al.* 2005). Esto no es cierto para algunos grupos altamente consanguíneos donde algunas mutaciones determinadas resultan fijadas en la población. Existen tres ejemplos muy claros de este fenómeno: el primero de ellos se encuentra en la población española de individuos de etnia gitana, donde la mutación c.295C>T en *FANCA* hace que esta población tenga la frecuencia de portadores de AF más elevada del mundo (1/67) (Callen *et al.* 2005); el segundo ejemplo se encuentra en los individuos de etnia Judía Ashkenazi, los cuales comparten una misma mutación en el gen *FANCC*, c.456+4A>T (Whitney *et al.* 1993) y el tercero, en la población Afrikaner de Sudáfrica, donde la mutación ex12-31del se encuentra en el 60% de los alelos mutados de *FANCA* (Tipping *et al.* 2001). Estos efectos fundacionales no son exclusivos de estas etnias tan consanguíneas sino que también se han observado en otras poblaciones como por ejemplo, la población brasileña, donde el 50% de las mutaciones encontradas en el gen

FANCA corresponden a la mutación c.3788_3790delTCT (Magdalena *et al.* 2005). Estos efectos fundacionales hacen que en algunas poblaciones algunos grupos de complementación en particular estén más representados.

En algunos genes FA y especialmente en *FANCA*, son muy comunes las deleciones intragénicas, que pueden incluir desde un exón a la totalidad del gen. Las deleciones pueden representar hasta un 40% de las mutaciones encontradas en este gen en determinadas poblaciones, y muy frecuentemente, se asocian a recombinaciones entre repeticiones *Alu* (Morgan *et al.* 1999; Callen *et al.* 2004).

Desde hace unos años, las mutaciones encontradas en pacientes de todo el mundo se registran en una base de datos creada por la Dra. Auerbach, la “Fanoni Anemia Mutation Database” (<http://www.rockefeller.edu/fanconi/mutate/>). Como ejemplo, para el gen *FANCA* se han registrado más de 350 mutaciones distintas.

Las técnicas más comúnmente usadas para la detección de las mutaciones incluyen la amplificación de las zonas codificantes del gen y su posterior análisis mediante DHPLC (del inglés, Cromatografía líquida de alta resolución de ADN) para la detección de variantes y la secuenciación directa de los fragmentos. Para la detección de las grandes deleciones, la técnica más usada, por su rapidez y fiabilidad, es el MLPA (del inglés, amplificación múltiple dependiente de ligación). El efecto de las mutaciones que afectan el *splicing* del gen, que se han detectado mediante secuenciación, es comprobado mediante el análisis de ADNc (obtenido a partir del ARNm de la célula), para detectar la posible omisión o incorporación de determinados fragmentos en la secuencia del ARNm.

El carácter patogénico de las mutaciones de cambio de sentido encontradas, debe ser comprobado. La existencia de bases de datos internacionales de mutaciones permite verificar si dicha mutación ha sido identificada anteriormente en otros pacientes, cosa que confirma el carácter patogénico. Las bases de SNPs (*del inglés*, Polimorfismo de un solo nucleótido), por lo contrario, permiten identificar si se trata de una variante frecuente en la población, descartando un efecto patogénico de dicho cambio. En caso de no estar registrado en ninguna base de datos disponible, son muy utilizados los análisis *in silico*, de predicción del efecto del cambio de aminoácido en la proteína. Estos modelos, tienen en cuenta la diferencia en las propiedades físico-químicas de los aminoácidos, la conservación de la posición en las secuencias de genes homólogos de distintas especies, la presencia de dominios funcionales en la región o el efecto esperado de cambio de la estructura terciaria de la proteína (Rudd *et al.* 2005). No obstante, en

caso de duda el carácter patogénico de las mutaciones de cambio de sentido puede ser confirmado mediante un análisis funcional (Lo ten Foe *et al.* 1996). El análisis funcional consiste en la transfección de células deficientes en el gen que se quiere analizar con un vector de expresión que contiene el mismo gen con el cambio a ensayar (introducido normalmente mediante un sistema de mutagénesis dirigida). Posteriormente, se comprueba si las células transfectadas consiguen corregir el fenotipo de AF, por ejemplo, la sensibilidad a MMC. La existencia de corrección indica que el cambio no compromete la funcionalidad de la proteína y por tanto, no es patogénico.

I.7.2.1 Aplicaciones del análisis mutacional

A parte de representar la confirmación del subtipo genético, el conocimiento de las mutaciones que presenta cada una de las familias con AF es relevante en muchos sentidos. Desde un punto de vista clínico, permite prevenir el nacimiento de hijos con AF, permite realizar análisis de portadores en familiares, permite descartar la enfermedad en donantes de medula ósea emparentados y pueden ser usadas como marcadores para comprobar el éxito de trasplante; desde un punto de vista experimental, el desarrollo de nuevas terapias que puedan reemplazar el trasplante de donante, como la terapia génica, necesitan también del conocimiento de las mutaciones; finalmente, las mutaciones pueden representar marcadores genéticos para la predicción de la evolución de la enfermedad, uno de los objetivos de esta tesis doctoral.

En familias con un hijo con AF, el deseo de concebir otro hijo, libre de la enfermedad, pasa actualmente por la realización de diagnóstico prenatal o preimplantacional. En este sentido, la detección de las mutaciones es imprescindible para el diagnóstico preimplantacional y muy recomendable en el análisis prenatal (aunque en este caso, también es posible recurrir a análisis de la funcionalidad de la ruta FA en amniocitos en el caso de que las mutaciones sean desconocidas). Con el objetivo de prevenir nacimientos con AF en familias consanguíneas, como puede ser en el caso de la etnia gitana donde los matrimonios entre familiares próximos son habituales, la detección de mutaciones en portadores es también un protocolo muy recomendable.

Hemos descrito ya en Capítulo 3 de la introducción, que el TMO es la única cura que existe actualmente para el fallo medular de los pacientes de AF. El TMO que tiene

mejor pronóstico es el de donante emparentado haploidéntico (normalmente hermanos). Antes de efectuar el TMO, es importante descartar la presencia de la enfermedad en el hermano donante, por lo que la detección de las mutaciones es el método más rápido y directo. En el desarrollo de protocolos de terapia génica, el conocimiento de las mutaciones del paciente, permite detectar si las células han incorporado la copia corregida del gen.

En otras enfermedades, el tipo de mutación explica parte del fenotipo observado en los pacientes. En este sentido, en AF se han realizado algunos trabajos para descubrir si existen relaciones de este tipo, que puedan predecir la evolución de la enfermedad y determinar la mejor opción de tratamiento para el paciente. Algunas asociaciones han sido encontradas entre mutaciones particulares y severidad del fenotipo, aunque no siempre la información es concordante entre distintos trabajos. Dentro del gen *FANCC*, las mutaciones c.456+4A>T (típica de la etnia de Judía Ashkenazi) y mutaciones en el exón 14 fueron asociadas con una mayor severidad clínica (fallo medular a edades muy tempranas y supervivencia menor), mientras que la mutación c.67delG en el exón 1 se asoció a un fenotipo más leve (Gillio *et al.* 1997). Sin embargo, otro trabajo posterior realizado en pacientes japoneses, reveló que la mutación c.456+4A>T no se asociaba a un fenotipo más severo en los pacientes de su población, de modo que la severidad observada en los pacientes Judíos Ashkenazi es probablemente debida a la modulación ejercida por otros genes y no un efecto directo del tipo de mutación (Futaki *et al.* 2000). El fenotipo suave asociado a la mutación c.67delG sorprende debido al carácter truncador y en el extremo N-terminal de la proteína. Estudios funcionales de esta mutación demostraron que la proteína se expresaba desde un codón codificante para Met situado 55 aminoácidos más abajo, produciendo un péptido de 50kDa capaz de corregir parcialmente la sensibilidad celular a la MMC (Yamashita *et al.* 1996), explicando así el fenotipo más suave observado en estos pacientes.

Estudios similares en el gen *FANCA* no han reportado hasta el momento asociación entre mutaciones concretas y sintomatología, aunque en un estudio realizado en la cohorte europea se observó asociación entre mutaciones bialélicas truncadoras y una edad de aparición de fallo medular más temprana y supervivencia reducida (Faivre *et al.* 2000).

La detección de portadores de mutaciones en la población general tiene interés biomédico para algunos de los genes FA. *BRCA2* (o *FANCD1*), junto con *BRCA1*, son genes de susceptibilidad al cáncer de mama y ovario de alta penetrancia, aunque

conjuntamente, solo explican el cáncer en un 20% de las familias (Lynch *et al.* 2008). La relación entre la AF y la susceptibilidad al cáncer es bien conocida por lo que, se ha analizado en profundidad el riesgo de cáncer en portadores de mutaciones de los otros genes FA. Aunque para la mayoría de genes (*FANCA*, *-B*, *-D2*, *-E*, *-F*, *-G*, *-I* y *-L*) no se ha detectado un incremento del riesgo de cáncer de mama o otros tipos de cáncer asociado a portadores (Seal *et al.* 2003; Garcia *et al.* 2009a), para *FANCI/BRIP1* y *FANCD1/PALB2* sí que se ha determinado una asociación con susceptibilidad al cáncer de mama/ovario familiar. En este caso, son genes de baja penetrancia, y se han encontrado mutados en un 2% de las familias que no presentan mutaciones en *BRCA1/2* (Seal *et al.* 2006; Rahman *et al.* 2007; Tischkowitz *et al.* 2007; Garcia *et al.* 2009b). También ha sido detectada una débil asociación entre mutaciones en *FANCC* y susceptibilidad al cáncer de mama (Berwick *et al.* 2007), aunque dicha asociación no ha sido confirmada. Otros genes de reparación del ADN (*ATM*, *CHEK2*, *NBS1* o *RAD50*) también se han descrito como genes de media o baja penetrancia (Walsh y King 2007).

I.8. BIOLOGÍA MOLECULAR DE LA AF

I.8.1. La ruta FA/BRCA

Las proteínas FA actúan en una ruta común de reparación del daño, conocida como la ruta FA/BRCA esquematizada en la Figura 8.

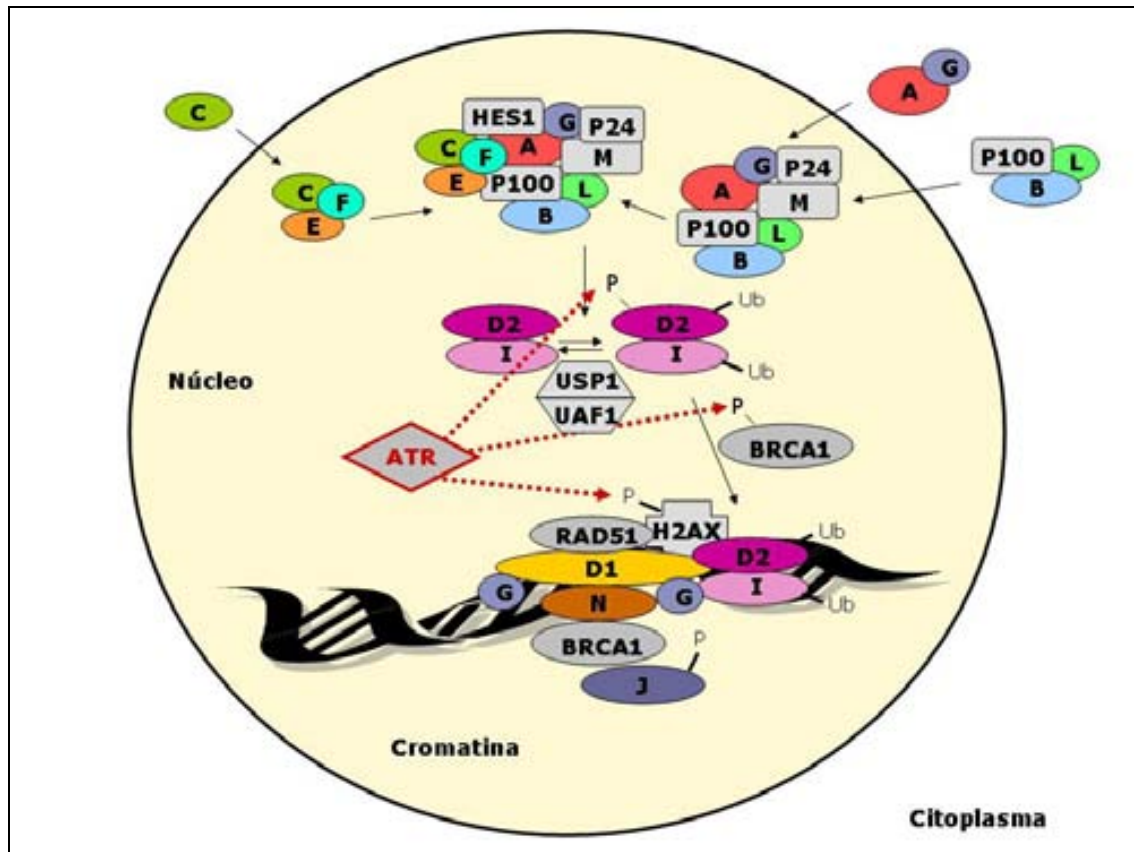


Figura 8. Esquema de la ruta FA/BRCA. Formación del complejo FA y relocalización del complejo ID en la cromatina junto con otras proteínas de reparación.

Las características de cada una de las proteínas FA están detalladas en la Tabla 3 y son comentadas a lo largo de este capítulo.

Esta ruta se divide típicamente en tres etapas: (1) etapa anterior a la activación de FANCD2/FANCI, (2) formación del complejo FANCD2/FANCI, también llamado “Complejo ID” y (3) etapa posterior a la monoubiquitinación de FANCD2/FANCI.

Como se desprende de esta división en etapas, la monoubiquitinación de FANCD2/FANCI es el punto clave de esta ruta. Los genes que actúan antes de la monoubiquitinación de este complejo intervienen predominantemente en la detección y la señalización del daño en el ADN, el complejo ID parece ser el transductor de la señal y los genes que se encuentran por debajo en la ruta actuarían como efectores en la reparación del daño.

Tabla 3. Resumen de las propiedades de cada una de las proteínas FA. Tamaño, dominios conocidos, localización y conservación en la evolución.

Gen	Proteína (kDa)	Proteína (aa)	Dominios conocidos	Localización subcelular	Conservación	Referencias
<i>FANCA</i>	163	1455-1668*	NLS	Núcleo y citoplasma	Vertebrados inferiores	(Lo Ten Foe <i>et al.</i> 1996)
<i>FANCB</i>	95	859	NLS	Núcleo y citoplasma	Vertebrados inferiores	(Meetei <i>et al.</i> 2004a)
<i>FANCC</i>	63	558	Sin dominios conocidos	Núcleo y citoplasma	Vertebrados inferiores	(Youssoufian 1994)
<i>FANCD1 / BRCA2</i>	380	3418	Repeticiones BRC OB1, OB2 y OB3	Núcleo, citoplasma y vesículas de secreción?	Vertebrados inferiores	(Jensen <i>et al.</i> 1996; Baer y Lee 1998)
<i>FANCD2</i>	155,162	1471-1451*	Sin dominios conocidos	Núcleo	Vertebrados inferiores	(Timmers <i>et al.</i> 2001; Castillo <i>et al.</i> 2003)
<i>FANCE</i>	60	536	NLS	Núcleo	Vertebrados inferiores	(Pace <i>et al.</i> 2002)
<i>FANCF</i>	42	374	Sin dominios conocidos	Núcleo	Vertebrados inferiores	(de Winter <i>et al.</i> 2000c)
<i>FANCG</i>	68	622	Repeticiones Tetratricopeptido (TPRs)	Núcleo y citoplasma	Vertebrados inferiores	(Blom <i>et al.</i> 2004)
<i>FANCI</i>	150	1268	Sin dominios conocidos	Núcleo	Vertebrados inferiores	(Smogorzewska <i>et al.</i> 2007)
<i>FANCIJ / BRIP1</i>	130	1249	ATPasa, Dominio helicasa DEAH	Núcleo	Vertebrados inferiores	(Cantor <i>et al.</i> 2001)
<i>FANCL</i>	52	375	Dominios WD40, dedo de Zn tipo PHD	Núcleo, membrana nuclear y citoplasma	Invertebrados	(Meetei <i>et al.</i> 2004b)
<i>FANCN/ PALB2</i>	131	1186	Dominios WD40	Núcleo	Vertebrados inferiores	(Xia <i>et al.</i> 2006)

I.8.1.1 Etapa previa a la activación de FANCD2/FANCI

En esta etapa intervienen la mayoría de las proteínas FA (FANCA, B, C, E, F, G y L). Cuando esta ruta es activada (ver apartado siguiente), estas proteínas forman un complejo conocido como “Complejo FA”, la función principal del cuál es monoubiquitinar al complejo ID.

En paralelo a esta función principal, se cree que cada una de las proteínas que forman el complejo FA puede tener también otras funciones específicas, aunque estas funciones no han sido hasta el momento determinadas ya que las proteínas presentan muy pocos dominios estructurales o aminoácidos conocidos (Tabla 3).

A parte de las proteínas FA, existen otras proteínas que forman parte del complejo FA y que también son requeridas para la monoubiquitinación de FANCD2/FANCI, pero que no se han encontrado mutadas en ningún paciente. Estas proteínas son: FAAP24, FAAP100, FANCM y HES1, también conocidas como Proteínas asociadas al complejo FA (FAAPs). Un resumen de las características estructurales de estas proteínas se presenta en la Tabla 4.

Tabla 4. Proteínas asociadas al complejo FA (FAAPs).

Proteína	Proteína (kDa)	Dominios conocidos	Localización subcelular	Gen	Localización	Referencias
FAAP24	24	Dominio endonucleasa ERCC4-like	Núcleo	<i>C19orf40</i>	19q13.11	(Ciccía <i>et al.</i> 2007)
FAAP100	100	Cremallera de leucina	Núcleo y citoplasma	<i>C17orf70</i>	17q25.3	(Ling <i>et al.</i> 2007)
FANCM	250	Dominio ATPasa/Helicasa y dominio endonucleasa ERCC4-like	Núcleo	<i>FANCM</i>	14q21.2	(Meetei <i>et al.</i> 2005)
HES1	30	Dominio Orange y dominio bHLH	Núcleo	<i>HES1</i>	3q29	(Tremblay <i>et al.</i> 2008)

Formación del complejo FA: Se sabe que algunas de las proteínas se requieren para la localización nuclear y la estabilidad de todo el complejo. El hecho que algunas de las proteínas como FANCA, FANCB y FANCE presenten señales de localización nuclear (NLS), indica que el complejo FA se forma por completo dentro del núcleo. Mediante estudios de co-immunoprecipitación y usando el sistema del doble híbrido se ha determinado que la formación del complejo FA es secuencial y se ha podido demostrar la existencia de subcomplejos (Kennedy y D'Andrea 2005; Medhurst *et al.* 2006). Por un lado, FANCA se une a FANCG y se requieren mutuamente para estabilizarse y localizar en el núcleo (García-Higuera *et al.* 2000). FANCB, FANCL y FAAP100 también forman un complejo en el citoplasma y se transportan conjuntamente al núcleo (Medhurst *et al.* 2006; Ling *et al.* 2007). Una vez dentro del núcleo, FANCA, B, G, L y FAAP100 se reúnen alrededor de FANCM y FAAP24 formando uno de los dos grandes subcomplejos. El segundo subcomplejo está formado por las proteínas FANCE, F y C. FANCC se localiza en el citoplasma y depende de FANCE para su localización nuclear. Una vez dentro, estas dos proteínas se unen a FANCF (Pace *et al.* 2002). El enlace entre los dos subcomplejos parece recaer en la proteína FANCG ya que interacciona a la vez con FANCA y con FANCF (Gordon y Buchwald 2003).

Localización del complejo FA en la cromatina: Una de las proteínas del complejo FA que sí tiene dominios conocidos es FANCM. *FANCM* fue considerado en un inicio un gen FA, ya que se encontró mutado en un paciente (Meetei *et al.* 2005), pero estudios recientes del mismo grupo demostraron que el paciente tenía además, mutaciones en el gen *FANCA*, por lo que *FANCM* no es considerado hoy en día un gen causante de la AF, aunque sí está involucrado en el funcionamiento de la ruta (Singh *et al.* 2009). FANCM es el homólogo humano de la proteína *Hef* de Arqueobacterias, que tiene un dominio helicasa/ATPasa y un dominio endonucleasa tipo ERCC4, el cual no es funcional en la proteína humana. FANCM forma un heterodímero con FAAP24 que presenta también un dominio endonucleasa tipo ERCC4 aunque tampoco es funcional. *In vitro*, el dímero FANCM/FAAP24 muestra afinidad por estructuras en horquilla del ADN, capacidad de translocarse a lo largo del ADN de doble cadena y promover el desplazamiento de cruces de Holliday o horquillas de replicación (Gari *et al.* 2008). Además, FANCM/FAAP24 es requerido para que el resto del complejo FA se localice en la cromatina (Kim *et al.* 2008). Así pues, los modelos actuales sugieren que FANCM/FAAP24 actúa como un sensor del daño, transportando todo el complejo FA a lo largo de la cromatina (Meetei *et al.* 2005; Ali *et al.* 2009).

Monoubiquitinación del FANCD2/FANCI: Una vez en el sitio del daño, el complejo FA monoubiquitina el complejo ID. La monoubiquitinación de proteínas se produce por una cascada en la que intervienen tres actividades enzimáticas: activación de la ubiquitina por parte del enzima E1, conjugación por el enzima E2 y ligación por el enzima E3 (Pickart 2001). FANCL parece ser la subunidad catalítica que posee la actividad E3 ubiquitina ligasa (Meetei *et al.* 2004b). FANCL presenta un dominio RING, característico de las E3 ubiquitina ligasas y, *in vitro*, presenta capacidad de automonoubiquitinarse, aunque aún no se ha podido demostrar la actividad ubiquitina ligasa *in vivo* (Meetei *et al.* 2003a). El enzima E2 que actúa en la monoubiquitinación del complejo ID, ha sido identificado como la proteína UBE2T. UBE2T se une a FANCL y es necesario para la monoubiquitinación de FANCD2 y para la prevención de la fragilidad cromosómica (Machida *et al.* 2006). El enzima E1 que interviene en esta ruta no ha sido identificado hasta la fecha.

I.8.1.2 El complejo ID y su regulación por monoubiquitinación

Las proteínas FANCD2 y FANCI parecen ser la unión entre el sistema de detección y señalización del daño y los mecanismos de reparación. FANCD2 fue identificado en 2001 (Timmers *et al.* 2001) y desde entonces se convirtió en la proteína clave de la ruta. FANCI fue identificado mucho más tarde, en 2007, gracias a que presenta un 40% de homología con FANCD2 y que se monoubiquitina de igual forma (Sims *et al.* 2007; Smogorzewska *et al.* 2007).

En respuesta a daño en el ADN, la monoubiquitinación de FANCD2 en la Lys561 y de FANCI en la Lys563 determina la relocalización de estas dos proteínas al sitio del daño, formando focos junto con otras proteínas de reparación, aunque la función de FANCD2/FANCI en el sitio del daño es hasta el momento totalmente desconocida. Estas dos proteínas se requieren mutuamente para su funcionalidad, de modo que no sólo FANCD2 depende de la presencia de FANCI para monoubiquitinarse si no que lo mismo ocurre en sentido opuesto (Sims *et al.* 2007; Smogorzewska *et al.* 2007).

La relocalización del complejo ID a la cromatina presenta dos requerimientos más: la presencia de BRCA1 y la fosforilación de H2AX. BRCA1 es un conocido supresor de tumores y pieza clave en la ruta de reparación por recombinación homóloga (HRR). En células deficientes en BRCA1, FANCD2 es monoubiquitinado pero no es capaz de relocalizar al sitio del daño. Del mismo modo que las células AF, las células deficientes en BRCA1 son hipersensibles a ICLs, reforzando la conexión entre BRCA1 y las proteínas FA (García-Higuera *et al.* 2001). H2AX se encuentra distribuido a lo largo de la cromatina y se fosforila en las proximidades de roturas de doble cadena o horquillas de replicación bloqueadas. En células deficientes en H2AX o células que expresan una H2AX mutante para el sitio de fosforilación, FANCD2 no relocaliza al sitio del daño. Existe una interacción directa entre FANCD2 y H2AX, para la cuál, es necesario que H2AX esté fosforilada y FANCD2 monoubiquitinada. Igual que ocurre con las células BRCA1^{-/-}, las células deficientes en H2AX son también hipersensibles a ICLs (Bogliolo *et al.* 2007).

No sólo la activación de FANCD2/FANCI es un punto clave de la regulación de la ruta sino que también lo es su desactivación mediante deubiquitinación. En este sentido, una vez completada su función FANCD2/FANCI son deubiquitinados por el complejo USP1/UAF1 (Nijman *et al.* 2005; Cohn *et al.* 2007). USP1 es la deubiquitinasa y UAF1 es necesario para la estabilización y la activación de USP1 (Cohn *et al.* 2007).

Contrariamente a lo que se podría esperar, la inhibición de USP1 en las células y la consecuente no desactivación del complejo ID conlleva una sensibilización de las células a ICLs, debido probablemente a la retención del complejo ID en el sitio del daño más allá del tiempo necesario (Oestergaard *et al.* 2007; Kim *et al.* 2009).

I.8.1.3 Etapa posterior a la monoubiquitinación de FANCD2/FANCI

El papel de la parte inferior de la ruta FA/BRCA es más difuso, aunque parece estar directamente conectado con el sistema HRR. Es conocido que una vez en la cromatina, el complejo ID colocaliza con otras proteínas de reparación incluyendo FANCD1/BRCA2 (Wang *et al.* 2004), RAD51 (Hussain *et al.* 2004), BRCA1 (Garcia-Higuera *et al.* 2001), NBS1 (Nakanishi *et al.* 2002) o PCNA (Howlett *et al.* 2005).

Hasta el momento se han identificado tres genes FA que actúan por debajo de la monoubiquitinación del complejo ID. Estos genes son: *FANCD1/BRCA2*, *FANCI/BRIP1* y *FANCD2/PALB2*.

El descubrimiento de que el gen *FANCD1* era el mismo gen *BRCA2*, mutado en cáncer de mama y ovario hereditario, cambió completamente la visión que se tenía de la ruta FA, al conectarla con el sistema de HRR (Howlett *et al.* 2002). La función principal de *BRCA2* en la HRR es cargar *RAD51* a la cromatina. *RAD51* es la recombinasa que se une a ADN monocadena, para que pueda empezar la invasión de cadena sencilla sobre la doble hebra durante el proceso de recombinación (Shivji y Venkitaraman 2004). Según Wang y colaboradores, *FANCD2* monoubiquitinado sería necesario para reclutar *BRCA2* a la cromatina (Wang *et al.* 2004). *BRCA2* se une a *RAD51* a través de los dominios BRC, mientras que los dominios OB (dominios de unión a oligosacáridos) son necesarios para su unión a ADN monocadena. *BRCA2* se une directamente también a *FANCG*, a través de las repeticiones TPR de este último, aunque la funcionalidad de esta interacción se desconoce hasta el momento. *FANCG* es capaz de unirse tanto al extremo N- como C-terminal de *BRCA2* (Hussain *et al.* 2003).

PALB2 fue descrito en 2006 como una proteína de interacción a *BRCA2*, necesaria para su función y estabilidad (Xia *et al.* 2006). Un año más tarde se describió que mutaciones bialélicas en *PALB2* causaban AF (Reid *et al.* 2007; Xia *et al.* 2007), con un fenotipo muy parecido a los pacientes del grupo FA-D1. Se conoce también que *PALB2* constituye un puente molecular entre las proteínas *BRCA1* y *BRCA2* (Sy *et al.* 2009),

formando un macrocomplejo en el sitio del daño junto con otras proteínas de reparación, entre ellas FANCI.

FANCI fue identificado co-immunoprecipitando con BRCA1, de ahí su otro nombre, BRIP1 (Proteína de interacción con BRCA1) y depende de BRCA1 para formar focos en el sitio del daño (Cantor *et al.* 2001). La interacción de FANCI con BRCA1 depende de la previa fosforilación de FANCI en la Ser990 que se produce en fase S y G2 del ciclo celular (Shiozaki *et al.* 2004). Poco se conoce de la función específica de FANCI en la reparación del daño excepto que contiene un dominio helicasa DEAH, de forma que es capaz de desenrollar la doble cadena de ADN moviéndose a lo largo de la hebra gracias a su capacidad de hidrolizar ATP (Cantor *et al.* 2004). *In vitro*, tiene afinidad por estructuras en horquilla de ADN y por estructuras *D-loop* que se forman durante la invasión de cadena en la HRR, pero a diferencia de FANCD1, no presenta afinidad por cruces de Holliday (Gupta *et al.* 2005). FANCI también interacciona directamente con las proteínas del complejo MutL α de reparación *mismatch*, MLH1 y PMS2 (Peng *et al.* 2007), aunque la implicación de las proteínas de *mismatch* en la ruta de reparación de ICLs no es clara.

1.8.2. Activación de la ruta FA/BRCA

La ruta FA/BRCA se activa durante la fase S del ciclo celular, en respuesta a horquillas de replicación bloqueadas (Taniguchi *et al.* 2002a). La activación de la ruta está controlada por ATR, de la familia de las fosfatidilinositol 3- serina/treonina quinasas (PIKKs). En respuesta al daño originado en el ADN, y en concreto, a la presencia de zonas de ADN monocadena en las horquillas de replicación bloqueadas, ATR fosforila un amplio número de sustratos, desencadenando el proceso de reparación del ADN y la activación del punto de control del ciclo celular (Zou y Elledge 2003).

FANCD2 es fosforilado directamente por ATR en T691 y S717. Esta fosforilación se requiere para que FANCD2 pueda ser monoubiquitinado y por tanto, activado (Ho *et al.* 2006). Lo mismo ocurre con FANCI, que es fosforilado en S730, S1121 y T952 (Smogorzewska *et al.* 2007). ATR también fosforila otros miembros de la ruta FA: la fosforilación de H2AX, ya comentada anteriormente, es imprescindible para el funcionamiento de la ruta FA/BRCA. FANCG es fosforilado en la S7, fosforilación

necesaria para la interacción de FANCG con FANCD1/BRCA2, XRCC3 y FANCD2 (Wilson *et al.* 2008) y FANCA es fosforilado en la S1449 (Collins *et al.* 2009).

Otro de los sustratos de ATR es la quinasa efectora CHK1. La activación de CHK1 durante la fase S del ciclo celular desencadena la activación del punto de control de fase S, parando la replicación del ADN y bloqueando la entrada de la célula en mitosis (Pichierri y Rosselli 2004; Enders 2008). Un análisis más exhaustivo de los efectos de CHK1 en la ruta FA/BRCA reveló que la proteína FANCE era directamente fosforilada por CHK1 en los residuos T346 y S347. Aunque esta fosforilación no es necesaria para la monoubiquitinación de FANCD2, sí lo es para corregir la sensibilidad de las células a ICLs (Wang *et al.* 2007).

Más discutido es el papel de ATM en la ruta FA/BRCA. ATM es el responsable de la fosforilación de FANCD2 en un residuo distinto a los empleados por ATR. ATM fosforila FANCD2 en la S222 en respuesta a radiación ionizante, modificación que parece importante para la reparación de roturas de doble cadena, pero que no es relevante para la monoubiquitinación de FANCD2 en respuesta a ICLs. (Taniguchi *et al.* 2002b)

1.8.3. Función de la ruta FA/BRCA

Aunque la función de la ruta FA/BRCA no ha sido del todo esclarecida hasta el momento, está claro que las proteínas FA están implicadas en la reparación de ICLs a través de su conexión con el sistema de HRR. Los ICLs constituyen una de las formas de daño en el ADN más complejas y perjudiciales para la célula ya que involucran las dos cadenas e impiden su separación, un paso esencial para la replicación o la transcripción, resultando especialmente dañinos para las células proliferativas. Es por este motivo que la reparación de los ICLs requiere la activación de múltiples sistemas de reparación, no sólo la HRR. Los modelos actuales incorporan los sistemas de HRR, reparación por escisión de nucleótidos (NER) y síntesis de ADN transección (TLS), tal como se esquematiza en la Figura 9 (Surralles *et al.* 2004; Niedernhofer *et al.* 2005).

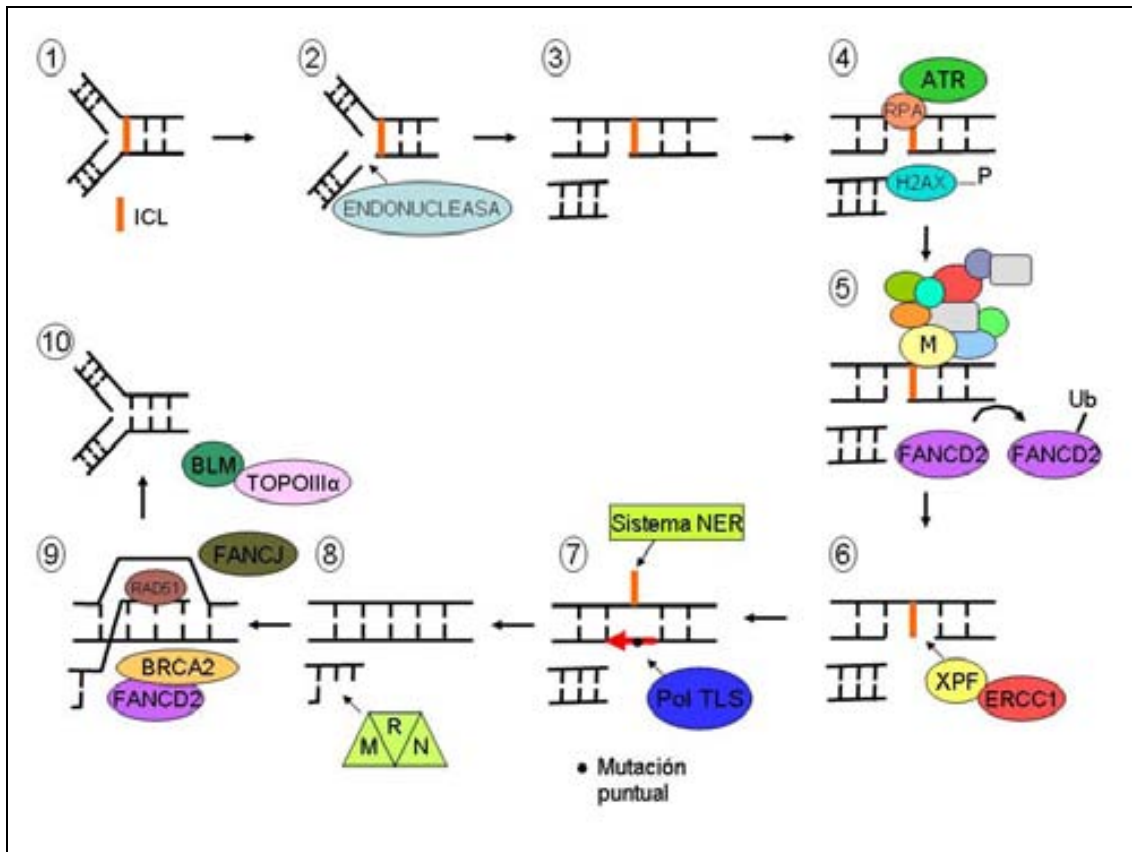


Figura 9. Modelo propuesto de reparación de los ICLs.

Una vez el ICL ha sido detectado, la primera incisión es efectuada por una endonucleasa en una de las dos cadenas replicadas generando una rotura de doble cadena. Se han propuesto algunos candidatos para este papel, como el complejo MUS81/EME1 o XPF/ERCC1 (Osman y Whitby 2007), aunque ninguno de los dos es esencial para la reparación de ICLs, de modo que podrían tener funciones redundantes o la responsable podría ser otra endonucleasa no identificada hasta el momento. En la otra cadena permanece el ICL y una región de ADN monocadena. RPA se une a la región de ADN monocadena permitiendo el reclutamiento de ATR. La fosforilación de la histona H2AX por parte de ATR y el reclutamiento del complejo FA al sitio del daño permiten la ubiquitinación de FANCD2/FANCI. Una segunda incisión al otro lado del ICL es necesaria para la reparación. Este paso parece claro que es realizado por el complejo XPF/ERCC1, una 5' endonucleasa perteneciente al sistema de reparación NER. Las células XPF o ERCC1^{-/-} presentan sensibilidad a ICLs y además, acumulan roturas de doble cadena, un intermediario en la reparación de horquillas de replicación bloqueadas en respuesta a agentes que inducen este tipo de daño (Niedernhofer *et al.* 2004). En este

punto, la cadena que contiene el ICL puede ser copiada mediante una polimerasa de TLS, un sistema con tendencia a introducir mutaciones (Nojima *et al.* 2005). Con una cadena ya reparada, la otra puede copiarse mediante el sistema de HRR. Se necesita primero obtener un extremo 3' libre, probablemente por la acción del complejo MRN que es capaz de reseccionar una de las cadenas. Inmediatamente después actúa la maquinaria de HRR: FANCD2 y FANCN permiten el acceso de BRCA2 a la cromatina, que a su vez carga a RAD51. En este momento empieza la invasión de cadena sobre la doble hebra ya reparada. La helicasa FANCJ podría actuar en este punto, abriendo la cadena para permitir el acceso de otras proteínas de reparación. Finalmente, el cruce de Holliday se resuelve, con la intervención del complejo BLM/TOPOIII α , el cuál se ha descrito que interacciona con el complejo FA (Meetei *et al.* 2003b), posiblemente mediante interacción directa con la proteína FANCM (Rosado *et al.* 2009), y el proceso de replicación puede continuar.

II. OBJETIVOS

Como ha quedado reflejado en los distintos apartados de la introducción, la AF es una enfermedad compleja a nivel molecular y también a nivel de fenotipo celular y clínico. La determinación de factores que explican parte de la variabilidad observada en estos pacientes y en qué grado contribuyen permitirá comprender mejor las bases moleculares de la enfermedad y a través de este conocimiento, desarrollar metodologías que permitan un diagnóstico más fiable de los pacientes (como en el caso de los pacientes mosaico) y la posibilidad de predecir la evolución de la enfermedad, adaptando el tratamiento a cada paciente. Las causas de la gran variabilidad observada entre los pacientes son probablemente debidas a factores muy diversos y que ejercen distintos grados de contribución. La existencia de 12 o más genes que causan un mismo fenotipo, podría explicar parte de esta variabilidad, o dentro de un mismo grupo de complementación, el tipo de mutaciones que presenta el individuo. La incapacidad de reparar correctamente los ICLs es la principal deficiencia de las células AF. No obstante, también presentan otras disfunciones como un exceso de daño oxidativo, desregulación en la producción de citoquinas pro-apotóticas o disfunciones teloméricas, que ponen en evidencia la participación de las proteínas FA en otros procesos celulares, los cuales, podrían actuar también modulando el fenotipo celular y clínico.

Así pues, el objetivo principal de este trabajo consiste en “la determinación de factores que condicionan la sensibilidad celular a ICLs y la severidad del fenotipo clínico, analizando la contribución de las variaciones propias de los genes FA (grupo de complementación y tipo de mutación) y la posible implicación de otros procesos celulares desregulados en AF”. Para poder determinar cuales son estos factores, es fundamental disponer de una población de enfermos bien caracterizada. Este trabajo, por tanto, incluye también la caracterización genética completa de la población española, en cuanto a complementar los estudios de subtipaje y determinar el espectro mutacional de la población, así como incorporar herramientas que permiten mejorar el diagnóstico y el análisis mutacional de la población. Los subobjetivos concretos planteados son:

1. Determinación de la variabilidad en la sensibilidad celular a agentes inductores de ICLs.
 - a. Distinción entre individuos no AF, AF mosaicos y AF no mosaicos

- b. Correlación entre diferentes índices de sensibilidad celular: fragilidad espontánea, inducida por DEB y por MMC.
2. Caracterización genética de la población española de pacientes de AF
 - a. Determinación de las frecuencias de los grupos de complementación. Estrategia de subtipaje y determinación del subtipo en pacientes pertenecientes a grupos menos frecuentes.
 - b. Determinación del espectro mutacional. Caracterización molecular de las mutaciones más frecuentes.
3. Análisis de factores que condicionan la sensibilidad celular a ICLs en los pacientes de AF: grupo de complementación y tipo de mutación.
4. Análisis de factores que condicionan el fenotipo clínico en los pacientes de AF: sensibilidad celular a ICLs, grupo de complementación y tipo de mutación.
5. Determinación de procesos celulares desregulados en células AF mediante el análisis de proteómica diferencial.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

III.1.PACIENTES Y MUESTRAS

Para este trabajo se han recolectado muestras de sangre periférica y datos clínicos de 112 pacientes españoles de AF y 105 individuos no AF, obteniendo previamente su consentimiento informado. También se han obtenido muestras de sangre de los familiares en los casos necesarios.

De los 112 pacientes de AF, 48 son hombres (41,9%) y 64 son mujeres (57,1%). No se ha encontrado ninguna asociación entre el género y las variables de sensibilidad celular o clínicas utilizadas en este trabajo.

Se ha obtenido de cada paciente, muestra de sangre en heparina para la realización del ensayo de fragilidad cromosómica y derivación de la LCL mediante la transformación por el virus Epstein-Barr (EBV). También se ha obtenido muestra de sangre en EDTA para extracción de ADN.

En algunos de los casos, sobretodo en el caso de sospecha de mosaicismo, se ha obtenido también muestra de biopsia de piel, de la cuál, se ha derivado un cultivo de fibroblastos primarios.

Para el cultivo de las LCLs se utiliza RPMI + 15% de suero fetal bovino + Plasmocin 2,5µg/ml (InvivoGen Cat.No.ANT-MPT), mientras que para los fibroblastos primarios se emplea DMEM + 10% de suero fetal bovino + Plasmocin 2,5µg/ml.

III.1.1. Obtención de LCLs

Para la obtención de una LCL inmortalizada mediante la transformación por el virus EBV, se parte de 5-10ml de sangre periférica en heparina sódica. Se realiza un aislamiento de linfocitos mediante la separación con Ficoll y centrifugación durante 25min a 2100rpm. Se recupera la fase de linfocitos (anillo formado justo por encima del ficoll) y se lava 2 veces con PBS para eliminar restos de ficoll de la muestra. Si el botón celular contiene eritrocitos (botón celular de color rojo), se procede a la eliminación de estos mediante un tampón de lisis de eritrocitos (150mM NH₄Cl, 10mM KHCO₃, 0,1mM EDTA, pH=7,3 ajustado con HCl) durante 10min en hielo. Seguidamente, se recuperan los linfocitos mediante centrifugación y se realiza un lavado adicional con PBS.

Una vez recuperados los linfocitos puros, se resuspende el botón de linfocitos en un medio RPMI + 20% de suero + 2% fitohemaglutinina + 1% antibiótico (penicilina/streptomina). Sobre estas células, se añade 1ml de medio que contiene el EBV (obtenido del medio de cultivo de las células productoras del virus B95-8, derivadas de linfocitos de mono tití) y se deja en el incubador de células. Pasados 15 días, todas las células que se encuentran en el cultivo están inmortalizadas.

III.1.2. Extracción de ADN

Las extracciones de ADN de sangre periférica se realizan mediante un protocolo estándar que incluye una lisis inicial de los eritrocitos mediante una solución hipotónica, la recuperación de un botón de linfocitos que posteriormente es lisado con un tampón específico y SDS e incubado a 37° durante 16h con ProteínaSAK para la digestión de las proteínas. El ADN es recuperado mediante la adición de NaCl y separado de la proteína y demás restos celulares mediante la adición de cloroformo. Finalmente, el ADN es precipitado con etanol y resuspendido en ddH₂O.

III.2. TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO Y SUBTIPAJE

III.2.1. Ensayo de fragilidad cromosómica

El ensayo de fragilidad cromosómica se realiza en sangre periférica con heparina sódica, básicamente tal y como propone la Dra. Auerbach, con algunas pequeñas variaciones (Auerbach 1994). A continuación se detalla brevemente el protocolo:

1. Para cada paciente se establecen 3 cultivos con un volumen final de 5ml cada uno: 0,5ml de sangre + RPMI + 15% de suero bovino fetal + 1% de antibióticos penicilina/estreptomina + 1% de L-Glutamina + 1% de Fitohemaglutinina.
2. A las 24h, se tratan dos de los cultivos con 0,1µg/ml de DEB. El cultivo restante será utilizado como control de daño espontáneo en el paciente.

3. A las 48-72h del tratamiento se procede a la preparación de metafases, habiendo añadido 2h antes, colcemide a una concentración final de 0,1 µg/ml.

Las preparaciones de metafases se realizan según el protocolo habitual:

1. El botón de células es resuspendido en solución hipotónica (0,075M KCl) y se deja actuar durante 25min a 37°C.
2. Se fijan las células mediante 3 lavados con metanol:ácido acético, en una proporción 4:1.
3. El material obtenido es goteado sobre portaobjetos y posteriormente, se tiñe con Giemsa.

Para el recuento de aberraciones, se cuentan 25-50 metafases de cada cultivo: el cultivo no tratado y 2 réplicas del cultivo tratado con DEB. Se cuentan solo metafases completas (46 cromosomas). Se registra el número de roturas que observamos en cada metafase y el tipo de aberraciones, cromosómicas y cromatídicas. A partir de este recuento se calculan varios índices que serán posteriormente utilizados en los diferentes análisis.

III.2.2. Western Blot

Para la preparación de extractos de proteína se lisan las células en solución RIPA (Upstate, Cat. No. 20-188) con la adición de un cóctel de inhibidores de proteasas (CompleteMini-EDTA free, Roche, Cat. No. 1836170001) e inhibidores de fosfatasa (PhosSTOP, Roche, Cat. No. 04906837001), después de un lavado de las células en PBS. Para la degradación de la cromatina, se añade a la muestra 25U/ml de Benzonaasa (Novagen, Cat. No. 70746) y se incuba a temperatura ambiente (TA) durante 10min.

La concentración de proteína obtenida es determinada mediante el sistema Bio-Rad Protein Assay (Biorad, Cat.No. 500-0001), según las instrucciones del fabricante.

La cantidad deseada de proteína, es cargada en un gel desnaturizante SDS-PAGE a la concentración de acrilamida apropiada y se procede con un protocolo de WB estándar, con transferencia en sistema Transblot Semi-Dry de Biorad, 1h a 20V, en filtro de nitrocelulosa. Posteriormente, se realiza la inmunodetección con el anticuerpo primario incubado en solución de bloqueo (5% de leche en polvo en TBS+Tween) durante 16h a

4°C. Los anticuerpos primarios utilizados son: anti-FANCA (Fanconi Anemia Research Fund, Eugene, Oregon, EUA) a una dilución [1:500], anti-FANCD2 (Abcam, ab2187) a [1:2500], anti-FANCI (Abcam, ab15344) a [1:1000], anti-VINCULIN (Abcam, ab18058) a [1:5000], anti-ACTINA (Abcam, ab8226) a [1:5000] y los anticuerpos anti-FANCB y anti-FANCL generados en conejo por nuestro laboratorio a través de la compañía Genosphere Biotechnologies, a una dilución [1:500] cada uno. Se incuba posteriormente con un anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa (HRP), durante 1h a TA y se detecta la señal después de incubar el filtro con la solución sustrato Pierce ECL Western Blotting Substrate (Pierce, Cat. No, 32106).

III.2.3. Análisis del bloqueo del ciclo celular en G2 y citometría

El análisis del bloqueo en la fase G2 del ciclo celular se analiza después de tratamiento del cultivo celular con MMC a 50nM durante 72h. Se siembra inicialmente, 10^6 células de LCL en 5ml de medio o 3×10^5 fibroblastos en 15ml. Se establece también un cultivo no tratado para la evaluación del ciclo celular en condiciones basales.

Pasadas las 72h se realiza el recuento de las células para evaluar la viabilidad y verificar que las células han proliferado durante este tiempo. Seguidamente, las células se fijan mediante adición de etanol 70% frío durante 30min a 4°C.

El ciclo celular se evalúa mediante citometría de flujo, midiendo la cantidad total de ADN en cada célula. Para ello, se prepara la muestra eliminando el etanol y resuspendiendo 10^6 células en 1ml de una solución de PBS + Ioduro de Propidio (PI) [40µg/ml] + RNAsaA [0,1mg/ml] e incubando la muestra 30min a 37°C. Pasado este tiempo, las células se mantienen en hielo hasta ser pasadas por el citómetro del flujo.

Se utiliza para este análisis un citómetro modelo FACScalibur (Becton Dickinson). Una vez seleccionadas las células con un tamaño adecuado (células enteras) se mide la fluorescencia del PI, mediante excitación a 488nm y emisión en el canal FL2 (585nm). La cuantificación de la fluorescencia nos permite diferenciar las células con contenido 2n (fase G1), 4n (fase G2) o intermedio (fase S). La adquisición de las células en el citómetro se controla mediante el programa informático CellQuestPro y el porcentaje de células que se encuentra en cada una de las fases del ciclo celular se determina mediante el programa informático FlowJo.

III.3. DETECCIÓN DE MUTACIONES

III.3.1. Detección de la mutación c.295C>T en FANCA

La detección de la mutación más común en los pacientes de AF de etnia gitana (c.295C>T) en el exón 4 de *FANCA*, se realiza según descrito en el artículo original de la descripción de la mutación (Callen *et al.* 2005). Los cebadores utilizados son: 5' CTTTGCATCTATTCTCCCCG 3' y 5' GTAACAACGGGCAGGTTTC 3', obteniendo un fragmento de 324pb.

III.3.2. Detección de mutaciones en los genes FA

El análisis mutacional de los pacientes españoles no gitanos, se ha llevado a cabo en el servicio de análisis mutacional de VU University Medical Center (VUMC) en Amsterdam.

El sistema de detección de mutaciones consiste en la realización de MLPA para la detección de deleciones intragénicas y la amplificación de exones y zonas intrónicas próximas para el análisis de variantes mediante DHPLC y posterior secuenciación del fragmento.

La técnica de MLPA para la detección de deleciones se realiza básicamente como está descrito en (Schouten *et al.* 2002). Para ello, se emplean los kits de detección desarrollados por MRC-Holland BV, Amsterdam, para los genes *FANCA*, *FANCD1* y *FANCN* (detalles disponibles en <https://www.mrc-holland.com>). Brevemente, el ADN es desnaturalizado 5min a 98°C, se añaden 3µl de mezcla de las sondas específicas para cada exón y se deja incubar 16h a 60°C. Pasado este tiempo se añade la ligasa y se incuba a 54°C, 15min. Seguidamente, 10µl de esta reacción se transfieren a un tubo conteniendo una mezcla de amplificación por PCR (tampón de PCR, dNTPs, polimerasa Taq y los cebadores universales, de los cuales, uno está marcado con carboxifluoresceína). La amplificación se lleva a cabo en 33 ciclos (30seg a 95°C, 30seg a 60°C y 60seg a 72°C). Los fragmentos son analizados mediante un secuenciador ABI310 (Applied Biosystems).

La detección de mutaciones puntuales se realiza mediante amplificación de cada uno de los exones del gen, incorporando las secuencias intrónicas flanqueantes, obteniendo productos de amplificación de 200-450pb, que serán después analizados mediante DHPLC. Los genes *FANCD1*, *-D2* y *-I*, son analizados desde cADN, por lo que se requiere una línea celular. Los productos de PCR son desnaturalizados-renaturalizados y posteriormente analizados mediante DHPLC, en el sistema WAVE (Transgenomic). Los productos en los que se observa una variante, son posteriormente secuenciados mediante el kit BigDye Terminator Cycle Sequencing V3.1 Ready Reaction (Applied Biosystems) y analizados en un secuenciador ABI PRISM 3100.

III.4. ANÁLISIS DEL HAPLOTIPO ASOCIADO A LA MUTACIÓN C.3788_3790DELCT EN *FANCA*

III.4.1. Detección de la mutación c.3788_3790delTCT

Para la amplificación de la región del exón 38 donde se localiza la mutación c.3788_3790delTCT se usan los cebadores: 5' GGGAGATGATGCTGAGTTGG 3' y 5' GTCTGGAAACCCTGACTTGG 3', obteniendo un fragmento de 466pb. Se usa un programa de amplificación estándar, de 30 ciclos, con una temperatura de hibridación de 58°C y un tiempo de extensión de 45seg. Para la reacción de amplificación, aproximadamente 0,25µg de ADN se mezclan con tampón de la polimerasa 1X, 0,125mM de dNTPs, 1,5mM de MgCl₂, 1 unidad de polimerasa Taq, 0,25µM de cada uno de los cebadores y se añade ddH₂O hasta completar un volumen de 25µl por cada reacción.

III.4.2. DHPLC para la detección de SNPs

Para la determinación del haplotipo asociado a la mutación c.3788_3790delTCT, se analizan 10 SNPs altamente polimorficos localizados en el interior del gen *FANCA*,

mediante la técnica de DHPLC, según descrita por Oefner y Underhill en 1995 (Yu *et al.* 2006), y el sistema WAVE (Transgenomic). Brevemente, a partir de un fragmento amplificado (150-500pb) que contiene el nucleótido de interés, se procede a la desnaturalización y renaturalización de la muestra para la formación de heterodúplexes y homodúplexes. La muestra es pasada a través de una columna que retiene el ADN y posteriormente se eluye despacio, pasando el eluido a través de un medidor de absorbancia. Para fragmentos del mismo tamaño, aquellos que contienen un apareamiento incorrecto fluyen a tiempos más cortos que los que forman un apareamiento perfecto. Así pues, si el individuo analizado es heterocigoto para el SNP, se espera un patrón de dos picos de absorbancia a tiempos distintos. Si el individuo es, en cambio, homocigoto, se espera obtener un solo pico, tal y como muestra la Figura 10. Para conocer el genotipo de los individuos homocigotos, se realiza una mezcla de cantidades equivalentes de ADN del individuo a estudiar y de un individuo control homocigoto de genotipo conocido y se repite el proceso, obteniendo un solo pico de absorbancia si paciente y control comparten genotipo, y dos picos si muestran genotipos distintos.

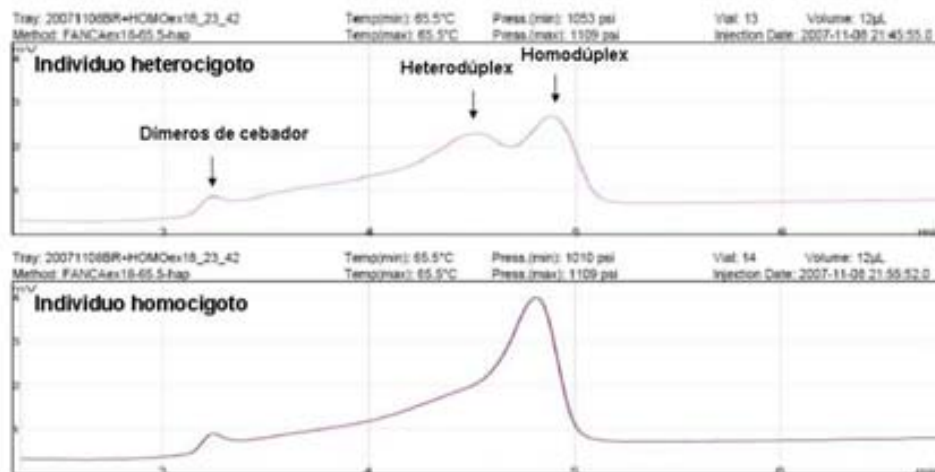


Figura 10. Ejemplo del resultado obtenido mediante el análisis de DHPLC del producto de amplificación del exón 18 de *FANCA*, en un individuo heterocigoto y un homocigoto para el SNP rs1800335.

Las amplificaciones de las regiones del gen que contienen los SNPs se realizan según las condiciones detalladas a continuación. En la Tabla 5 se muestran los cebadores utilizados para la amplificación de cada uno de los fragmentos.

Tabla 5. SNPs analizados para la determinación del haplotipo. Cebadores utilizados y tamaño del fragmento amplificado.

SNP	Exón	Posición	Fragmento (pb)	Cebadores
rs1800285	6	c.596+74G/A	384	F: 5'GCCCAAAGGCCAGGGAGTTT 3' R: 5'AGCCAGAAATCAAACCCGTCTGA 3'
rs1800286	8	c.710-12G/A	294	F: 5'CCCAAGCCATATGCTCACC 3' R: 5'GGTACAAACAGCACGTTTCAA 3'
rs7190823	9	c.796G/A	189	F: 5'GCAGGTATCACACAAATTACAG 3' R: 5'GCACAGTGAAACATACAGAGG 3'
rs2239359	16	c.1501G/A	247	F: 5'TGACTGTAAAGGGCTGTGTTTC 3' R: 5'GTGAGGAGTGGGCATGGA 3'
rs1800335	18	c.1715+82T/C	316	F: 5'GGCCTTCACTGCTCAGTCTT 3' R: 5'TGGGACACATTCCAAAGAGC 3'
rs1800340	23	c.2151+8T/C	328	F: 5'AGCAGGATCCGTGGAATCGTAC 3' R: 5'GAGAAGGCTCCATGCGTCTAATG 3'
rs7195066	26	c.2426G/A	444	F: 5'GAGGGCCAGGCTGCTACTT 3' R: 5'GACAGATAAAATTCTGGAAGG 3'
rs1800345	33	c.3240-42 G/A	390	F: 5'GACACAGGCCAAGGCTCTG 3' R: 5'GGCATTCCAGACACTGTTCC 3'
rs1061646	40	c.3935-16T/C	314	F: 5'CCAGCTGCTGACAGGTACC 3' R: 5'GGACCCAGAAGTGCTGAGATG 3'
rs1800359	42	c.4260+29T/C	275	F: 5'GACTATGGGGGACACACCAG 3' R: 5'GGCTCTGGCAGAAATAGTCG 3'

La amplificación de todos los productos se realiza en unas mismas condiciones: 0,25µg de ADN se mezclan con tampón de la polimerasa 1X, 0,125mM de dNTPs, 1,5mM de MgCl₂, 1 unidad de polimerasa Taq, 0,25µM de cada uno de los cebadores y se añade ddH₂O hasta completar un volumen de 50µl por cada reacción.

El programa de amplificación es el siguiente:

- Desnaturalización: 94°C, 4min.
- Touchdown* (10 ciclos): Desnaturalización: 94°C, 20seg.
Hibridación: 63°C, 20 seg (-0,5°C/ciclo)
Extensión: 72°C, 50seg.
- Amplificación (22 ciclos): Desnaturalización: 94°C, 30seg.
Hibridación: 58°C, 30 seg
Extensión: 72°C, 50seg.
- Extensión: 72°C, 5min.

Una vez amplificados los productos, se realiza la reacción de desnaturalización-renaturalización según el protocolo:

1. Se mezclan los productos amplificados de paciente y control, en caso necesario, en una proporción 1:1, obteniendo un volumen de reacción de 10µl.

2. Reacción de desnaturalización-renaturalización: 95°C durante 5min, seguido de enfriamiento progresivo, -1,4°C/min, hasta una temperatura de 25°C.

III.4.3. Análisis de microsatélites o VNTRs

Para la caracterización adicional del haplotipo, se analizan 4 microsatélites o VNTRs (del inglés, Número variable de repeticiones en tándem), localizados en zonas próximas al gen *FANCA*. Para el análisis de los VNTRs se amplifica un fragmento que contiene el VNTR mediante el uso de cebadores marcados con el fluorocromo 6-FAM. Posteriormente, se analiza el tamaño del fragmento amplificado mediante el secuenciador automático ABI3130XL, utilizando un marcador de peso molecular de 50 a 500pb marcado con el fluorocromo ROX. Los resultados son analizados mediante el programa informático GeneMapper. Los cebadores utilizados para la amplificación de cada uno de los microsatélites se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6. Cebadores y fragmento amplificado para el análisis de los VNTRs.

VNTR	*Dint.	*Fragm. (pb)	Cebadores	Referencia
d16s3026	CA	178-210	F: 5'CTCCCTGAGCAACAAACACC 3' R: 5'GGTCATTTATATGCGCCTGA 3'	Base de datos UniSTS NCBI
d16s3121	CA	79-85	F: 5'CATGTTGTACATCGTGATGC 3' R: 5'AGCTTTTATTCCAGGGGT 3'	Base de datos UniSTS NCBI
d16s3407	CA	195-205	F: 5'CCAACAATGCCAATTTCTAG 3' R: 5'CTCAGCCACACAGATAAAC 3'	(Whitmore <i>et al.</i> 1998)
d16s303	CA	101-121	F: 5' GATCAGTGCTCGTTTTTTTTGGTTTGG 3' R: 5' CAACAAGAGCGAAACTCGGTCTCAA 3'	Base de datos UniSTS NCBI

*Dint. es dinucleótido y Fragn. es fragmento

Para la reacción de amplificación, aproximadamente 1µg de ADN se mezcla con tampón de la polimerasa 1X, 0,125mM de dNTPs, 1,5mM de MgCl₂, 1 unidad de polimerasa Taq, 0,5µM de cada uno de los cebadores y se añade ddH₂O hasta completar un volumen de 25µl por cada reacción.

Para los VNTRs d16s3026, d16s3121 y d16s303, el programa de amplificación consiste en 30 ciclos de amplificación, con una temperatura de hibridación de 55°C y un tiempo de extensión de 2min; mientras que para el d16s3407, se utilizan también 30 ciclos de amplificación, con una temperatura de extensión de 60°C y 30seg de tiempo de extensión.

III.5. DETERMINACIÓN DE LOS PUNTOS DE ROTURA DE LA DELECIÓN EN EX1-20 DEL GEN *FANCA*

III.5.1. Array CGH

En este estudio se han utilizado dos microarrays distintos: (1) realizado en colaboración con el servicio de arrays de la Universidad de California y San Francisco (UCSF) que consta de 2464 BACs distribuidos a lo largo de todo el genoma humano, con una resolución de 1,4Mb (distancia media de separación entre BACs) y (2) microarray de alta resolución (32433 BACs solapantes que cubren casi la totalidad del genoma humano) realizado en colaboración con el servicio de arrays del Centro de Investigación del Cáncer de la Universidad de British Columbia (BCCRC).

La técnica de CGH (del inglés, Hibridación genómica comparada) permite la cuantificación relativa de número de copias en un genoma mediante la hibridación simultánea de la muestra problema y una muestra control marcadas con fluorocromos distintos, en este caso, sobre microarrays que contienen un número determinado de BACs, cada uno con una secuencia de 50-300pb que representa un fragmento del genoma humano. Se obtiene una medida de la fluorescencia de cada uno de los fluorocromos utilizados, que representa una medida directa de la cantidad de ADN hibridado en el BAC. El ratio (o proporción) de la cantidad de fluorescencia de la muestra problema y la muestra control, indica si para una determinada secuencia, existen diferencias en cuanto al número de copias entre las dos muestras. La diferencia en la cantidad de fluorescencia entre la muestra problema y la muestra de referencia se expresa mediante el \log_2 ratio, de modo que la igualdad de copias entre las dos muestras se observa como valores de \log_2 ratio=0 y las deleciones en heterocigosis como \log_2 ratio=-0,5. Cada uno de los BACs está representado por 3 puntos en el microarray, por lo que los valores obtenidos representan la media de 3 medidas. Las posiciones de los distintos BACs y genes se muestran según la versión del genoma humano NCBI36.

III.5.2. Análisis de marcadores genéticos (SNPs)

En el análisis de marcadores genéticos en ADN para delimitar los puntos de rotura de la deleción que incluye los exones 1-20 de *FANCA*, se amplifican diferentes regiones que comprenden varios SNPs polimórficos en la población. Los SNPs analizados y los cebadores utilizados para la amplificación del fragmento se muestran en la Tabla 7.

Tabla 7. Regiones amplificadas y cebadores utilizados en el análisis de SNPs para la delimitación de los puntos de rotura de la deleción ex1-20 de *FANCA*.

Gen	SNPs	Fragm. (pb)	Cebadores	Cond. Amp.*
<i>SNPs fase 1</i>				
SPIRE2	rs9928396, rs9935541	389pb	F: 5'TGCTCTCTGCATGGGAAGGG 3' R: 5'GGATGTCATGGGTGTGTGGC 3'	T ^a hib: 60°C T. Ext: 45seg
FLJ20286	rs12596872, rs8049897, rs8051733	476pb	F: 5'GAGGGTCTAGGCTAATAGGG 3' R: 5'GTTTCCTTCTCTGGGTGAGG 3'	T ^a hib: 58°C T. Ext: 45seg
GAS8	rs3743829, rs3743827, rs3743826	406pb	F: 5'CCGCTGATGGGAATTATGGG 3' R: 5'TGTGTGTGGTAAAGGGTGGG 3'	T ^a hib: 60°C T. Ext: 45seg
<i>SNPs fase 2</i>				
TCF25 (1)	rs1109334	701pb	F: 5'ACACGCATGCTAGAAGCTGG 3' R: 5'TCTTCTGTCTGGGATGTGCG 3'	T ^a hib: 56°C T. Ext: 60seg
TCF25 (2)	rs11866200, rs2270461, rs2270460	416pb	F: 5'CGGCTTCCTTGATCTCAGAG 3' R: 5'AGCAGTGACGATGGTGACAC 3'	T ^a hib: 58°C T. Ext: 45seg
MC1R	rs3212359, rs3212361, rs3212363	706pb	F: 5'AAGCAGGAAGGAGTCGTTGG 3' R: 5'TGCTTTGGCTGAGAGCAGAG 3'	T ^a hib: 58°C T. Ext: 60seg
<i>SNPs fase 3</i>				
TCF25 (3)	rs7199642, rs7184225, rs12919894	1628pb	F: 5'GCCTAGTTTTGCTTCTTCAG 3' R: 5'CTGGCCTAGAATCTTTTCTG 3'	T ^a hib: 54°C T. Ext: 120seg
TCF25 (4)	rs12930056, rs12930606, rs17784386	950pb	F: 5'CAAGGATACGATTCAGGAGC 3' R: 5'CCATTGAAGTTCAGCTTGGC 3'	T ^a hib: 56°C T. Ext: 60seg
TCF25 (5)	rs9806913, rs9922515	548pb	F: 5'TCCCTCAAGGGTAAACTAGC 3' R: 5'AATCGCTGTCCCTACTTCAG 3'	T ^a hib: 56°C T. Ext: 45seg
TCF25 (6)	rs7184960, rs2293586	967pb	F: 5'AGCTGCACTCACCTGTTCTC 3' R: 5'ACCTCGTAGGTAAGGCAGAG 3'	T ^a hib: 58°C T. Ext: 60seg
TCF25 (7)	rs11646448	328pb	F: 5'CCTTTCTCAGCCTATGTCAC 3' R: 5'CAGCTCTTGACTTTCTCTGC 3'	T ^a hib: 56°C T. Ext: 45seg
TCF25 (8)	rs10153210, rs10153196	418pb	F: 5'CACTGGTACAATCCAATGCC 3' R: 5'TTCCACTGGCGTATTCCTG 3'	T ^a hib: 54°C T. Ext: 45seg

* Cond. Amp.: "Condiciones de amplificación". T^a hib.: "Temperatura de hibridación" y T. ext.: "Tiempo de extensión".

Para la reacción de amplificación, aproximadamente 0,25µg de ADN se mezcla con tampón de la polimerasa 1X, 0,125mM de dNTPs, 1,5mM de MgCl₂, 1 unidad de polimerasa Taq, 0,25µM de cada uno de los cebadores y se añade ddH₂O hasta completar un volumen de 25µl por cada reacción.

El programa de amplificación es un programa estándar de 30 ciclos de amplificación. Se modifica solo la temperatura de hibridación y el tiempo de extensión, especificado dentro de la tabla, en cada caso.

III.5.3. Cuantificación de dosis génica mediante PCR a tiempo real

Para la amplificación mediante PCR a tiempo real se diseñan 6 parejas de cebadores dentro del gen *TCF25* (Regiones TC) y una pareja de cebadores en el gen *SPIRE2* (Región SP1), que se describen en la Tabla 8.

Tabla 8. Cebadores y regiones amplificadas en la PCR a tiempo real.

Región	Fragm. (pb)	Cebadores*	Observaciones
SP1	154	F: 5'GAAGTCAAGAGTCCTGGTGT 3' R: 5'CTGTGTCCTGAAGGATGTCT 3'	Región control: 1 copia
TC1	202	F: 5'TGTCATCTCCATCCGTCTTG 3' R: 5'ATCTCAGCATGAGCGTTCAC 3'	
TC2	252	F: 5'TGTTGTTCGGCTCCATAGAC 3' R: 5'CACTCAGGTCAAGTTTGTGCG 3'	
TC3	192	F: 5'GAGTAGATTGTGTCCGAAGG 3' R: 5'TCAGACTCTGTGGCTATCTC 3'	Región control: 2 copias
TC4	256	F: 5'TGCTGTCCTCAATCCTCTCT 3' R: 5'GATTCTGTCTATGCTGAGCG 3'	
TC5	262	F: 5'TGGATTCAAGTGTCTGGGGA 3' R: 5'ACACAGTGCCTCTTGACACA 3'	
TC6	207	F: 5'TTTTAGGGGTGGTCAGCCAT 3' R: 5'CATCCTGTCCTTAATGCGTC 3'	

* Los cebadores tienen todos 30nt de longitud y un porcentaje de GC del 50%.

La PCR a tiempo real se realiza mediante el sistema LightCycler 2.0 de 32 capilares. Para la preparación de las muestras, se utiliza el Kit LightCycler DNA Master SYBR Green I (Roche Cat.No. 03003230001), según las instrucciones del fabricante.

El sistema LightCycler de Roche utiliza el punto de inicio de la fase exponencial (Cp) de la amplificación, como medida de la cantidad de ADN inicial o número de copias (Figura 11a). La cantidad de ADN amplificado es medido después de cada ciclo, a partir de la cantidad de fluorescencia producida por el SYBR unido a ADN de doble hebra. Para la extrapolación del Cp a cantidad de ADN, se establece en cada experimento, una recta patrón empleando los cebadores de la región control (TC3) y ADN del individuo control (cantidad de ADN conocida). La recta patrón consta de 5 puntos, con diluciones seriadas de ADN, empleando un factor de dilución 2 y partiendo de 700ng de ADN total

(Figura 11b). Cada región se amplifica en un individuo control (2 copias de la región en el genoma) y el individuo problema, y el número de copias se expresa de forma relativa. Cada punto se realiza por duplicado y se tiene en cuenta la media, estableciendo también un blanco (o muestra sin ADN) para cada región.

Para comprobar la especificidad de los cebadores, se utiliza la curva de fusión, que permite verificar la amplificación de una o más especies de ADN. La amplificación de distintos fragmentos en una misma muestra se visualiza como varios picos de fluorescencia con una T_m distinta. Esta información es necesaria también para determinar una temperatura de lectura de fluorescencia que permita diferenciar la fluorescencia producida por los dímeros de cebador de la de los fragmentos amplificados (Figura 11c). Posteriormente a la amplificación por PCR a tiempo real, se comprueba que el tamaño del fragmento amplificado corresponde con el esperado mediante electroforesis en gel de agarosa.

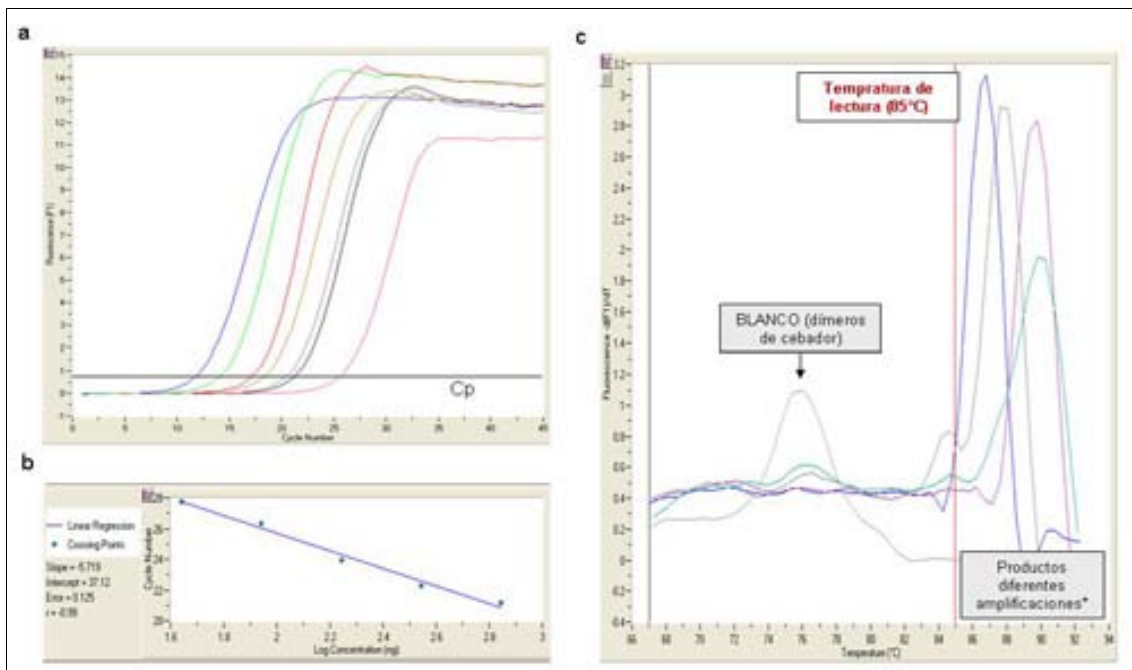


Figura 11. Ejemplo de análisis mediante PCR a tiempo real. (a) Amplificación cuantitativa de los productos de forma continuada en los 45 ciclos y señalización del punto de inicio de la fase exponencial de amplificación (C_p). (b) Recta de calibración entre C_p y cantidad de ADN. (c) Visualización de la curva de fusión en la que se observa un pico de fluorescencia por cada producto amplificado y la determinación de la temperatura de lectura según las T_m de los productos y de los dímeros de cebador. * Los productos mostrados corresponden a SP1, TC1, TC2 y TC3.

Se realizan dos fases de PCR a tiempo real. En la primera se amplifican las regiones TC3 (región control), TC1, TC2 y SP1. El programa utilizado para la amplificación es:

1. Desnaturalización: 95°C, 600seg.
2. Amplificación (45 ciclos): Desnaturalización: 95°C, 20seg.
Hibridación: 58°C, 10seg.
Extensión: 72°C, 11seg.
Lectura fluorescencia: 85°C, 5seg.
3. Curva de fusión: Calentamiento progresivo, desde 65°C hasta 95°C, a 0,1°C/seg, con lectura de fluorescencia continuada.

En la segunda fase se amplifican las regiones: TC3 (región control), TC4, TC5 y TC6. El programa utilizado sigue el mismo patrón que el anterior con las variaciones de: temperatura de hibridación a 62°C y temperatura de lectura de fluorescencia a 75°C.

III.5.4. Amplificación y clonación de la región del punto de rotura

Para la amplificación de la región que contiene el punto de rotura se utiliza la polimerasa de alta procesividad Taq Platinum (Invitrogen, Cat. No. 10966018) según lo establecido por el fabricante.

Para la reacción de amplificación, aproximadamente 0,25µg de ADN se mezcla con Tampón de la polimerasa 1X, 0,125mM de dNTPs, 1,5mM de MgSO₄, 1 unidad de polimerasa, 0,25µM de cada uno de los cebadores y se añade ddH₂O hasta completar un volumen de 50µl por cada reacción.

El programa de amplificación es el siguiente:

1. Desnaturalización inicial: 94°C, 2min.
2. Amplificación (30 ciclos): Desnaturalización: 94°C, 30seg.
Hibridación: 57°C, 30seg.
Extensión: 68°C, 4min.
3. Extensión final: 68°C, 10min.

Antes de la secuenciación del fragmento, se procede a la clonación del mismo en un vector mediante el sistema TOPO TA (Invitrogen, Cat.No. K4500). Brevemente, 2,5µl

del producto de la PCR es ligado con 1µl de vector, 10min a TA. Posteriormente, se transforman las células competentes y se siembra en una placa de LB+Ampicilina. Al día siguiente, se realizan cultivos líquidos de LB+Ampicilina y se deja creciendo durante 16h a 37°C. Seguidamente, se realizan las minipreps mediante extracción con el sistema NucleoSpin Plasmid QuickPure (Macherey-Nagel, Cat. No. 740615). El producto obtenido se secuencía a partir de los cebadores universales que existen en la secuencia del vector.

III.6. LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE FANCA

III.6.1. Fraccionamiento celular: Núcleo y citoplasma

Para el fraccionamiento celular de núcleo y citoplasma, se utiliza el método descrito por Méndez y Stillman (Mendez y Stillman 2000) con algunas modificaciones. Brevemente, 5×10^6 células se resuspenden en 200µl de una solución A (10mM HEPES, 10mM KCl, 1,5mM MgCl₂, 340mM de sucrosa, 10% de glicerol, 1mM DTT, 0,1% de Tritón e inhibidores de proteasas y fosfatasa) y se incuba 10min en hielo. Se centrifuga a 1300g, 4min a 4°C y se recupera el botón de núcleos. El sobrenadante contiene la fracción citoplasmática, que se recupera y guarda. El botón de núcleos se lava una vez con solución A, centrifugando en las mismas condiciones. Se elimina el sobrenadante y se procede a la lisis de los núcleos añadiendo 100µl de solución B (2mM EDTA, 0,2mM EGTA, 1mM DTT, 150mM NaCl e inhibidores de proteasas y fosfatasa). Antes de usar la solución B se añade la Benzona para la degradación de la cromatina y se incuba la muestra 10min a TA. La concentración de proteína de las fracciones nucleares y citoplasmáticas obtenidas se cuantifica mediante el sistema Bio-Rad Protein Assay.

Para la comprobación de que el fraccionamiento ha sido realizado correctamente, se utiliza la detección de una proteína que es exclusivamente nuclear (ORC2) y una proteína exclusivamente citoplasmática (GAPDH). Los anticuerpos utilizados para la detección de estas dos proteínas son: anti-ORC2 (Abcam, ab68348) a una dilución [1:500] y anti-GAPDH (Abcam, ab9485) a una dilución [1:2500].

III.6.2. Inmunofluorescencia

La localización subcelular de FANCA se determina mediante inmunofluorescencia. Para ello, 2×10^6 células de LCL se centrifugan y se resuspenden en 200 μ l de medio de cultivo para sembrarlas sobre un portaobjetos cubierto de polilisina. Se deja que las células se adhieran a la matriz durante 2 min. Después de un lavado con PBS 1X, realizamos un tratamiento con una solución hipotónica (PBS 0,4X) durante 1min. Seguidamente, realizamos la fijación de las células mediante incubación en una solución de PBS+Formaldehído 4% durante 15min. Después de este tiempo, se realizan 2 lavados con PBS y se guardan los portaobjetos en esta solución a 4°C hasta empezar la inmunodetección.

La inmunodetección se realiza siguiendo un protocolo estándar. Brevemente, las células se incuban con una solución de PBS+ 0,5% de Tritón durante 10min, permitiendo así la permeabilización de las membranas celulares. Se realiza un lavado con PBS y seguidamente, se incuban con una solución de bloqueo (PBS+BSA 3%+Tween 0,05%) durante 5 min. La incubación con los anticuerpos primarios se realiza en una cámara húmeda, durante 45min a 37°C. Los anticuerpos primarios utilizados son anti-FANCA (Fanconi Anemia Research Fund, Eugene, Oregon, EUA) a una dilución [1:1000] y anti- γ -H2AX (Upstate, DS-636) a una dilución de [1:3000] en solución de bloqueo. Se realiza posteriormente un lavado del anticuerpo primario en solución de bloqueo durante 15min y se procede a la incubación con los anticuerpos secundarios en la cámara húmeda, a 37°C durante 20min. Los anticuerpos secundarios utilizados son: Alexa488 anti-rabbit (Molecular Probes, Cat. No. A11034) a [1:500] y Alexa568 anti-mouse (Molecular Probes, Cat. No. A11031) a [1:1000]. Se realiza también un lavado en solución de bloqueo y, después de enjuagar los portaobjetos en dH_2O , se dejan secar a TA. Una vez secos, los portaobjetos se montan con 80 μ l de DAPI 2 μ g/ml en Antifade Vectashield (Vector Laboratories, Cat. No. H-1000), se cubren con un cubreobjetos y se sellan.

III.7. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE PROTEÍNAS

El análisis de la expresión diferencial de proteínas se ha realizado mediante la técnica de electroforesis diferencial en gel (DIGE) (Unlu *et al.* 1997; Von Eggeling *et al.* 2001). La parte técnica del estudio se ha subcontratado en el servicio de proteómica del Hosp. de la Vall d'Hebrón, dirigido por el Dr. Francesc Canals.

La preparación de los extractos de proteína se realiza mediante lisis de 6×10^6 células en un tampón que contiene 7M Urea + 2M Thiourea + 4% CHAPS. La muestra se homogeniza y se sonica, para una completa lisis celular y disrupción de la cromatina. Posteriormente, la proteína se precipita con Acetona/TCA (Clean Up Kit, Amersham). Para la reacción de marcaje, la proteína se resuspende en el tampón de marcaje (7M Urea + 2M Thiourea + 4% CHAPS + 30mM Tris) y se cuantifica con el sistema Lowry-RCDC (BioRad). 50µg de proteína de cada LCL se marcan con el fluorocromo correspondiente (se usan los fluorocromos Cy3 y Cy5 para el marcaje de las muestras, y Cy2 para el marcaje de una mezcla de los extractos protéicos de todas las líneas analizadas que se utiliza como control interno de la variabilidad entre geles).

Los 50µg de proteína marcada se mezclan con 100µg adicionales de proteína no marcada de la misma línea. Las dos líneas a comparar y la mezcla de proteínas utilizada como control se cargan en un mismo gel de acrilamida al 10%, que permite la separación electroforética bidimensional de las proteínas, por peso molecular y por punto isoeléctrico (gradiente de pH=3-10) (Figura 12a). Una vez completada la migración electroforética, se obtiene un patrón de “spots” o puntos, cada uno de los cuales representa una proteína. El gel es escaneado con el sistema Typhoon Laser para determinar la fluorescencia total de cada punto y los valores de fluorescencia obtenidos se comparan para determinar diferencias entre las dos líneas. Un ejemplo de un punto con expresión diferencial entre las dos líneas se presenta en la Figura 12b. Para la comparación de muestras en las que la migración electroforética ha sido realizada en geles distintos, los valores de fluorescencia son normalizados utilizando como referencia el valor de fluorescencia de Cy2. Se localizan aquellos puntos que presentan una expresión diferencial por encima del valor de ratio predeterminado. Cada gel se realiza en triplicado, y se consideran aquellos puntos que presentan un valor de ratio superior o igual a $\pm 1,6$ (Figura 12c) y una significación estadística en la prueba T.

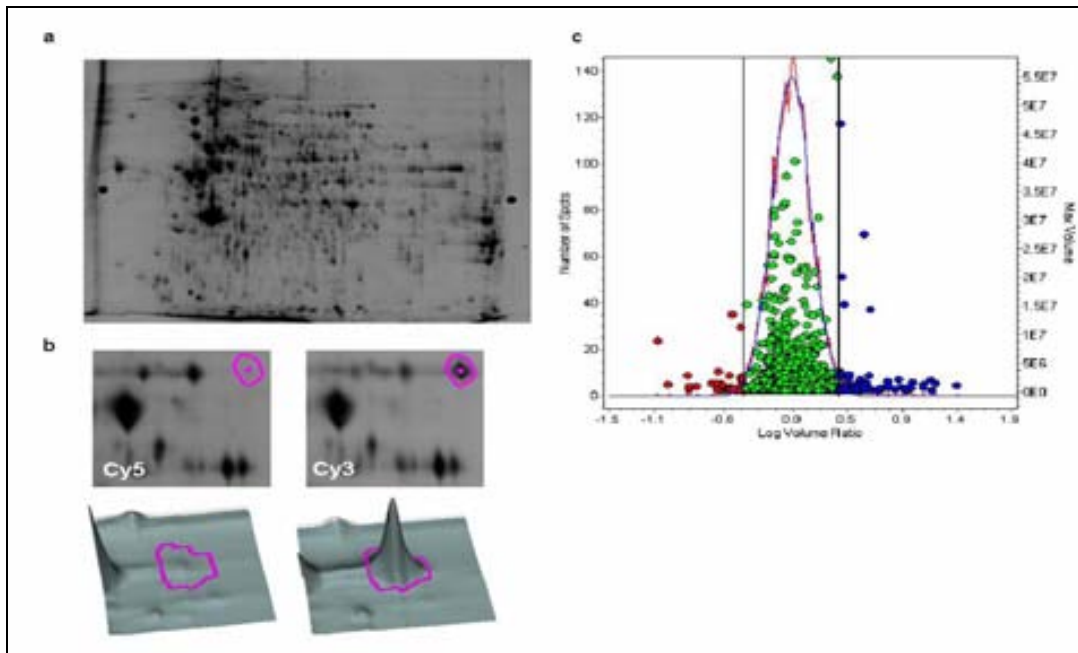


Figura 12. Ejemplo de análisis de expresión diferencial mediante DIGE. Se muestra la resolución de proteínas en un gel 2D (a), la visualización de un punto con expresión diferencial entre las dos líneas (b) y la distribución del ratio de los puntos identificados según el \log_2 ratio (c).

La identificación de las proteínas se realiza por espectrometría de masas, en el sistema MALDI-TOF. Se extraen del gel, mediante un sistema robotizado, los puntos en los que se ha determinado una expresión diferencial entre líneas. La proteína es digerida con tripsina y se procede a la identificación de los péptidos.

III.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los análisis estadísticos se han realizado mediante el programa informático SPSS v15.0 para Microsoft Windows. La prueba realizada se especifica en cada caso.

A modo general, la normalidad de las variables se comprueba mediante la prueba de contraste de normalidad de Kolmogorov-Smirnov. Para comparaciones entre dos grupos, se usa la prueba T cuando la variable se distribuye de forma normal, y la U de Mann-Whitney cuando no. Para comparaciones entre 3 o más, grupos, se utiliza la ANOVA o prueba no paramétrica según el caso, y se determinan las diferencias entre cada grupo mediante pruebas post-hoc de Bonferroni o de Tamhane para grupos con varianzas no homogéneas. Para análisis de correlación entre variables continuas, se emplea la correlación de Pearson (variables con distribución normal) o Rho de Spearman (variables con distribución no normal).

IV.RESULTADOS

IV.1. DIAGNÓSTICO DE AF

IV.1.1. *Ensayo de fragilidad cromosómica*

Hasta la fecha han sido realizados 198 ensayos de fragilidad cromosómica en nuestro laboratorio, de los cuales, 105 casos han dado un resultado negativo y 93 de ellos fueron positivos. Para cada caso se recogen los datos de fragilidad espontánea e inducida por DEB. Los índices calculados y que se utilizan para el análisis de los resultados son:

- Roturas por célula
- Porcentaje de células con roturas (células aberrantes)
- Porcentaje de células con 2 o más roturas (células multiaberrantes)
- Roturas/célula aberrante
- Roturas/célula multiaberrante.

En la Tabla 9 se recogen los valores obtenidos para cada uno de estos índices en el grupo de los pacientes de AF y no AF.

IV.1.1.1 Fragilidad cromosómica inducida por DEB. Discriminación entre individuos no AF, pacientes AF y pacientes AF mosaico.

Los pacientes de AF se caracterizan por una elevada sensibilidad a agentes inductores de ICLs como es el DEB, que en el análisis de fragilidad cromosómica, se traduce en un elevado número de roturas en las células. Los índices más utilizados para registrar esta fragilidad cromosómica son (1) el porcentaje de células con aberraciones y (2) el número de aberraciones por célula. En nuestro estudio, vemos que efectivamente, después del tratamiento, el índice de % de células aberrantes es más de 10 veces mayor en el grupo de pacientes AF que en los no AF (Figura 13a) y en el caso de las aberraciones/célula el incremento es de unas 60 veces (Figura 13b). No obstante, aunque la media es claramente distinta entre los dos grupos, los intervalos de datos llegan a solaparse, por lo que en algunos casos, el diagnóstico puede resultar dudoso o erróneo (Figura 13c y d). Un primer análisis de la variabilidad de los datos muestra que, mientras que para el grupo de los individuos no AF el rango de valores que se presenta

es bastante definido, dentro del grupo de los pacientes AF se observa una mayor heterogeneidad.

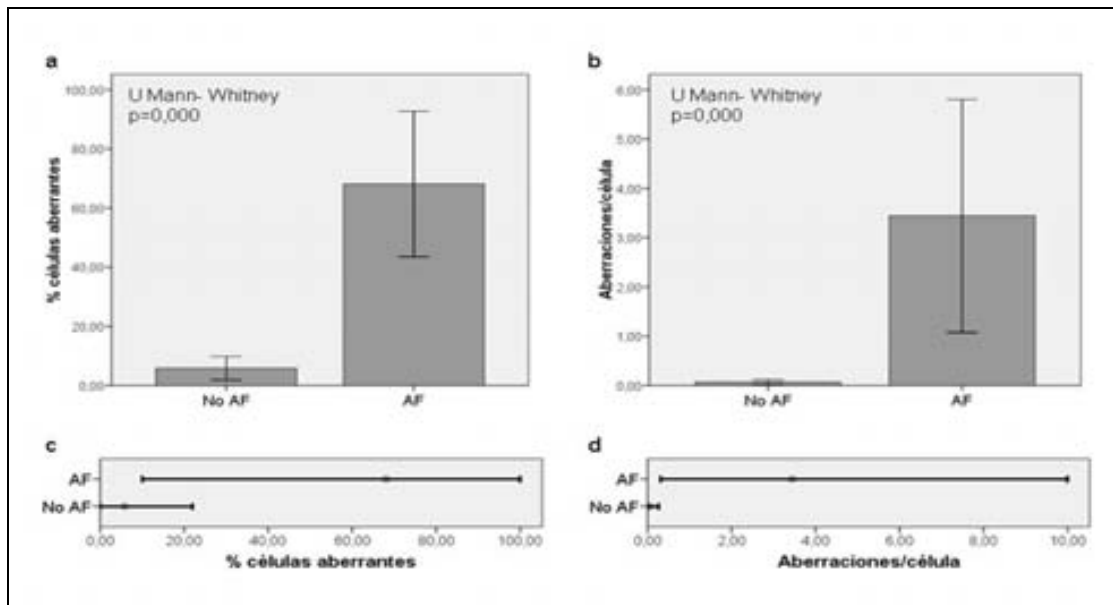


Figura 13. Valores obtenidos en el análisis de fragilidad cromosómica inducida por DEB en los grupos no AF y AF, según el % de células aberrantes (a) y (c) y aberraciones/célula (b) y (d). En (a) y (b) se representa la media y la desviación estándar (SD). En (c) y (d) se muestran los valores mínimos y máximos para cada grupo (rango) y el punto representa la media.

Parte del motivo de esta gran variabilidad es la existencia de dos subgrupos dentro de los pacientes AF, tal y como se aprecia en la distribución de la población en función del % de células aberrantes (Figura 14a) o del número de aberraciones/célula (Figura 14b). Se aprecia una segunda población que presenta un número menor de células con aberraciones, entre un 10 y un 50%, mientras que la mayoría de pacientes presentan entre un 60 y un 100% de células aberrantes. Las dos mismas poblaciones se distinguen en el índice de aberraciones por célula, una población que incluye a la mayoría de los pacientes con una media de casi 4 aberraciones/célula, y una segunda población con una media de aproximadamente 1 aberración/célula. Los valores de esta segunda población coinciden con los esperados para la población de pacientes AF mosaico, los cuales, presentan un porcentaje variable de células que han revertido el fenotipo y que, por tanto, no presentan aberraciones, hecho que hace disminuir también el número medio de aberraciones/célula. En la distribución de los pacientes AF en función del número de aberraciones/célula aberrante (Figura 14c) o aberraciones/célula multiaberrante (Figura 14d), tal y como se espera, estas dos poblaciones no se distinguen ya que las células no

revertidas de los pacientes AF mosaico presentan un número de aberraciones muy semejante al de los pacientes no mosaico.

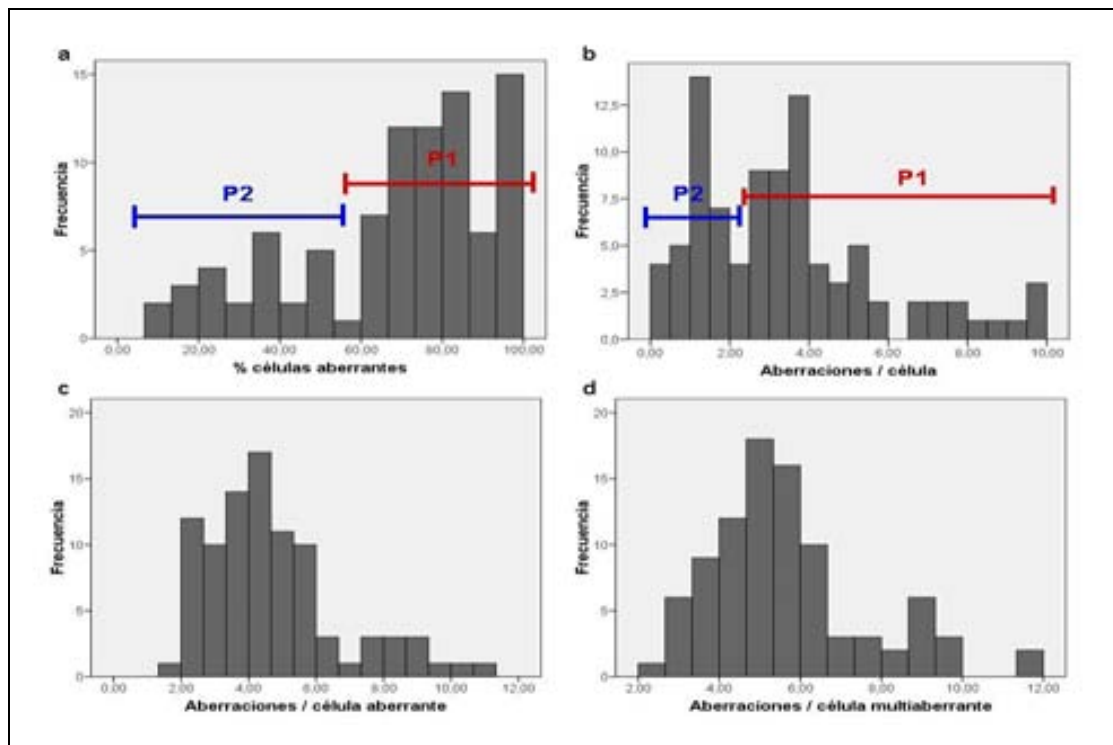


Figura 14. Distribución de los pacientes de AF en función del % de células aberrantes (a), aberraciones/célula (b), aberraciones/célula aberrante (c) y aberraciones/célula multiaberrante (d). P1 es la población de AF no mosaicos y P2 la población de AF mosaicos.

La discriminación entre individuos no AF y pacientes mosaico es el punto más crítico de este ensayo y requiere un análisis más extenso de los datos, teniendo en cuenta no sólo el porcentaje de células con aberraciones, si no también otros índices que reflejan la distribución del total de roturas contabilizadas en las células como son el número de aberraciones/célula aberrante y el número de aberraciones/célula multiaberrante. Los gráficos de la Figura 15 muestran como el índice de aberraciones/célula (Figura 15a) no permite esta distinción, ya que los individuos no AF y los AF mosaico se solapan. Esto no ocurre si se tiene en cuenta sólo aquellas células que presentan al menos una rotura (Figura 15b) y aún se obtiene una mejor distinción cuando se tiene en cuenta sólo aquellas células que presentan 2 o más roturas (Figura 15c).

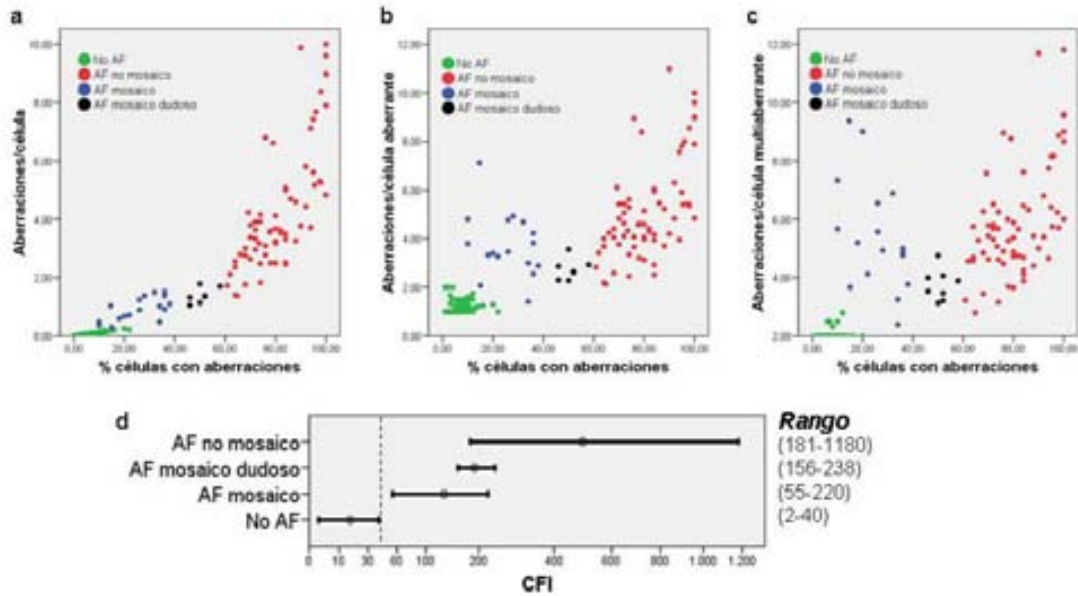


Figura 15. Distribución de los individuos analizados en función del porcentaje de células con aberraciones y los índices de aberraciones/célula (a), aberraciones/célula aberrante (b) y aberraciones/célula multiaberrante (c). Cálculo del índice CFI para cada uno de los grupos y establecimiento de valor umbral entre individuos no AF y pacientes de AF (d).

Así pues, aunque los índices % de células aberrantes y aberraciones/célula multiaberrante no permiten la diferenciación de individuos no AF y AF mosaicos por ellos mismos, sí permiten esta distinción cuando se expresan de forma conjunta. Este valor puede ser expresado gráficamente (Figura 15c) o numéricamente obteniendo un índice que resulta de la multiplicación de ambos, al que llamaremos índice CFI (del inglés, Chromosome Fragility Index), y que nos permite definir un valor umbral que puede ser usado como valor de referencia (Figura 15d).

$$[CFI = (\% \text{ células aberrantes}) * (\text{Aberraciones/célula multiaberrante})]$$

Según nuestra población, con casi 200 individuos analizados, tenemos que:

AF si $CFI > 54$

No AF si $CFI < 40$

Valores de CFI superiores a 54 indican que se trata de un paciente de AF, mientras que si el valor es inferior a 40, indica que el individuo no padece AF, estableciendo así un valor umbral que permite la distinción entre individuos no AF y pacientes de AF.

La distinción entre pacientes de AF no mosaico y mosaico depende esencialmente del porcentaje de células aberrantes. En los gráficos de la Figura 15 y Figura 14a se observa

la distribución de la población estudiada en función de esta variable. El establecimiento de valores umbral que permitan una distinción entre ambas poblaciones no resulta posible debido a la misma naturaleza progresiva del fenómeno del mosaicismo. Aún así, se observa que la mayoría de los pacientes presentan un valor de % células aberrantes próximo al 80%. Un segundo grupo con menor número de individuos, y que corresponde al grupo de pacientes mosaico, presentan valores próximos al 30% de células con aberraciones. Así pues, usando un criterio conservador, consideramos mosaico aquellos pacientes que presentan un porcentaje de células con roturas inferior al 40%. Aquellos pacientes con más de un 60% de células con roturas son considerados pacientes AF no mosaico, si no existe alguna razón que indique que puede tener una población de células revertidas en sangre, como sería una elevada viabilidad celular en respuesta a MMC o una evolución clínica favorable (mejora de la celularidad en sangre). Los pacientes de AF con un porcentaje de células con roturas intermedio, entre un 40 y un 60%, son considerados, a falta de más datos, pacientes de AF posible mosaico. Los valores de los distintos índices obtenidos en el análisis de fragilidad cromosómica para cada subgrupo de pacientes se detallan en la Tabla 9.

Ha sido comentado ya que en los índices aberraciones/célula aberrante y aberraciones/célula multiaberrante, el valor de la población de individuos mosaico se aproxima al de los pacientes no mosaico. Para comprobar si ambas poblaciones pueden ser consideradas una sola en el uso de estos índices, se comparan los distintos grupos mediante la prueba Post-hoc de Tamhane para grupos con varianzas no homogéneas.

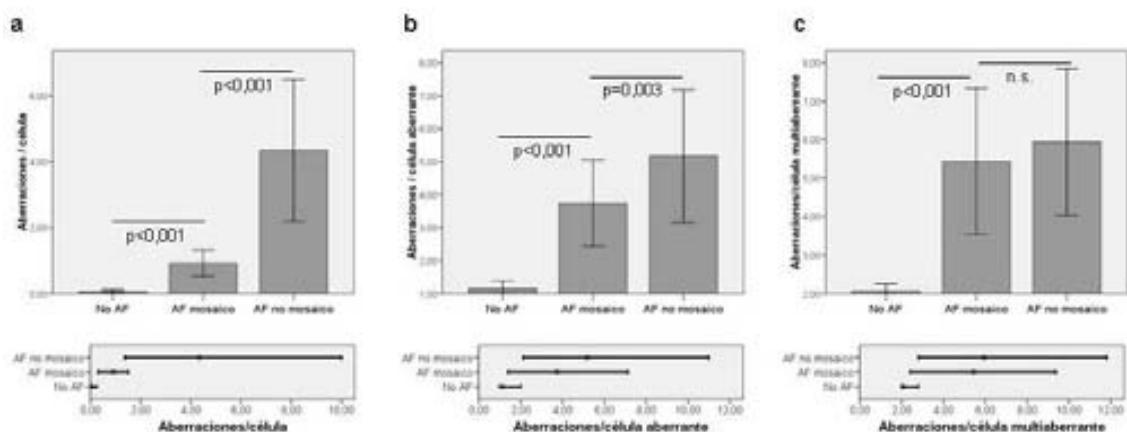


Figura 16. Comparación de aberraciones/célula (a), aberraciones/célula aberrante (b) y aberraciones/célula multiaberrante (c) entre los grupos No AF, AF mosaico y AF no mosaico. Se representan los gráficos de media y SD en la parte superior y los gráficos de rango de datos en la parte inferior. En estos últimos, el punto representa la media.

En la Figura 16a se observa que el valor medio de número de aberraciones/célula de la población AF mosaico y no mosaico es claramente distinto. En cuanto al índice de aberraciones/célula aberrante, aunque el valor de la población AF mosaico se aproxima más al de la población AF no mosaico, se observan diferencias estadísticamente significativas entre las dos poblaciones (Figura 16b). Esto no ocurre cuando se emplea el índice de aberraciones/célula multiaberrante (Figura 16c). Así pues, solo en el caso de aberraciones/célula multiaberrante, los individuos de los grupos de AF mosaico y no mosaico pueden ser considerados como una sola población.

La presencia de células multiaberrantes o figuras cromatídicas es muy característica de los pacientes de AF después del tratamiento con DEB, aunque vemos que no es exclusiva. Aunque el 60% de los individuos no AF estudiados no presenta ninguna célula multiaberrante, un 27% de los individuos presenta $\geq 2\%$ de células multiaberrantes, y un 2% de ellos presentan $\geq 5\%$ de células multiaberrantes, por lo que la presencia de alguna célula multiaberrante no es necesariamente indicativo de AF. La presencia de figuras, tampoco es exclusiva de los pacientes de AF: del total de 5250 metafases analizadas en estos 105 individuos (50 metafases por caso), se encontraron 3 células con una figura en cada una (para la cuál son necesarias 2 roturas cromatídicas), por lo que la frecuencia de figuras cromatídicas en la población no AF es del 0,057%, 1 por cada 1750 metafases analizadas.

Tabla 9. Resumen de estadísticos del ensayo de fragilidad cromosómica, espontánea e inducida, para los índices calculados en los grupos de individuos no Fanconi y Fanconi. Dentro de los individuos Fanconi, los dividimos en 3 categorías: Fanconi no mosaico, Fanconi posible mosaico y Fanconi mosaico.

Grupo	% células aberrantes			% células multiaberrantes			Aberraciones / célula			Aberraciones / célula aberrante			Aberraciones / célula multiaberrante		
	n	\bar{x}	Rango	n	\bar{x}	Rango	n	\bar{x}	Rango	n	\bar{x}	Rango	n	\bar{x}	Rango
<i>Fragilidad espontánea</i>															
No Fanconi	105	3,21	0 – 16	105	0,51	0 - 12	105	0,03	0 - 0,24	69	1,07	1,00 - 2,00	9	2	2,00 – 2,00
Fanconi	93	15,24	0 – 64	93	4,57	0 -56	93	0,21	0 – 1,6	83	1,32	1,00 – 2,50	51	2,26	2,00 – 4,00
Fanconi no mosaico	68	17,56	0 – 64	68	5,34	0 - 56	68	0,25	0 – 1,60	64	1,33	1,00 – 2,50	40	2,27	2,00 – 4,00
Fanconi posible mosaico	8	12,50	0 – 20	8	3,00	0 – 8	8	0,17	0 – 0,28	7	1,41	1,00 – 2,50	4	2,50	2,00 – 3,00
Fanconi mosaico	17	7,23	0 – 24	17	2,23	0 - 12	17	0,09	0 – 0,28	12	1,28	1,00 – 2,00	7	2	2,00 – 2,00
<i>Fragilidad inducida por DEB</i>															
No Fanconi	105	5,83	0 – 22	105	0,84	0 – 6	105	0,06	0 – 0,26	99	1,14	1,00 – 2,00	38	2,06	2,00 – 2,80
Fanconi	93	68,10	10 – 100	93	54,81	6 - 30	93	3,44	0,31 – 10,00	93	4,68	1,41 – 10,98	93	5,65	2,40 – 11,80
Fanconi no mosaico	66	81,15	60 – 100	66	67,71	36 - 100	66	4,34	1,38 – 10,00	66	5,17	2,13 – 10,98	66	5,94	2,80 – 11,80
Fanconi posible mosaico	8	50,75	46-58	8	32,00	28 - 38	8	1,38	1,06 – 1,78	8	2,73	2,28 – 3,56	8	3,76	3,16 – 4,76
Fanconi mosaico	17	25,62	10 – 38	17	15,44	6 - 30	17	0,92	0,31 – 1,52	17	3,74	1,41 – 7,12	17	5,43	2,40 – 9,37

IV.1.1.2 Fragilidad cromosómica espontánea

La fragilidad cromosómica espontánea es también una característica que ha sido asociada a las células AF. En el análisis de la fragilidad espontánea en nuestra población (Figura 17) vemos que, en conjunto, los pacientes de AF presentan una fragilidad espontánea más elevada que los no AF: 5,2 veces más en cuanto al porcentaje de células con aberraciones y 8,3 veces más en cuanto a las aberraciones/célula (los mosaicos presentan valores intermedios). Estos valores son estadísticamente significativos (prueba post-hoc de Tamhane) entre pacientes AF no mosaico y AF mosaico, y entre AF no mosaico y no AF, aunque no llegan a ser significativos cuando comparamos AF mosaico y no AF con una P de 0,082 y 0,063, respectivamente. Aun en los casos dónde hay una significación estadística, el intervalo de valores es bastante amplio y se solapa entre los tres grupos. En el caso de la fragilidad espontánea los índices “número de aberraciones por célula aberrante” y “número de aberraciones por célula multiaberrante” no aportan información ya que un gran número de individuos pertenecientes a los tres grupos no presenta ninguna célula con aberraciones y, en todo caso, el intervalo de valores que adquieren es muy reducido, de modo que no serán incluidos en el análisis.

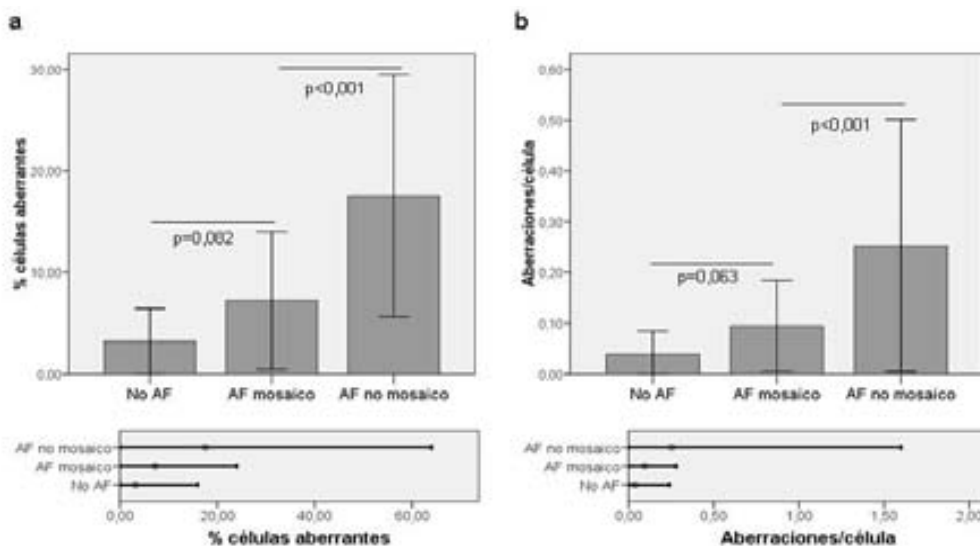


Figura 17. Fragilidad cromosómica espontánea observada en los grupos no AF, AF mosaico y AF no mosaico según el porcentaje de células aberrantes (a) y el número de aberraciones/célula (b). Los gráficos de barras representan la media y SD. Se muestra también la significación estadística de la diferencia entre los grupos. Los gráficos inferiores representan el rango de valores para cada uno de los grupos y el punto representa la media.

Del análisis anterior se desprende, pues, que aunque sí existe una mayor fragilidad cromosómica en el grupo de los pacientes de AF cuando se compara con el grupo de individuos no AF, el rango de valores entre los dos grupos es solapante, es decir, existen pacientes AF en los que la fragilidad cromosómica que se observa en sus células es equivalente a la que se puede observar en un individuo no AF. Este resultado indica claramente que la fragilidad cromosómica espontánea no puede ser usada como herramienta para el diagnóstico de la enfermedad.

Se analiza también cuantos de los pacientes de AF no presentan fragilidad cromosómica espontánea. Para ello, obtenemos un nuevo índice (SCFI, del inglés, Índice de fragilidad cromosómica espontánea) resultante de la multiplicación de los 2 índices más relevantes en la determinación de la fragilidad espontánea, el % de células con aberraciones y el número medio de aberraciones por célula. Se utiliza como límite el valor máximo observado en la población de individuos no AF, concretamente, 16% de células aberrantes y 0,24 aberraciones/célula, es decir, $SCFI=3,84$. En la Figura 18 se muestra el porcentaje acumulado de los pacientes de AF (se excluyen los mosaicos de este análisis) en función del índice SCFI.

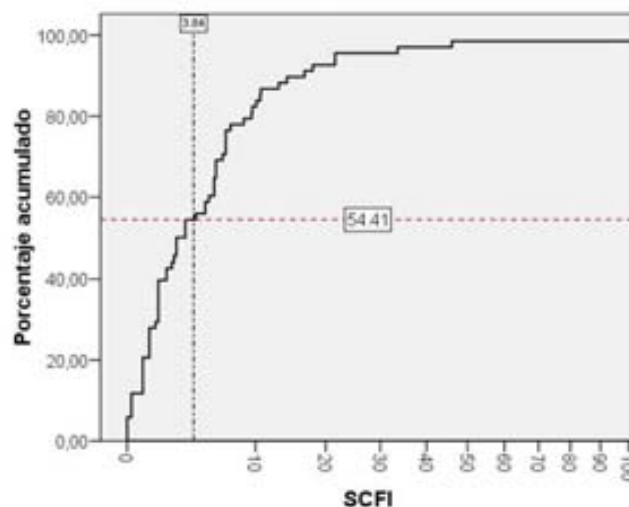


Figura 18. Porcentaje acumulado de pacientes de AF no mosaico según el índice SCFI. La línea de referencia en el eje de las X indica el valor máximo observado en la población de individuos no AF y la línea de referencia en el eje de las Y (en rojo) señala el porcentaje de pacientes de AF que se encuentran por debajo de este valor.

Se observa que un 54,41% de los pacientes de AF presenta un valor de fragilidad cromosómica espontánea (SCFI) inferior a 3,84, valor máximo observado en individuos

no AF. En conclusión, vemos que más de la mitad de los pacientes de AF no presenta fragilidad cromosómica espontánea.

IV.1.1.3 Correlación entre fragilidad cromosómica espontánea e inducida por DEB

Los agentes que causan la fragilidad cromosómica que se produce de forma espontánea en las células de los pacientes son hasta el momento desconocidos. Con el objetivo de analizar si una mayor sensibilidad al DEB implica también una mayor sensibilidad de forma espontánea se realizan correlaciones entre las dos variables en el grupo de pacientes Fanconi no mosaico (n=68). Para ello se utilizan los índices de porcentaje de células con aberraciones y aberraciones/célula. El índice de % de células con aberraciones se distribuye de forma normal (prueba de Komolgorov-Smirnov con significación $P=0,232$ y $P=0,579$ para espontánea e inducida, respectivamente), mientras que no es así en el caso del índice aberraciones/célula ($P=0,018$ y $P=0,024$). De acuerdo con la distribución de los datos, se aplica la prueba de Pearson para la detección de correlaciones positivas en el caso de % de células aberrantes, y la prueba Rho de Spearman en el caso del índice aberraciones/célula.

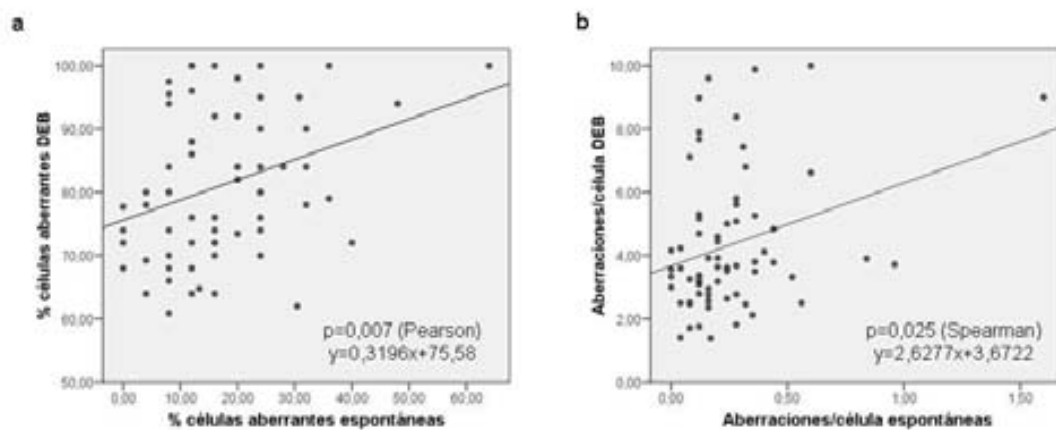


Figura 19. Correlación entre fragilidad cromosómica espontánea y fragilidad cromosómica inducida por DEB según porcentaje de células con aberraciones (a) y aberraciones/célula (b).

Tal y como muestra la Figura 19, se detecta una correlación positiva entre la fragilidad espontánea e inducida por DEB utilizando ambos índices ($P=0,007$ en el caso de % de

células aberrantes y $P=0,025$ en el caso de aberraciones/célula). Estos resultados indican que los mecanismos que confieren una mayor sensibilidad al DEB actúan también confiriendo una mayor sensibilidad a aquellos agentes que actúan dañando el ADN en las células de los pacientes de forma espontánea.

IV.1.2. Viabilidad celular a la MMC

Las células FA presentan también una elevada sensibilidad a la MMC, otro conocido agente inductor de ICLs. Según estudios previos realizados en el grupo del Dr. Bueren en el CIEMAT (Madrid) la dosis de 33nM de MMC es la que permite una mejor separación entre pacientes de AF y individuos no AF, ya que mientras las células de los individuos no AF siguen conservando su viabilidad, las células AF son incapaces de proliferar.

Los datos que aquí se presentan, proporcionados por el grupo del Dr. Bueren, corresponden a la viabilidad celular a 33nM de MMC de linfocitos T de sangre periférica respecto a la viabilidad del cultivo no tratado. En la Figura 20 se muestran los datos de viabilidad obtenidos para cada uno de los grupos: individuos no AF, AF mosaico y AF no mosaico establecidos según el ensayo de fragilidad cromosómica.

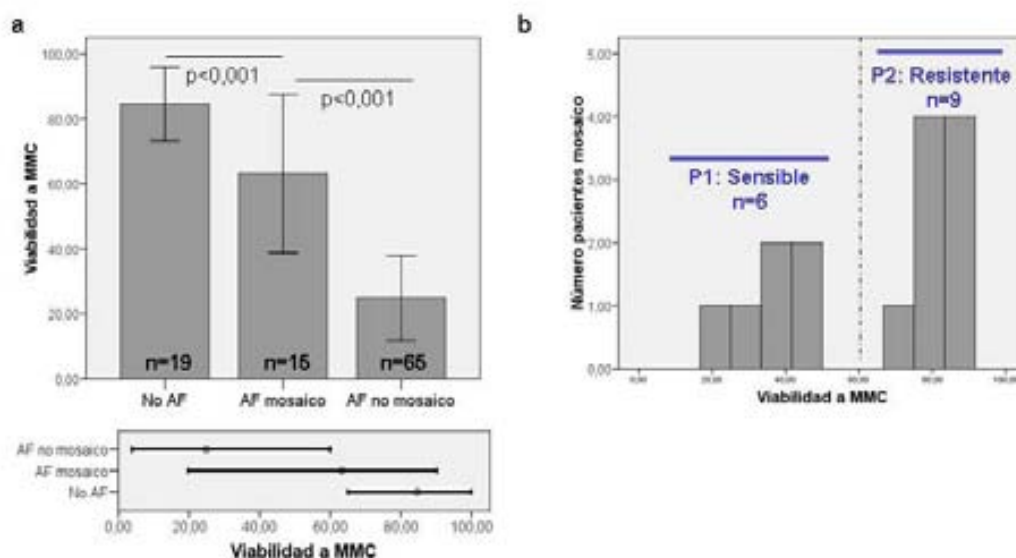


Figura 20. Viabilidad celular a 33nM de MMC en los grupos de individuos no AF, AF mosaico y AF no mosaico. (a) Se muestra la media y la SD. En el gráfico inferior se muestran los rangos de valores para cada grupo y el punto representa la media. (b) Distribución de los pacientes mosaico según su viabilidad a MMC. La línea vertical indica el umbral de separación entre individuos no AF de los AF no mosaicos. P1 y P2 significan Población 1 y Población 2, respectivamente.

En la Figura 20a se observa que los individuos no AF presentan de media un 85% de viabilidad, llegando a ser de un 65% en el individuo que presenta mayor sensibilidad. Los pacientes AF no mosaico presentan de media un 25% de supervivencia celular, llegando a ser como máximo, del 60%. Así pues, vemos que el 60% de viabilidad es el umbral que separa los individuos no AF de los AF no mosaicos. Los pacientes mosaico por otro lado, presentan un rango muy amplio de valores, desde un 20% de supervivencia a un 90%. En el histograma que representa la distribución de los pacientes mosaico según su viabilidad a MMC (Figura 20b) observamos que el amplio rango de valores se debe fundamentalmente a la existencia de dos poblaciones de pacientes que se comportan de modo distinto dentro del grupo de los mosaicos: una población (P1) con una viabilidad celular propia de los pacientes AF no mosaicos, es decir, sensibles a la MMC, y otra población (P2) que muestran resistencia a la MMC, con valores de viabilidad propios de la población no AF.

Estas diferencias de comportamiento celular en respuesta a la MMC pueden deberse al grado de colonización medular por parte de las células revertidas. Para comprobarlo, se analiza una posible correlación, dentro del grupo de pacientes mosaico, entre % de células aberrantes después del tratamiento con DEB y la viabilidad a MMC.

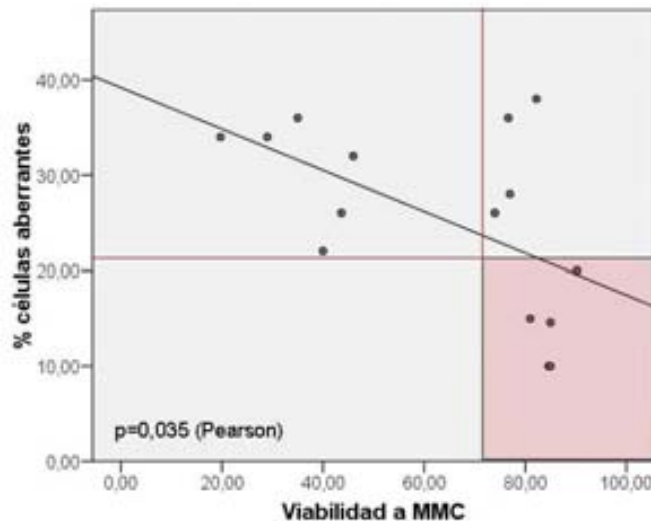


Figura 21. Correlación entre % de células con aberraciones después de tratamiento con DEB y viabilidad celular a 33nM de MMC en el grupo de los pacientes mosaico. La línea en diagonal representa el ajuste lineal de la regresión.

En la Figura 21 se observa que existe una correlación estadísticamente significativa (correlación de Pearson, $P=0,035$): cuantas más células revertidas hay en sangre (menor número de células con aberraciones), más viabilidad presentan los pacientes mosaico a MMC. Vemos también que existe un valor umbral alrededor del 20% de células con aberraciones, por debajo del cuál, los 5 pacientes que encontramos presentan resistencia a la MMC por encima del 80% de viabilidad. Los pacientes mosaico que presentan entre un 20% y un 40% de células con aberraciones pueden presentar sensibilidad o resistencia a la MMC.

La viabilidad a MMC puede ayudar en la categorización de los pacientes AF mosaicos o no mosaicos, solo en el caso que el paciente presente resistencia a la MMC. De los 8 pacientes AF mosaico dudosos, con un % de células con aberraciones entre un 40 y un 60, vemos (Figura 22) que todos son sensibles a la MMC, y por tanto, este dato no es útil en el esclarecimiento de la condición de los pacientes.

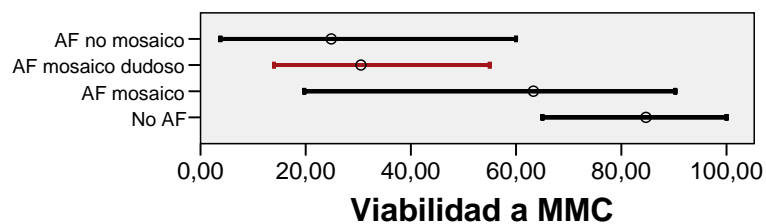


Figura 22. Viabilidad a la MMC de los pacientes AF mosaico dudoso (en rojo) en comparación con los obtenidos en los otros grupos.

IV.1.2.1 Correlación entre fragilidad cromosómica inducida por DEB y viabilidad a MMC

El potencial genotóxico de la MMC se debe fundamentalmente a su capacidad de formar ICLs en el ADN. No obstante, es conocido también que, en ambientes oxidativos, la MMC es un potente generador de ROS (Pritsos y Sartorelli 1986). La susceptibilidad de las células AF a la MMC puede deberse, entonces, a varios factores. Para poder determinar si el mecanismo de toxicidad de la MMC sobre las células AF es el mismo que el del DEB se analiza una posible correlación entre ambos, dentro del grupo de los pacientes AF no mosaicos. Como índice de sensibilidad celular al DEB,

usamos el índice CFI que tiene en cuenta tanto el porcentaje de células aberrantes como el número de aberraciones por célula multiaberrante.

En la Figura 23 se muestra la existencia de una correlación positiva entre ambas variables, con una significación estadística de $P=0,008$ según la correlación de Spearman. Vemos que, en general, aquellos pacientes que muestran una mayor sensibilidad al DEB, también muestran mayor sensibilidad a MMC, por lo que podemos deducir que DEB y MMC resultan tóxicos para las células AF mediante la generación del mismo tipo de daño.

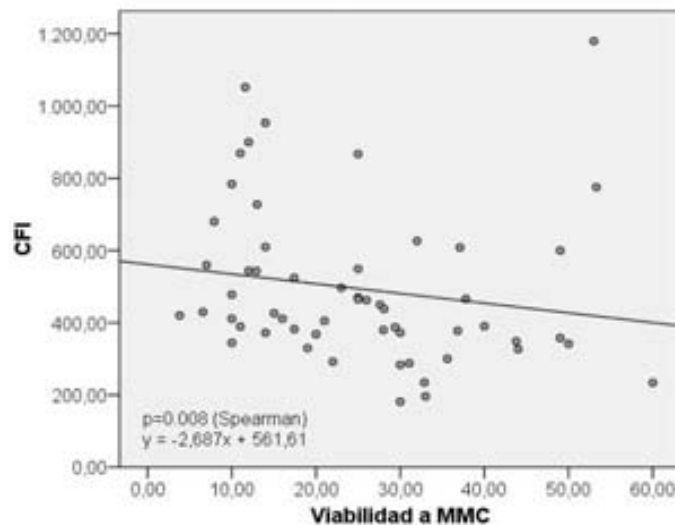


Figura 23. Correlación entre el índice de fragilidad cromosómica inducida por DEB (CFI) y la viabilidad a MMC en el grupo de los pacientes AF no mosaicos.

IV.2. CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE LA POBLACIÓN DE AF ESPAÑOLA

IV.2.1. Determinación del grupo de complementación y frecuencias

El subtipaje se realiza mayoritariamente mediante análisis de complementación con vectores retrovirales, aunque también se emplean otras técnicas como el análisis mutacional, análisis de expresión de la proteína o de la monoubiquitinación de FANCD2 por WB o formación de focos de RAD51 (como marcador de la funcionalidad

de FANCD1/BRCA2 y FANCN), sobretodo para aquellos pacientes que no pertenecen a los grupos de complementación más comunes. Así pues, el subtipaje de pacientes es un proceso largo en el que se requiere el uso de técnicas diversas y en el que la colaboración de distintos grupos resulta muy productiva. La mayor parte de este trabajo, consistente en el subtipaje mediante complementación retroviral ha sido realizada en el grupo del Dr. Bueren (CIEMAT, Madrid), mientras que los análisis por WB y análisis mutacional han sido realizados o coordinados por nuestro grupo. A continuación se presenta la estrategia que se ha seguido para la identificación del subtipo en cada uno de los pacientes y el número de pacientes subtipados en cada paso. Como veremos en el capítulo siguiente, los pacientes de etnia gitana se subtipan mediante análisis mutacional, ya que todos ellos pertenecen al grupo de complementación FA-A. Para las familias de etnia caucásica, la estrategia de subtipaje empleada es la que se describe en la Figura 24a.

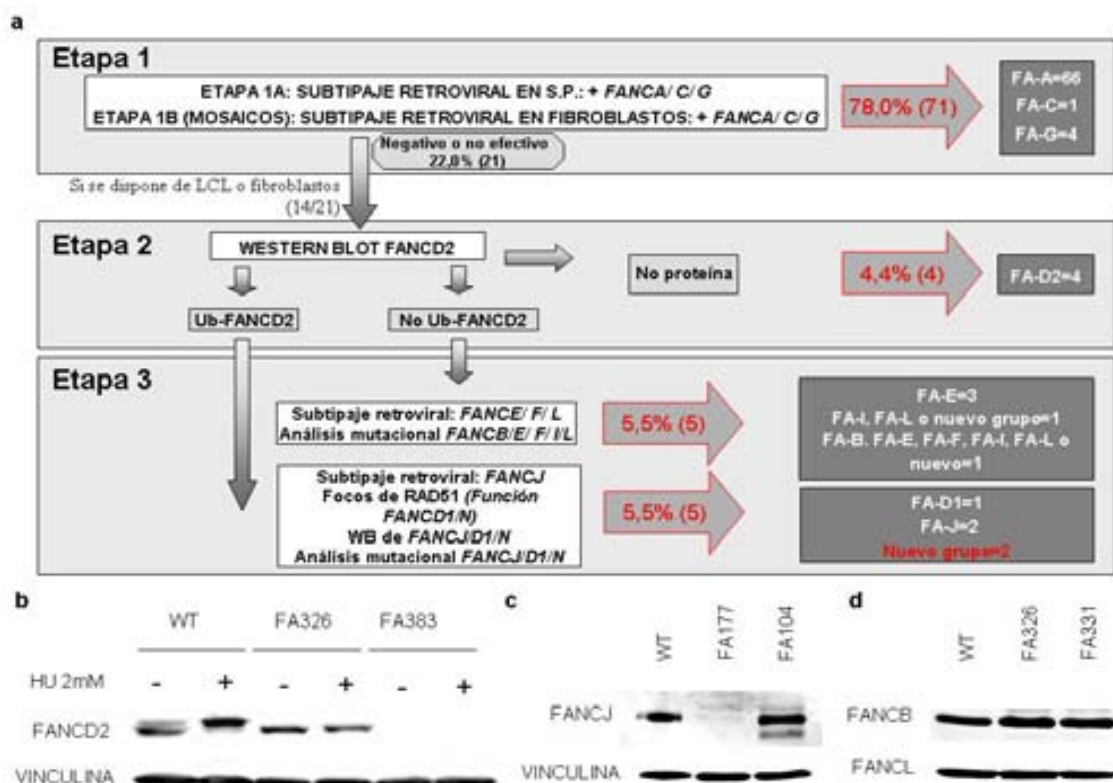


Figura 24. (a) Estrategia de subtipaje para los pacientes españoles de AF de etnia caucásica. Se muestra el porcentaje y el número de pacientes identificados en cada una de las etapas. S.P. es sangre periférica. (b) WB de FANCD2 con extractos de células no tratadas y tratadas con 2mM de HU 24h, de un control sano (WT), el paciente FA326 que no monoubiquitina FANCD2 y FA383 que es FANCD2^{-/-}. (c) WB de FANCI correspondiente a un control sano (WT), el paciente FA177 que es FANCI^{-/-} y el paciente FA104 que presenta banda de FANCI. (d) WB de FANCB y FANCL en los pacientes parcialmente caracterizados FA326 y FA331.

En la primera etapa, mediante la complementación con vectores retrovirales de *FANCA*, *FANCC* y *FANCG*, se subtipan el 78% de los pacientes caucásicos. Normalmente, este subtipaje se realiza en sangre periférica, pero en los casos de mosaicismo, se realiza en fibroblastos de piel. En el 22% restante el proceso de subtipaje es más complicado y depende, en parte, del material disponible de cada paciente. El proceso llevado a cabo se detalla a continuación: en aquellos casos en los que se dispone de línea celular, ya sea de linfocitos o de fibroblastos, se procede a realizar la etapa 2 que consiste en un WB para detectar la proteína FANCD2 y su activación (Figura 24b). En los casos en los que no se dispone de este material, se puede seguir el subtipaje mediante análisis mutacional, como es el caso del paciente FA124, junto con aquellos pacientes en los que no se ha podido realizar el subtipaje mediante complementación por motivos técnicos, FA112, FA121, FA157 y FA158. En el caso de los pacientes FA136 y FA357 no se dispone tampoco de ADN para proseguir con el subtipaje. De los 14 pacientes no-A/C/G de los que se dispone de línea celular para WB, en 4 familias (6 pacientes: FA70, FA71, FA78, FA342, FA344 y FA383) no se detecta la proteína, por lo han sido subtipados como FA-D2. De los 10 restantes, en 5 de ellos no se aprecia monoubiquitinación y en 5 de ellos sí. De los 5 en los que el gen mutado se encuentra por encima de de activación de FANCD2, 3 de ellos han sido subtipados como FA-E: FA121, FA202 y FA281 (por complementación retroviral y análisis mutacional) y en los 2 restantes el subtipo no ha podido ser concretado hasta el momento: en FA326 se han descartado los genes *FANCA*, *C*, *G*, *D2*, *E* y *F* por complementación retroviral. Como el paciente es mujer, descartamos también FA-B ya que este gen se encuentra en el cromosoma X. Así pues, las posibilidades se reducen a que pertenezca a los grupos de complementación FA-I, FA-L o un grupo nuevo por encima de la monoubiquitinación de D2. El paciente FA331 es un caso similar, aunque se han podido descartar solo los genes *FANCA*, *C* y *G* hasta el momento. En estos dos pacientes (FA326 y FA331) se realiza WB de FANCB y FANCL (Figura 24d), ya que se dispone de anticuerpos generados contra estas dos proteínas. Los WBs revelan que los dos pacientes presentan niveles normales de estas proteínas, indicando que ninguno de los dos presenta mutaciones bialélicas truncadoras en estos genes, aunque no se puede descartar que presenten mutaciones de cambio de sentido que permitan la expresión de una proteína no funcional. De los 5 pacientes en los que la monoubiquitinación de FANCD2 es normal, 2 familias (3 pacientes: FA69, FA72 y FA177) pertenecen al grupo de

complementación FA-J (identificado mediante complementación retroviral, WB y análisis mutacional) (Figura 24c), 1 paciente resultó ser portador de mutaciones bialélicas en *BRCA2/FANCD1* (FA62) y en los dos pacientes restantes (FA104 y FA287) se han descartado los 3 genes conocidos por debajo de la activación de FA-D2: *FANCI*, *FANCD1* y *FANCN* (mediante complementación retroviral de *FANCI*, análisis de focos de RAD51 y análisis mutacional de los tres genes) por lo que estos pacientes pertenecen a un grupo de complementación nuevo.

Así pues, en total se ha realizado el subtipaje de 111 pacientes de AF de 102 familias, 11 de etnia gitana y 91 caucásicas. Las frecuencias de los grupos de complementación en la población española han sido descritas en el capítulo 7 de la introducción, tal y como se presentaban en el año 2007. Se presenta en la Figura 25 una actualización de dichas frecuencias incluyendo todos los pacientes analizados hasta la fecha.

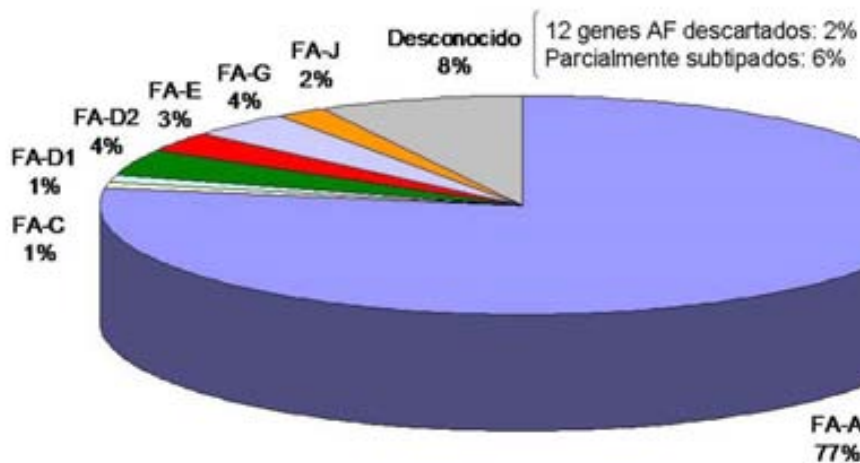


Figura 25. Frecuencias de los grupos de complementación en las familias de AF españolas.

Recientemente ha sido identificado el primer paciente español perteneciente al grupo de complementación FA-C, aunque es importante remarcar que el padre del paciente es de origen irlandés y solo la madre es española. Los grupos de complementación FA-G y FA-D2, con un 4% de las familias AF españolas cada uno, son los dos grupos más frecuentes después de FA-A. Les siguen FA-E (3%) y FA-J (2%). Solo se ha encontrado hasta el momento 1 paciente FA-D1 y 1 FA-C. Existe un 8% de los pacientes en los que el subtipo no ha podido ser aún determinado (aunque se han descartado varios grupos de complementación en todos ellos) y en dos de ellos se han descartado todos los genes conocidos, por lo que sabemos que existe, por lo menos, otro gen causante de AF que actúa por debajo de la monoubiquitinación de FANCD2/FANCI.

Las prevalencias de cada uno de los grupos de complementación se considera que son consecuencia directa de las frecuencias de portadores de mutaciones de los distintos genes en la población. Aún así, la frecuencia de portadores no ha sido determinada directamente, si no que se estima a partir del número de pacientes. De este modo, no es conocido si mutaciones en alguno o todos los genes FA van asociados a una mayor letalidad embrionaria. La elevada predisposición al cáncer de mama y ovario de los portadores de mutaciones en el gen *BRCA2*, hace que las frecuencias de portadores en la población para este gen se hayan estimado de un modo más directo. Se calcula que la frecuencia de portadores de mutaciones en el gen *BRCA2* en la población general es de 1/500 (Schwartz *et al.* 2008), por lo que la incidencia de pacientes FA-D1 debería ser de 1/1000000. De este modo esperaríamos que en España hubiera unos 40 casos y hasta el momento, solo se ha detectado uno. Estos datos reflejan pues, una letalidad embrionaria asociada a mutaciones bialélicas en el gen *BRCA2*. No podemos descartar, que el mismo efecto se produzca en otros genes FA.

IV.2.2. Análisis mutacional

Ha sido realizado el análisis mutacional de un total de 88 pacientes de AF españoles. Tal y como se muestra en la siguiente tabla resumen (Tabla 10), más del 90% de los pacientes incluidos habían sido previamente subtipados, mientras que de 9 de ellos se desconoce el grupo de complementación al que pertenecen o están sólo parcialmente subtipados.

Tabla 10. Resumen de los pacientes incluidos en el análisis mutacional según su grupo de complementación.

Grupo de complementación	Número de pacientes
FA-A	64
FA-C	1
FA-D1	1
FA-D2	5
FA-E	2
FA-G	3
FA-J	3
Desconocido	4
Parcialmente subtipado	5
<i>Total</i>	88

El análisis mutacional se realiza mediante análisis por DHPLC y secuenciación, a partir de ADN genómico, de la parte codificante del gen. Además de los exones, se incluyen también las regiones intrónicas más próximas al exón, para poder detectar las mutaciones que afectan el proceso de *splicing*. La detección de las grandes deleciones intragénicas se realiza mediante la técnica del MLPA. En el caso de los pacientes de grupo de complementación desconocido o parcialmente subtipados, se realiza un análisis de todos los genes de una forma secuencial, empezando por aquellos que son más frecuentes en la población. Hay que remarcar que el análisis mutacional para los genes *FANCI*, *FANCL* y *FANCB* no se ha podido realizar en el momento del estudio ya que no está disponible por motivos técnicos.

El análisis mutacional ha confirmado el subtipaje genético, que había sido realizado mediante complementación retroviral o WB, en el 100% de los casos, además de constituir una herramienta de subtipaje para el grupo de pacientes en los que se desconocía el grupo de complementación. En la Tabla 11 se presenta un resumen de estos nueve casos y su caracterización, total o parcial, mediante análisis mutacional.

Tabla 11. Resumen de los casos de subtipaje, total o parcial, mediante análisis mutacional.

Paciente	Subtipaje previo al análisis mutacional	Análisis mutacional	Subtipaje
FA104	No-A/C/G - D2 Ub*, No-D1	No mutaciones en <i>FANCI</i> , <i>FANCL</i>	Nuevo grupo
FA112	Desconocido	2 mutaciones en <i>FANCA</i>	FA-A
FA121	Desconocido	1 mutación en <i>FANCE</i>	FA-E
FA124	No-A/C/G	No mutaciones en <i>FANCA</i> , <i>FANCC</i> , <i>FANCE</i> , <i>FANCF</i> y <i>FANCG</i>	Posible FA-D1,-D2, -I, -L, -J, -N o nuevo (#)
FA157	Desconocido	2 mutaciones en <i>FANCA</i>	FA-A
FA158	Desconocido	No mutaciones en <i>FANCA</i> , <i>FANCC</i> , <i>FANCF</i> y <i>FANCG</i>	Posible FA-B,-D1,-D2, -E, -I, -L, -J, -N o nuevo
FA287	No-A/C/G – D2 Ub.	No mutaciones en <i>FANCD1</i> , <i>FANCI</i> , <i>FANCL</i>	Nuevo grupo
FA326	No-A/C/G/E/F/D2 - D2 no Ub.	-	Posible FA-I, -L o nuevo (#)
FA331	No-A/C/G/D2 - D2 no Ub.	-	Posible FA-B, -E, -F, -I, -L o nuevo

*Ub significa monoubiquitinado.

#En estos pacientes, FA-B se descarta por sexo femenino.

Así pues, como vemos en la Tabla 12, se han identificado mediante este análisis 159 alelos mutados de un total de 164. En cinco de los pacientes, 4 FA-A (FA49, FA50, FA166 y FA388) y 1 FA-E (FA121), sólo ha sido encontrada una de las dos mutaciones. Ya que en todos estos casos el paciente es mosaico o la LCL de la que obtenemos el ADN para la secuenciación ha revertido espontáneamente en cultivo, la imposibilidad de detectar la segunda mutación se debe muy probablemente a que una de las dos mutaciones ha revertido *in situ* o mediante conversión génica dando lugar a un alelo funcional.

Tabla 12. Resultado del análisis mutacional en nuestra población según el número de alelos mutados identificados para cada gen. Entre paréntesis se muestra el número de alelos totales que se esperaba identificar.

Gen	Número de pacientes	Número de alelos mutados identificados
<i>FANCA</i>	66	128 (132)
<i>FANCC</i>	1	2 (2)
<i>FANCD1</i>	1	2 (2)
<i>FANCD2</i>	5	10 (10)
<i>FANCE</i>	3	5 (6)
<i>FANCG</i>	3	6 (6)
<i>FANCI</i>	3	6 (6)
<i>FANCF</i>	3	6 (6)
<i>FANCG</i>	3	6 (6)
<i>FANCI</i>	3	6 (6)
<i>FANCF</i>	3	6 (6)
Total	82	159 (164)

IV.2.2.1 Espectro mutacional del gen *FANCA*

En el gen *FANCA* hemos detectado un total de 128 alelos mutados. Como ya había sido determinado en estudios previos realizados por nuestro grupo, los individuos españoles de etnia gitana comparten una misma mutación que no se encuentra en pacientes de etnia caucásica (Callen *et al.* 2005). Del total de 66 pacientes en los que se ha realizado el estudio mutacional, 13 de ellos pertenecen a la etnia gitana y 53 a la etnia caucásica. Debido a que, como veremos, estas dos etnias son completamente diferenciadas en cuanto a su espectro mutacional, el análisis de las dos poblaciones se hará de manera independiente. En la Figura 26 se muestra un esquema del gen *FANCA*, que consta de 43 exones y los correspondientes intrones, con todas las mutaciones encontradas distribuidas a lo largo del gen.

Entre los 128 alelos mutados se han identificado 50 mutaciones distintas, revelando una gran heterogeneidad de mutaciones en esta población. Una relación de todas las mutaciones distintas identificadas, así como el número de alelos encontrados de cada una de ellas se presenta en la Tabla 13. Se observa que el tipo de mutación más frecuente son las microdeleciones o microinserciones (42%), la mayoría de ellas dando lugar a desplazamientos del marco de lectura e interrumpiendo la traducción prematuramente, los cambios de base se encuentran en un 37% de los alelos mutados, las grandes deleciones en un 15% y finalmente, las mutaciones que afectan al *splicing* son las menos frecuentes, con un 6%.

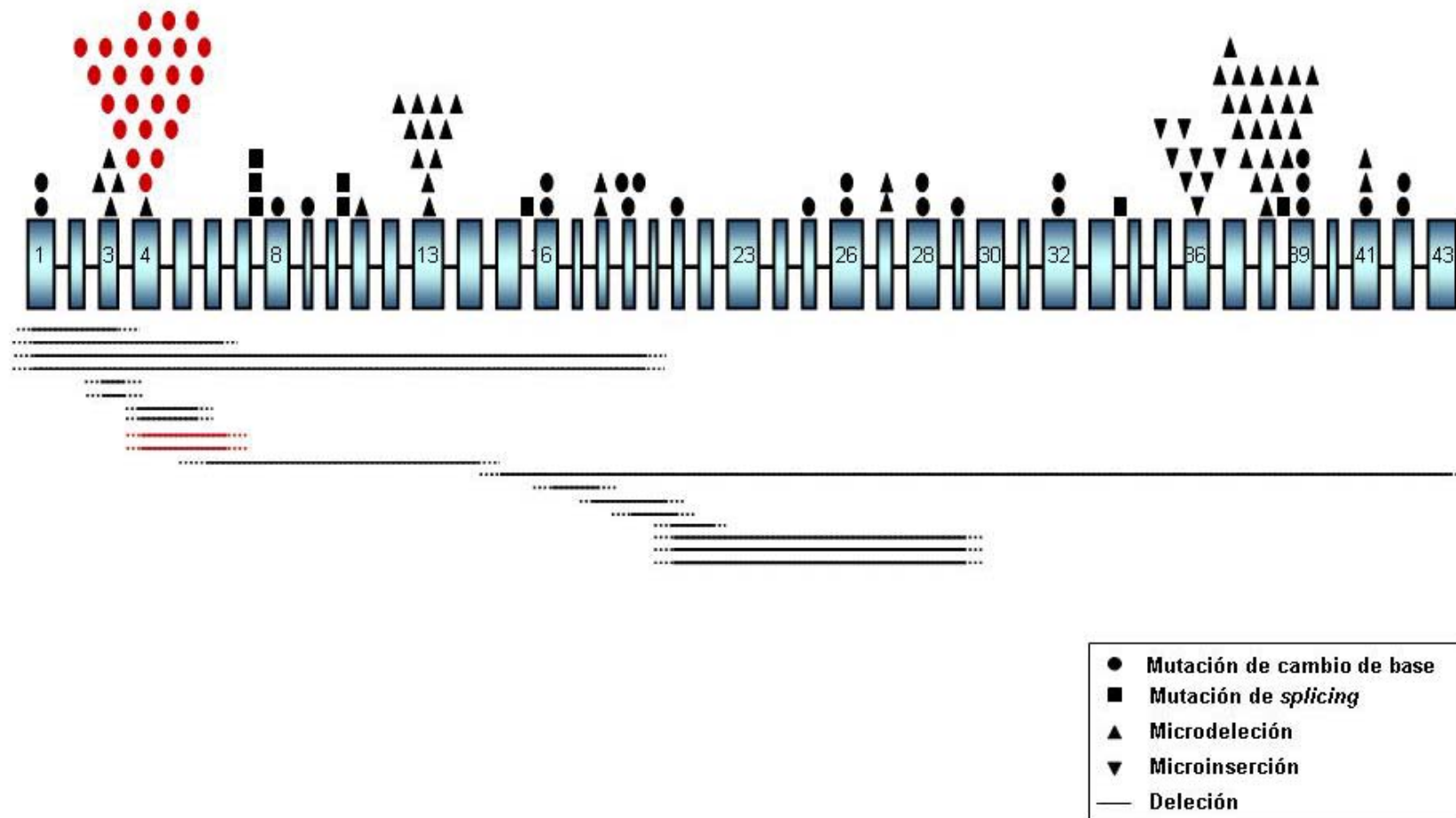


Figura 26. Esquema del gen *FANCA* y las mutaciones encontradas en pacientes de la población española. Los bloques representan los exones y las líneas que los unen los intrones. Las mutaciones marcadas en rojo corresponden a las encontradas en pacientes de etnia gitana y las marcadas en negro, las encontradas en pacientes de etnia caucásica. Los exones de los genes se muestran representados aproximadamente, a escala.

Tabla 13. Relación de las distintas mutaciones encontradas en el gen *FANCA* en la población española y número de alelos y pacientes en los que se ha detectado.

Cambio en ADN	Exon	Cambio en proteína	Referencia	No. de alelos	No. De pacientes
Mutaciones de cambio de base				48 (37,5%)	
c.65G>A	1	p.W22X	Registro de mutaciones FA†	2	2
c.295C>T	4	p.Q99X	(Callen <i>et al.</i> 2005)	24	12
c.718C>T	8	p.Q240X	N*	1	1
c.821C>T	9	p.L274P	N	1	1
c.1475A>G	16	p.H492R	(Levrán <i>et al.</i> 1997)	2	1
c.1771C>T	19	p.R591X	(Morgan <i>et al.</i> 1999)	3	2
c.1873G>C	21	p.C625S	N	1	1
c.2224C>A	25	p.Q742K	N	1	1
c.2303T>C	26	p.L768P	(Levrán <i>et al.</i> 2005)	2	1
c.2639G>A	28	p.R880Q	Registro de mutaciones FA	1	1
c.2641 C>T	28	p.Q881X	N	1	1
c.2851C>T	29	p.R951W	(Chandra <i>et al.</i> 2005)	1	1
c.3164G>T	32	p.R1055L	(Levrán <i>et al.</i> 1997)	1	1
c.3239G>A	32	p.R1080Q	(Chandra <i>et al.</i> 2005)	1	1
c.3913C>T	39	p.L1305F	N	3	3
c.4130C>G	41	p.S1377X	(Ameziane <i>et al.</i> 2008)	1	1
c.4198C>T	42	p.R1800C	Registro de mutaciones FA	2	2
Microinserciones/ Microdelecciones				53 (41,4%)	
c.233_236delTTGA	3	p.I78TfsX16	N	2	2
c.238delT	3	p.C80VfsX14	N	2	1
c.284delG	4	p.G95AfsX42	N	1	1
c.987_990delTCAC	11	p.H330AfsX4	(Levrán <i>et al.</i> 1997)	1	1
c.1115_1118delTTGG	13	p.V372AfsX42	(FA/Breast Cancer consortium 1996)	10	10
c.1147delG	13	p.E383RfsX32	N	1	1
c.1703delT	18	p.V568AfsX36	N	2	2
c.2535_2536delCT	27	p.C846QfsX19	(Levrán <i>et al.</i> 2005)	2	2
c.3558insG	36	p.R1187E fsX28	(Savino <i>et al.</i> 1997)	8	7
c.3788_3790delTCT	38	p.F1263del	(Levrán <i>et al.</i> 1997)	22	17
c.4123_4139del17	41	p.T1375WfsX43	N	1	1
c.4124_4125delCA	41	p.T1375SfsX48	N	1	1
Mutaciones de splicing				8 (6,2%)	
c.709+5 G>A	7	D237G+238ins10 (AFMTRCGFLD)	(Lo Ten Foe <i>et al.</i> 1996)	1	1
c.709+5G>T	7	D237G+238ins10 (AFMTRCGFLD)	(Singh <i>et al.</i> 2009)	1	1
c.710-5T>C	8	Splicing alterado	N	1	1
c.893+1G>T	10	Splicing alterado	(Savino <i>et al.</i> 1997)	1	1
c.893+920 C>A	10	Splicing alterado	N	1	1
c.1470+1G>T	15	Splicing alterado	N	1	1
c.3348+5 G>A y 3335 T>G	33	Splicing alterado	N	1	1
c.3828+1G>T	39	Splicing alterado	N	1	1
Delecciones				19 (14,8%)	
ex1-3del			Registro de mutaciones FA	1	1
ex1-6del			Registro de mutaciones FA	1	1
ex1-20del			N	2	2
ex3del			(Yagasaki <i>et al.</i> 2004)	2	1
ex4-5del			(Ameziane <i>et al.</i> 2008)	2	2
ex4-6del			Registro de mutaciones FA	2	1
ex6-14del			(Morgan <i>et al.</i> 1999)	1	1
ex15-43del			N	1	1
ex16-17del			(FA/Breast Cancer consortium 1996)	1	1
ex18-20del			Registro de mutaciones FA	1	1
ex19-21del			Registro de mutaciones FA	1	1
ex21-22del			N	1	1
ex21-29del			N	3	3

*N: mutación nueva o no descrita anteriormente.

†: Fanconi Anemia Mutation Database

De estas 50 mutaciones, 22 de ellas no habían sido descritas hasta el momento en ninguna otra población del mundo. La descripción de nuevas mutaciones es relevante por distintas razones: en primer lugar, desde un punto de vista del estudio de la función de las proteínas FA, la descripción de mutaciones de cambio de sentido o de delección de uno o varios aminoácidos ayuda a identificar aquellos residuos que son claves para la función de la proteína. Asimismo, la descripción de nuevas mutaciones es de por sí muy útil para todos los laboratorios de diagnóstico mutacional, ya que el hecho de que se haya descrito anteriormente en otros pacientes permite confirmar el carácter patogénico de las variaciones encontradas.

De las 22 mutaciones nuevas encontradas en nuestra población, 13 de ellas tienen un carácter claramente patogénico: 2 de ellas son cambios de base que resultan en una mutación sin sentido (c.718C>T, p.Q240X y c.2641 C>T, p.Q881X), 7 son microinserciones o microdelecciones que modifican el marco de lectura y incorporan codones de “Stop” prematuramente y 4 son grandes delecciones que comprenden varios exones. Las 9 mutaciones restantes corresponden a mutaciones que afectan al *splicing* del gen (5) o mutaciones de cambio de sentido (4) que no implican un efecto patogénico evidente. Las mutaciones de *splicing* son generalmente cambios de base que afectan las secuencias consenso de reconocimiento de los sitios donantes (5') o aceptores (3') en el proceso de corte y empalme de los exones. Estas secuencias son cortas y comprenden entre 5 y 16 nucleótidos en ambos extremos del intrón. En 4 de los 5 pacientes se han encontrado mutaciones no descritas que afectan estas secuencias, tal y como se muestra en la Figura 27.

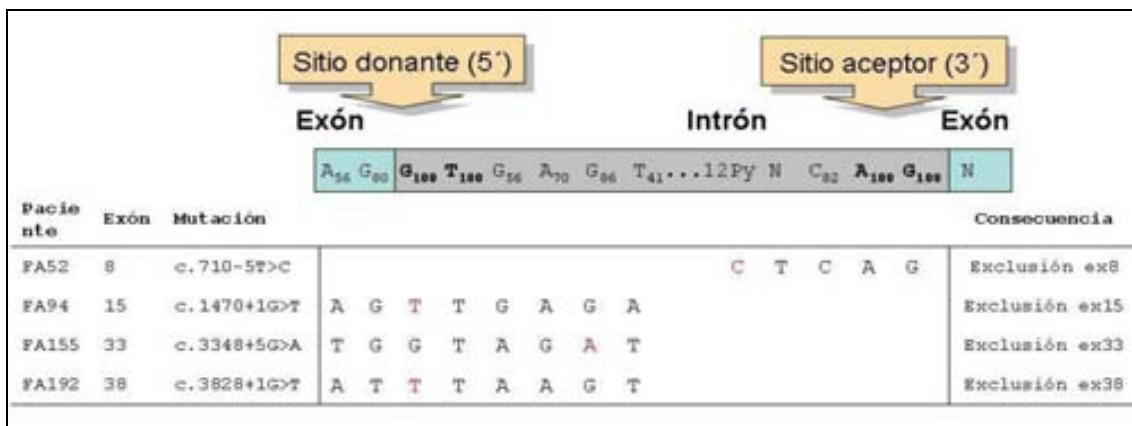


Figura 27. Secuencia consenso de los sitios de reconocimiento del *Spliceosoma*, donante y aceptor (Zhang 1998). Los números en subíndice indican el grado de conservación de cada posición en humanos. (Py) es pirimidina y (N) nucleótido. La tabla muestra la secuencia del sitio donante o aceptor del intrón dónde se localiza la mutación en cada paciente y la mutación se señala en rojo.

El paciente FA145 también presenta una mutación de *splicing* aunque en este caso no afecta a las secuencias consenso del extremo del intrón si no que se localiza en una posición más interna, a 920pb del límite de exón 10 (c.893+920C>A). Este cambio de base habilita un sitio donante nuevo [AGGT(C>A)AGC] incorporando un fragmento adicional en la secuencia del ARNm, en concreto, 2 exones nuevos. El carácter patogénico de estas mutaciones que afectan al proceso de *splicing* ha sido comprobado analizando el ARNm del gen *FANCA* de cada uno de estos 5 pacientes, a partir de una LCL o una línea de fibroblastos primaria derivada del paciente. La consecuencia de cada una de las mutaciones se indica en la Figura 27.

Las cuatro mutaciones nuevas encontradas de cambio de sentido son: (1) c.821C>T, p.L274P; (2) c.1873G>C, p.C625S; (3) c.2224C>A, p.Q742K y (4) c.3913C>T, p.L1305F. Para la predicción del efecto de cambios de aminoácido sobre la funcionalidad de la proteína se usan comúnmente 3 algoritmos distintos: Escala de Grantham (Grantham *et al.* 1974), SIFT (Ng y Henikoff 2003) (<http://sift.jcvi.org/>) y POLYPHEN (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph/>). La Escala de Grantham es un índice del grado de diferencia del cambio de aminoácido en cuanto a las propiedades físico-químicas (polaridad, volumen molecular y carga). SIFT utiliza como punto de partida el alineamiento de secuencias homologas de distintas especies para el gen a analizar y calcula la probabilidad que un cambio de aminoácido conlleve o no consecuencias sobre la función de la proteína a partir de los aminoácidos que se observan para la posición de la variante en las secuencias de las distintas especies. Finalmente, POLYPHEN además de utilizar el mismo principio que SIFT, integra la posible anotación de la secuencia como dominio funcional o estructural y la posible afectación de la conformación tridimensional de la proteína producido por la variante (si se dispone de esta información). En el caso del gen *FANCA*, este se encuentra conservado desde vertebrados inferiores y se dispone de las secuencias de las especies: *Macacca mulatta*, *Canis lupus*, *Rattus norvegicus*, *Mus musculus*, *Monodelphis domestica* y *Xenopus laevis*. No se dispone de la estructura tridimensional de la proteína *FANCA*, por lo que los posibles cambios en la conformación producidos por las variantes no podrán ser previstos. El resultado que se ha obtenido del análisis de las 4 variantes para el gen *FANCA* con los 3 algoritmos se muestra en la Tabla 14.

Tabla 14. Resultado de los análisis *in silico* del efecto de variaciones de cambio de sentido.

	L274P	C625S	Q742K	L1305F
Escala de Grantham				
0 - 50: Conservativo				
51-100: Moderadamente conservativo	Moderadamente conservativo	Moderadamente radical	Moderadamente conservativo	Conservativo (22)
101-150: Moderadamente radical	(98)	(112)	(53)	
151-200: Radical				
SIFT				
Probabilidad normalizada de que la variante sea tolerada. Límite= 0.1	No tolerada (0.00)	No tolerada (0.00)	No tolerada (0.09)	No tolerada (0.00)
POLYPHEN				
Categorías: Probablemente dañina, posiblemente dañina o benigna. (Valor PSIC: valores más grandes indican que la variante estudiada raramente se observa en esta posición)	Probablemente dañina (PSIC=2,243)	Probablemente dañina (PSIC=3,121)	Posiblemente dañina (PSIC=1,868)	Benigna (PSIC=1,435)

En el caso de tres primeras variantes (p.L274P, p.C625S y p.Q742K) los tres algoritmos utilizados concluyen que la variante comportará probablemente cambios en la funcionalidad de la proteína, debido a que los aminoácidos sustituidos tienen propiedades distintas respecto al aminoácido de la secuencia de referencia y que la posición en la que se encuentran está conservada en las especies estudiadas. En la predicción del efecto de la variante L1305F encontramos discrepancias según el algoritmo utilizado: el cambio de L a F es un cambio muy conservativo, aunque la posición 1305 también se encuentra conservada en las 6 secuencias comparadas. El hecho que la variante L1305F se haya encontrado en 3 pacientes distintos refuerza la predicción del carácter patogénico de esta mutación.

IV.2.2.1.1 Espectro mutacional de la etnia gitana

Como ya hemos visto, la población española de pacientes FA-A está formada por dos grupos claramente diferenciados a nivel de espectro mutacional: los pacientes de etnia gitana y los pacientes de etnia caucásica.

Como ya había sido publicado anteriormente por nuestro grupo, la determinación de las mutaciones en los pacientes de etnia gitana es un proceso bastante sencillo y rápido ya

que la gran mayoría de ellos comparten una misma mutación puntual en el exón 4. No obstante, recientemente ha sido identificado un paciente Español de esta etnia que presentaba una ausencia de amplificación del exón 4. Un análisis por MLPA del gen *FANCA* reveló que este paciente presenta una delección en homocigosis de los exones 4 a 6. Con el número de pacientes analizados hasta el momento, podemos decir que la mutación c.295C>T representa un 93,3% de las mutaciones en *FANCA* de los pacientes españoles de etnia gitana, mientras que la mutación ex4-6del representa el 7,7% restante. Aunque este es el único paciente encontrado hasta el momento que presenta una mutación distinta, pone de manifiesto que la no detección de la mutación c.295C>T en homocigosis en un paciente de esta etnia no implica que el paciente no padezca la enfermedad. Asimismo, debido a que la segunda mutación encontrada conlleva la delección del exón 4 dónde también se encuentra la mutación más frecuente en esta etnia, es importante remarcar que la secuenciación del exón 4 en el paciente, no permitiría la distinción entre un paciente homocigoto para la mutación más frecuente y un paciente heterocigoto compuesto, portador de la mutación puntual en un alelo y la delección en el otro. Esta posibilidad enfatiza la necesidad de la comprobación del carácter homocigoto/hemicigoto de los pacientes de etnia gitana, mediante la confirmación de la condición necesaria de portadores de la mutación de ambos progenitores o la aplicación de la técnica de MLPA también en los pacientes gitanos.

En estudios anteriores se había comprobado que la mutación c.295C>T aún siendo la única que se había encontrado hasta el momento en pacientes de etnia gitana en España, no se encontraba en pacientes gitanos de otros orígenes, como Irlanda, Rumania, Hungría o Alemania, indicando que la aparición de esta mutación fue posterior a la llegada de los gitanos a España, procedentes del este de Europa. Con el objetivo de comprobar si dicha mutación se ha extendido más allá de las fronteras españolas, se realiza la secuenciación del exón 4 en 5 pacientes de Portugal de etnia gitana y sus familiares. Este análisis revela que los cinco pacientes analizados presentan la mutación c.295C>T en homocigosis, por lo que podemos concluir que dicha mutación no es característica solo de los pacientes de etnia gitana de España, sino de la península Ibérica.

IV.2.2.1.2 Mutaciones más frecuentes y optimización del análisis mutacional para el gen FANCA en la población de etnia caucásica

Como hemos visto anteriormente, los pacientes FA-A de etnia caucásica presentan, como es de esperar para una etnia no consanguínea, un espectro mutacional mucho más variado. El análisis mutacional de todo el gen *FANCA*, que incluye la secuenciación de 43 exones y la realización del MLPA para la detección de grandes deleciones, es un proceso que tiene un coste importante en tiempo y dinero. Con el objetivo de poder optimizar este análisis en los pacientes de la población española analizamos cuales son las mutaciones más frecuentes y en que exones se localizan, considerando todas las grandes deleciones como un mismo tipo de mutación ya que se detectan en la misma reacción de MLPA. La Figura 28 muestra el gráfico del número de mutaciones encontradas en cada uno de los exones y también el número de grandes deleciones. Como vemos, encontramos un gran número de grandes deleciones y tres exones que acumulan la mayoría de mutaciones: los exones 13, 36 y 38.

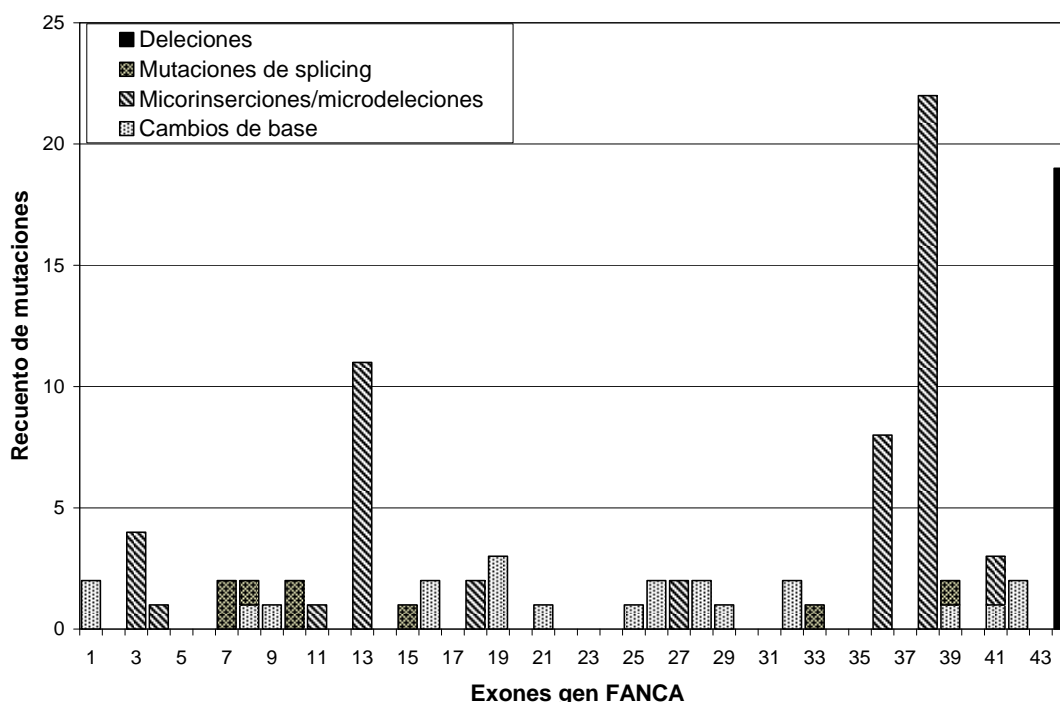


Figura 28. Número de mutaciones encontradas en los pacientes de etnia caucásica españoles en cada exón del gen FANCA y número de grandes deleciones.

En estos 3 exones se encuentran las mutaciones más frecuentes en nuestra población. Estas mutaciones son:

1. Exón 38: c.3788_3790delTCT. 22 alelos mutados (21,5% del total)
2. Exón 13: c.1115_1118delTTGG. 10 alelos mutados (9,8% del total)
3. Exón 36: c. 3558insG. 8 alelos mutados (7,8% del total)

Estas tres mutaciones no son características únicamente de la población española si no que ya se habían descrito anteriormente en otras poblaciones.

A partir de los resultados obtenidos en este análisis, se procede a la elaboración de una estrategia que permitirá identificar las mutaciones de los pacientes de nuestra población de un modo más rápido y eficiente (Figura 29). En una primera ronda de análisis, se realiza un MLPA para la detección de las grandes deleciones y las secuenciaciones de 3 de los exones (dónde se encuentran las 3 mutaciones más frecuentes): 13, 36 y 38, permitiéndolo identificar hasta un 57,8% de las mutaciones. En una segunda ronda, se realiza las secuenciaciones de 15 exones más (aquellos en los que se ha encontrado 2 o más mutaciones), los exones 1, 3, 7, 8, 10, 16, 18, 19, 26, 27, 28, 32, 39, 41 y 42, que engloban un 33,3% de las mutaciones. Después de esta segunda ronda, se habrían identificado el 91,1% de las mutaciones. La identificación del 9% de mutaciones restantes, implica la secuenciación de todos aquellos exones dónde se ha encontrado una sola mutación, los exones 4, 9, 11, 15, 21, 25, 29 y 33. Finalmente, en una cuarta ronda, se amplificarían aquellos exones dónde, hasta el momento, no se ha identificado ninguna mutación, un total de 17 exones: 2, 5, 6, 9, 14, 17, 20, 22, 23, 24, 30, 31, 34, 35, 37, 40 y 43.

Se quiere comprobar si la estrategia propuesta de identificación de mutaciones en *FANCA* es aplicable, en general, a las demás poblaciones del mundo. Para ello, se usa la información disponible en la Fanconi Anemia Mutation Database, que cuenta con 1152 alelos mutados en el gen *FANCA*, en pacientes de todo el mundo. Se aplica el mismo algoritmo para determinar cuantos de estos alelos mutados se identificarían en cada ronda. Se obtiene que las deleciones intragénicas y las mutaciones en los exones 13, 36 y 38 son también en el resto de poblaciones, las mutaciones más frecuentes, de modo que se identificarían alrededor de un 50% de las mutaciones. En la segunda ronda, se identificaría un 23% de las mutaciones, frente al 33% identificado en la población española, ya que se observa que algunos de los exones incluidos en la 3ª y 4ª ronda, presentan más frecuencia de mutaciones que algunos exones de la 2ª ronda. Así pues, podemos concluir que la 1ª ronda de detección de mutaciones en *FANCA* (incorporando MLPA + secuenciación de los exones 13, 36 y 38) es válida para identificar las

mutaciones más frecuentes en la mayoría de poblaciones. Para una mayor optimización, los exones incorporados en las posteriores rondas de secuenciación deben ser determinados a partir del espectro mutacional de cada población.

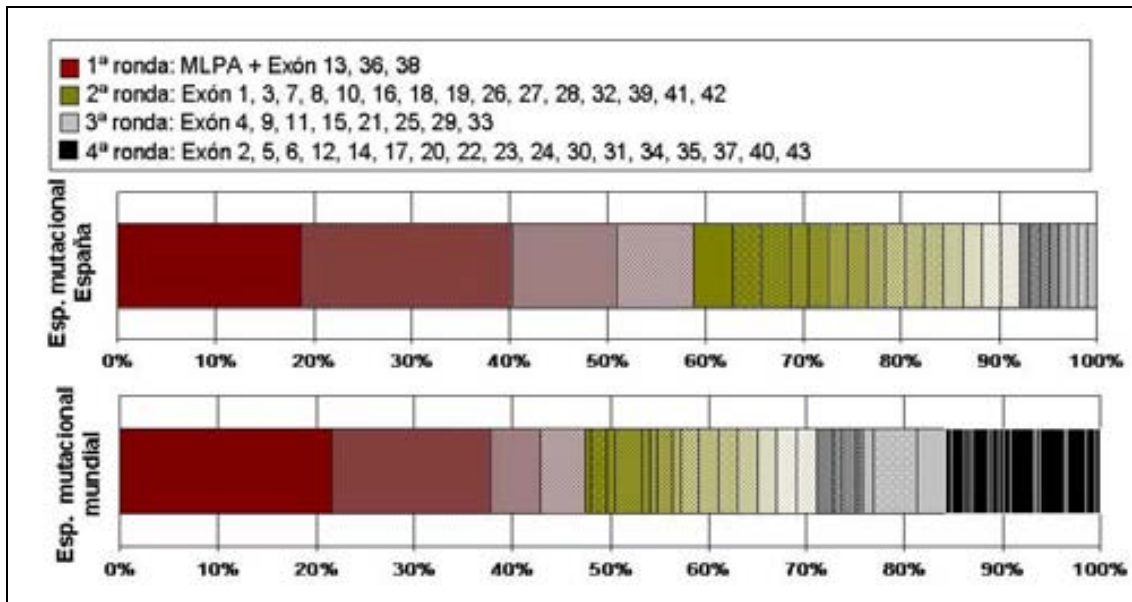


Figura 29. Propuesta de identificación de las mutaciones de los pacientes españoles en el gen *FANCA* mediante una estrategia en 4 rondas de secuenciación. El gráfico superior muestra el porcentaje de mutaciones identificadas en cada ronda en la población española, mientras que el gráfico inferior muestra el porcentaje de mutaciones identificadas en cada ronda, aplicando la misma estrategia a la población mundial (datos de Fanconi Anemia Mutation Database).

IV.2.2.2 Mutaciones en otros genes FA

La mayoría de pacientes españoles pertenecen al grupo de complementación FA-A, pero también se han identificado las mutaciones patogénicas en pacientes españoles que pertenecen a otros grupos de complementación: 1 FA-C, 1 FA-D1, 5 FA-D2, 3 FA-E, 3 FA-G y 3 FA-J. En la Figura 30 se muestra un esquema de los genes y la posición de las mutaciones identificadas.

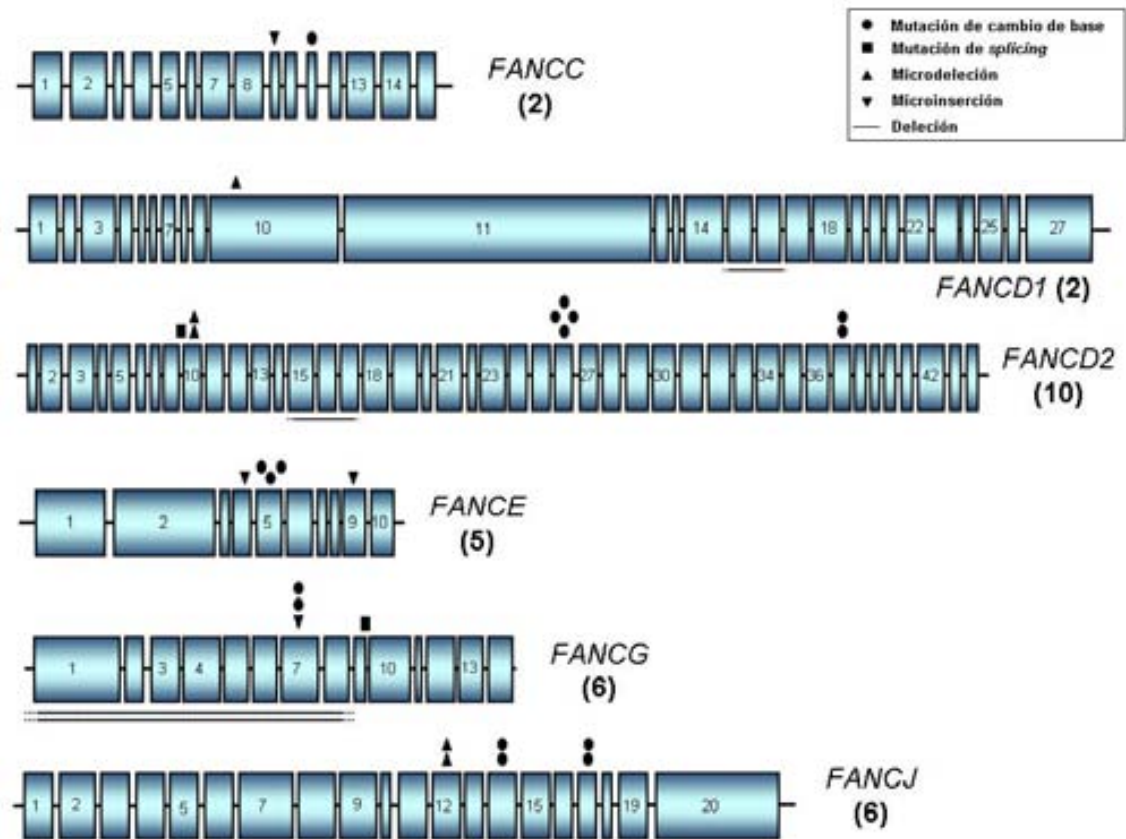


Figura 30. Esquema de los genes *FANCC*, *D1*, *D2*, *E*, *G* y *I* y las mutaciones encontradas en los pacientes españoles. Los exones de los genes se muestran representados aproximadamente, a escala. Entre paréntesis se indica el número de mutaciones identificadas en cada gen.

Aunque el número de mutaciones encontradas en cada gen es reducido, se observa que existe, igual que en *FANCA*, una gran variabilidad en cuanto al espectro mutacional. Se han identificado 2 mutaciones distintas en *FANCC*, 2 en *FANCD1*, 5 en *FANCD2*, 3 en *FANCE*, 4 en *FANCG* y 3 en *FANCI* (Tabla 15).

Se han encontrado 10 mutaciones no descritas anteriormente, repartidas en todos los genes analizados, todas ellas claramente patogénicas excepto la mutación en *FANCC* c.1103T>C que conlleva un cambio de aminoácido L386P. Los mismos algoritmos aplicados anteriormente para la predicción de efecto de cambio de aminoácidos sobre la proteína indican que el cambio analizado es probablemente patogénico: (1) Escala de Grantham: Valor=98 (Moderadamente conservativo), (2) POLYPHEN: PSIC=2,11 (Probablemente dañino) y (3) SIFT: P=0,00 (Variante no tolerada). Aunque el cambio de aminoácido es moderadamente conservativo, esta posición se encuentra conservada en todas las secuencias de *FANCC* analizadas.

En el gen *FANCG* se ha encontrado en uno de los pacientes, una delección de los 8 primeros exones en homocigosis. Hasta el momento, no se había descrito ninguna delección intragénica en el este gen (Auerbach *et al.* 2003; Levitus *et al.* 2005) entre las 49 mutaciones distintas encontradas (Fanconi Anemia Mutation Database).

Tabla 15. Relación de las distintas mutaciones encontradas en pacientes españoles, en los genes *FANCC*, *D1*, *D2*, *E*, *G*, y *J*.

Cambio en ADN	Exon	Cambio en proteína	Referencia	No. de alelos	No. De pacientes
<i>FANCC</i>					
c.918insT	9	p.G307WfsX67	N	1	1
c.1103T>C	11	p.L368P	N	1	1
<i>FANCD1</i>					
c.1597delA	10	p.T533LfsX24	N	1	1
ex15-16del			N	1	1
<i>FANCD2</i>					
c. 696-2A>T	10	Splicing alterado	(Kalb <i>et al.</i> 2007)	1	1
c.718delT	10	p.S240HfsX21	N	2	2
c.1321delAG	16	p.1135del411 (Del. Ex15-17)	(Kalb <i>et al.</i> 2007)	1	1
c. 2444G>A	26	p.R815Q	(Kalb <i>et al.</i> 2007)	4	2
c.3707G>A	37	p.R1236H	(Timmers <i>et al.</i> 2001)	2	2
<i>FANCE</i>					
c.929insC	4	p.V311SfsX1	N	1	1
c.1111C>T	5	p.R371W	(Ameziane <i>et al.</i> 2008)	3	2
c.1418insG	9	p.M473NfsX6	N	1	1
<i>FANCG</i>					
ex1-8del			N	2	1
c.908T>C	7	p.L303	(Auerbach <i>et al.</i> 2003)	2	1
c.911insCT	7	p.E304WfsX3	N	1	1
c.1077-2A>G	9	Splicing alterado	(Demuth <i>et al.</i> 2000)	1	1
<i>FANCI</i>					
c. 1702_1703delAA	12	p.N568WfsX8	N	2	2
c. 1941G>T	14	p.W647C	(Levitus <i>et al.</i> 2005)	2	2
c. 2392C>T	17	p.R798X	(Levitus <i>et al.</i> 2005)	2	1

*N: mutación nueva o no descrita anteriormente.

IV.2.2.3 Caracterización molecular de mutaciones

IV.2.2.3.1 La mutación más frecuente: 3788_3790delTCT. Distribución en España y en otros países del mundo

Hemos visto que la mutación c.3788_3790delTCT se encuentra en un 21,5% de los alelos mutados de los pacientes de etnia caucásica FA-A de España y representa la mutación más frecuente.

De los 22 alelos detectados que presentan esta mutación, 5 de ellos corresponden a pacientes nacidos en Barcelona, 4 a pacientes nacidos en Madrid y 8 a pacientes nacidos en la isla de La Palma (Islas Canarias). Los cinco alelos restantes corresponden a pacientes de distinto lugar de nacimiento: Extremadura, Sevilla, Córdoba, Vigo y Pontevedra. De los 3 sitios dónde se concentran los pacientes portadores de esta mutación, Barcelona y Madrid son también ciudades dónde residen un gran número de los pacientes de AF; por lo que expresando la frecuencia de esta mutación en función del número total de alelos mutados por cada una de estas ciudades se obtiene que la mutación c.3788_3790delTCT representa un 16,6% y un 33,3% de las mutaciones de pacientes nacidos en Barcelona y Madrid, respectivamente, valor que no se aleja mucho de la frecuencia de la población española en general (21,5%). En cambio, en la isla de La Palma representa el 80% de las mutaciones encontradas.

En la isla de la Palma residen aproximadamente 80.000 personas y se han diagnosticado hasta el momento 5 casos de AF, lo que representa una incidencia de 1 por cada 16000 habitantes, 100 veces mayor que la incidencia en la población mundial, que se calcula de 1-5 por 1000000. Los cinco pacientes originarios de la isla de La Palma pertenecen todos al grupo de complementación FA-A y el estudio mutacional ha revelado que de los 10 alelos con mutaciones en *FANCA* de estos pacientes, 8 de ellos (80%) corresponden a la misma mutación, c.3788_3790delTCT, de modo que nos encontramos ante un efecto fundacional en esta isla que explica la elevada incidencia de AF que presenta esta población.

La mutación c.3788_3790delTCT no es exclusiva de la población española si no que ha sido descrita en varias poblaciones de todo el mundo. Destaca la población de Brasil, en el que dicha mutación representa hasta un 50% de las mutaciones encontradas en el gen *FANCA* (Magdalena *et al.* 2005). Con el propósito de identificar si la elevada frecuencia de esta mutación en las poblaciones española, brasileña y otras poblaciones de todo el mundo, se debe a que el sitio de la mutación constituye un *hot-spot* mutacional o si un mismo alelo ancestral ha sido dispersado y fijado en distintas poblaciones, se analiza el haplotipo asociado a esta mutación en pacientes de todo el mundo, empezando por los 5 pacientes de La Palma. Para la determinación del haplotipo, mediante la técnica del DHPLC se analizan 10 SNPs de alta frecuencia de heterocigosis en la población general, que se encuentran repartidos a lo largo del gen *FANCA*, unas 80Kb, y con las características que se detallan en la Tabla 16. De los cinco pacientes de La Palma, 3 de

ellos son homocigotos para la mutación y 2 de ellos son heterocigotos compuestos. Para determinar el haplotipo asociado al alelo portador de la mutación en los pacientes heterocigotos para la mutación, se analiza también a familiares de primero y segundo grado (hermanos no afectados, padres y abuelos).

Tabla 16. SNPs analizados dentro del gen *FANCA* para la determinación del haplotipo. Se especifica la posición dentro del gen y la frecuencia de heterocigosis de cada uno de ellos.

SNP	Exón	Posición	Frecuencia heterocigosis*
rs1800285	6	c.596+74G/A	0,370
rs1800286	8	c.710-12G/A	0,253
rs7190823	9	c.796G/A	0,368
rs2239359	16	c.1501G/A	0,333
rs1800335	18	c.1715+82T/C	0,389
rs1800340	23	c.2151+8T/C	0,433
rs7195066	26	c.2426G/A	0,364
rs1800345	33	c.3240-42 G/A	0,477
rs1061646	40	c.3935-16T/C	0,488
rs1800359	42	c.4260+29T/C	0,241

*La frecuencia de individuos heterocigotos en una población global (Población PDR90).

El análisis del haplotipo revela que los 5 pacientes de La Palma comparten el mismo haplotipo asociado a la mutación, detallado en la Figura 31, confirmando que se trata de un mismo alelo ancestral. El mismo análisis se realiza en 8 pacientes de Brasil, homocigotos para la mutación c.3788_3790delTCT, obteniendo que en todos los casos la mutación se encuentra asociada al mismo haplotipo encontrado en los pacientes de La Palma. Así pues, estos resultados indican que los pacientes españoles y brasileños portadores de la mutación en el exón 38 comparten muy probablemente el mismo alelo ancestral, hecho que resulta muy plausible debido a que ambas poblaciones se encuentran estrechamente relacionadas a causa de los flujos migratorios desde Europa hacia América del Sur. Finalmente, se realiza análisis del haplotipo en pacientes portadores de esta misma mutación de poblaciones más alejadas: 2 de los EUA con ancestros europeos (homocigotos para la mutación), 2 de México (1 homocigoto, 1 heterocigoto), 1 de Argentina (homocigoto), 1 de Perú (homocigoto), 2 de las Islas Británicas (1 homocigoto, 1 heterocigoto), 3 de Portugal (homocigotos), 1 de Alemania (homocigoto), 1 de Pakistán (homocigoto) y 1 de Nigeria (heterocigoto). Tal y como se observa en la Figura 31, en todos los pacientes se ha identificado el mismo haplotipo excepto en el paciente originario de Nigeria en el que la mutación se encuentra asociada

a un haplotipo totalmente distinto y indicando en este caso, un origen independiente de la misma mutación.

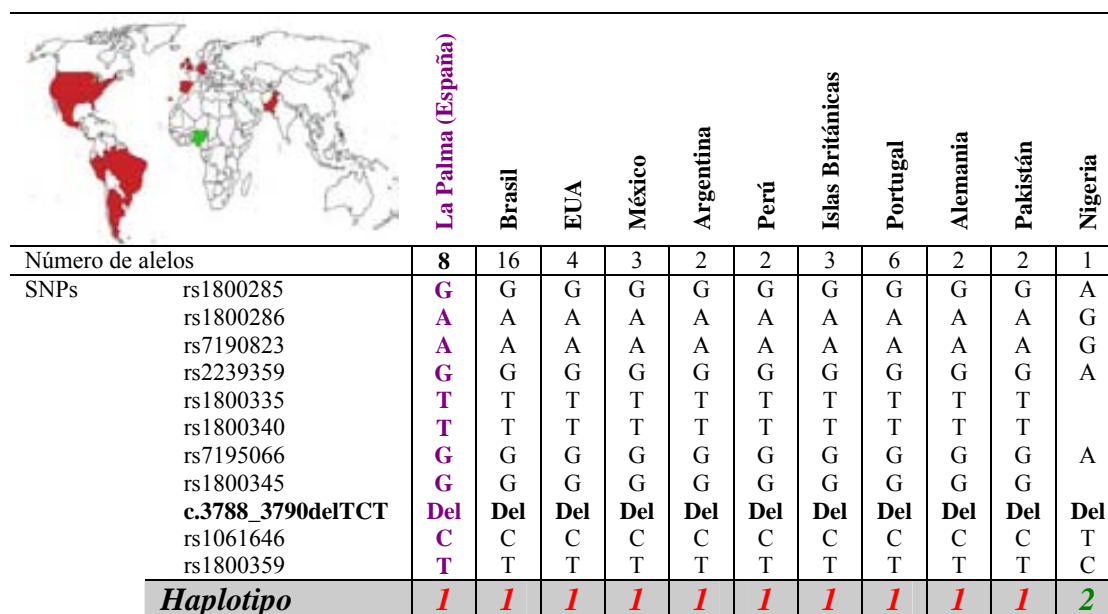


Figura 31. Análisis del haplotipo asociado a la mutación c.3788_3790delTCT en pacientes de distintas poblaciones del mundo. En el mapa se marcan en color los países de los cuáles son originarios los pacientes estudiados. Al haplotipo detectado en los pacientes españoles nos referimos como Haplotipo 1 (rojo en el mapa) y el haplotipo alternativo, Haplotipo 2 (verde en el mapa).

La información disponible en el portal del proyecto HapMap (www.hapmap.org), permite conocer de la frecuencia de los haplotipos encontrados en nuestros pacientes en la población general, concretamente, las frecuencias de los Haplotipos 1 y 2 en la población CEU (180 individuos residentes en Utah de origen europeo) y YRI (180 individuos Yoruba, Nigeria). De los 10 SNPs de los que consta el haplotipo estudiado, en el HapMap encontramos información de 5 de ellos: rs7190823 (Exón 9), rs2239359 (Exón 16), rs7195066 (Exón 26), rs1061646 (Exón 40) y rs1800359 (Exón 42), que serán pues, los que marcaran el Haplotipo 1 como AGGCT y el Haplotipo 2 como GAATC. Según los datos obtenidos de HapMap, el Haplotipo 1 es el más común en la población CEU, ya que presenta una frecuencia de 0,317, mientras que el Haplotipo 2 presenta una frecuencia de 0,108 en esta población. En la población YRI, el Haplotipo 1 es inexistente, mientras que el Haplotipo 2 presenta una frecuencia de 0,385. El hecho que el Haplotipo 1 sea bastante común en individuos de origen europeo, 1 de cada 3 alelos, aproximadamente, no nos permite afirmar que todos los individuos analizados compartan un mismo alelo ancestral, ya que, aunque esto sea probable, también se podría haber originado la misma mutación en dos o más alelos con el mismo haplotipo.

No obstante, debido a que el Haplotipo 1 no existe en la población YRI, podemos afirmar que la mutación c.3788_3790delTCT fue introducida en América desde las poblaciones europeas y no desde el continente africano.

Para verificar que los pacientes en los que la mutación estudiada se encuentra asociada al Haplotipo 1 comparten un mismo alelo ancestral, realizamos un análisis de 4 VNTRs que se encuentran en una región de unas 340Kb alrededor del gen *FANCA* y separados entre ellos por 1cM. Los VNTRs tienen la particularidad que son más variables que los SNPs por lo que el hecho de que distintos pacientes los compartan, refuerza la hipótesis de que el alelo sea ancestral. La disposición y las características de cada uno de los VNTRs se detallan en la Figura 32.

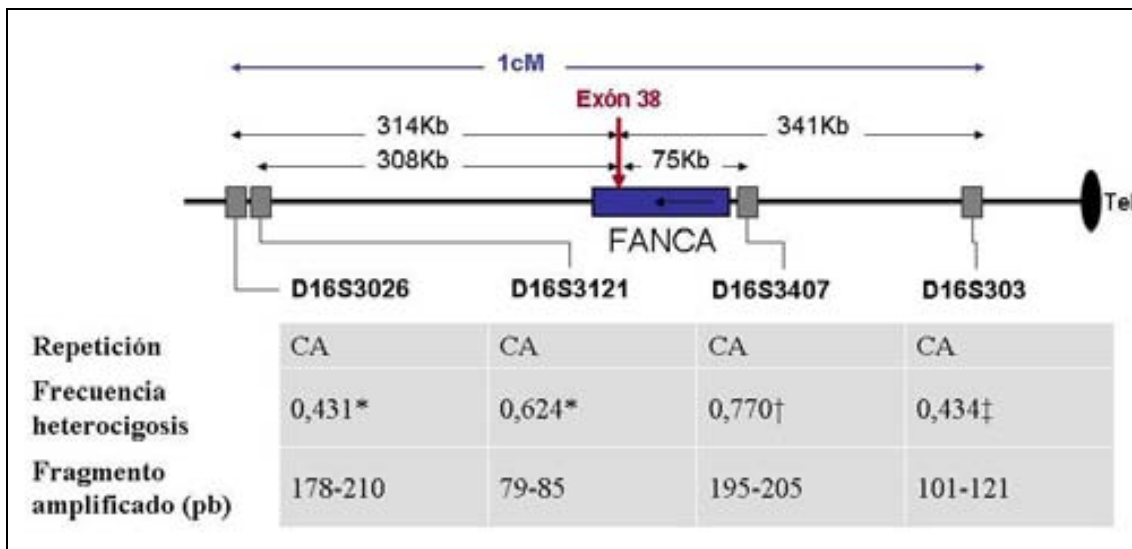


Figura 32. Localización y características de los VNTRs analizados. Frecuencias de heterocigosis en población caucásica según *Généthon, †(Whitmore *et al.* 1998), ‡(Shriver *et al.* 1993).

Realizamos pues el análisis de los 4 VNTRs en una muestra de los pacientes que presentan el Haplotipo 1 asociado a la mutación: 5 pacientes de La Palma (España), 8 pacientes de Brasil, 1 paciente de EUA, 1 paciente de las Islas Británicas, 1 paciente de Portugal, 1 paciente de Alemania y 1 paciente de Pakistán. El resultado del análisis, con la longitud del fragmento amplificado obtenido para cada VNTR se puede observar en la Figura 33.

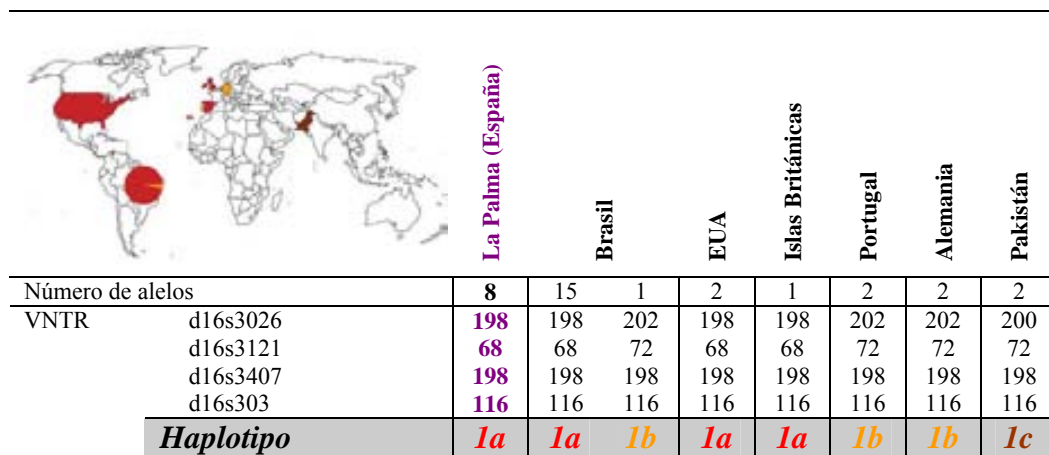


Figura 33. Análisis de marcadores VNTR asociados a la mutación c.3788_3790delTCT, en los pacientes con Haplotipo 1 según estudio de SNPs. Se encuentran 3 haplotipos distintos, denominados 1a, 1b y 1c, marcados en color rojo, naranja y marrón en el mapa.

Se han encontrado 3 sub-haplotipos distintos entre los pacientes que presentan el Haplotipo 1 según el análisis de SNPs, en cuanto a la información de los VNTRs estudiados. Aún así, vemos que los VNTRs más próximos a la región telomérica (o más próximos al extremo 5' del gen *FANCA*), d16s303 y d16s3407, son comunes en todos los pacientes analizados, aún si presentan una elevada frecuencia de heterocigosis, 0,77 y 0,43 en la población caucásica, respectivamente. Estos datos confirman que todos los alelos con la mutación c.3788_3790delTCT asociada al Haplotipo 1 provienen de un mismo alelo ancestral. Los VNTRs localizados a 3' del gen *FANCA*, d16s3121 y d16s3026 presentan variaciones entre los pacientes estudiados. El paciente de Pakistán es homocigoto para estos dos VNTRs, pero presenta alelos distintos al resto de los pacientes analizados. Entre los pacientes europeos y americanos se han detectado dos sub-haplotipos. El sub-haplotipo mayoritario (1a) se ha encontrado en 26 de los 31 alelos estudiados (84%) mientras que el sub-haplotipo 1b se encuentra en los 5 restantes (16%). Los dos sub-haplotipos 1a y 1b se han encontrado tanto en América como en Europa, indicando que la mutación c.3788_3790delTCT fue importada a América desde las poblaciones europeas y que la aparición de los 2 sub-haplotipos es anterior a estas migraciones.

En resumen, se han detectado 2 orígenes distintos de la misma mutación, uno en el continente africano (Nigeria) y el segundo alelo muy ancestral que se ha difundido en poblaciones de Asia, Europa y América, convirtiendo la mutación c.3788_3790delTCT en la mutación de *FANCA* más frecuente del mundo, no por constituir un *hot-spot*

mutacional, si no debido a su gran ancestralidad y a su asociación con poblaciones que han experimentado importantes flujos migratorios y expansivos.

IV.2.2.3.2 Caracterización de deleciones intragénicas. Delimitación de los puntos de rotura de la deleción ex1-20 de FANCA

Las deleciones intragénicas son muy frecuentes en el gen *FANCA* y representan un 15% de las mutaciones encontradas en los pacientes españoles. Este elevado número de deleciones se corresponde con una elevada densidad de secuencias *Alu* en este gen. En varios estudios se ha demostrado que la gran mayoría de las deleciones encontradas tienen como mecanismo de origen, la recombinación entre dos secuencias *Alu*, con pérdida del fragmento interno (Centra *et al.* 1998; Levrán *et al.* 1998; Morgan *et al.* 1999).

Dentro del gen *FANCA*, las secuencias *Alu* se localizan en los intrones de una forma heterogénea. Encontramos 16 intrones que no presentan ninguna secuencia *Alu*, mientras que en otros se localizan hasta 9 de estos elementos repetitivos. De los 42 puntos de rotura encontrados en pacientes de AF españoles (17 deleciones presentadas en este trabajo y 4 deleciones nuevas encontradas recientemente), 37 de ellos se encuentran en el interior del gen *FANCA*, mientras que 5 de ellos se localizan a 5' o 3' del gen. Comparando la localización de los elementos *Alu* dentro del gen *FANCA* con los puntos de rotura de las deleciones encontradas en los pacientes españoles se obtiene que 36 de los 37 puntos de rotura se localizan en exones donde se encuentran 1 o más elementos *Alu*. La correlación entre las dos variables es estadísticamente significativa a nivel de $p < 0,001$ (Pearson). Solo en un caso, encontramos un punto de rotura, situado en el intrón 18, en el cuál no se ha encontrado ninguna secuencia *Alu* conservada. Podemos decir, pues, que aunque la recombinación entre elementos *Alu* distantes es el mecanismo más frecuente de formación de deleciones intragénicas en el gen *FANCA*, (97,3%), posiblemente no es el único, como ya ha sido apuntado en un trabajo anterior (Yagasaki *et al.* 2004).

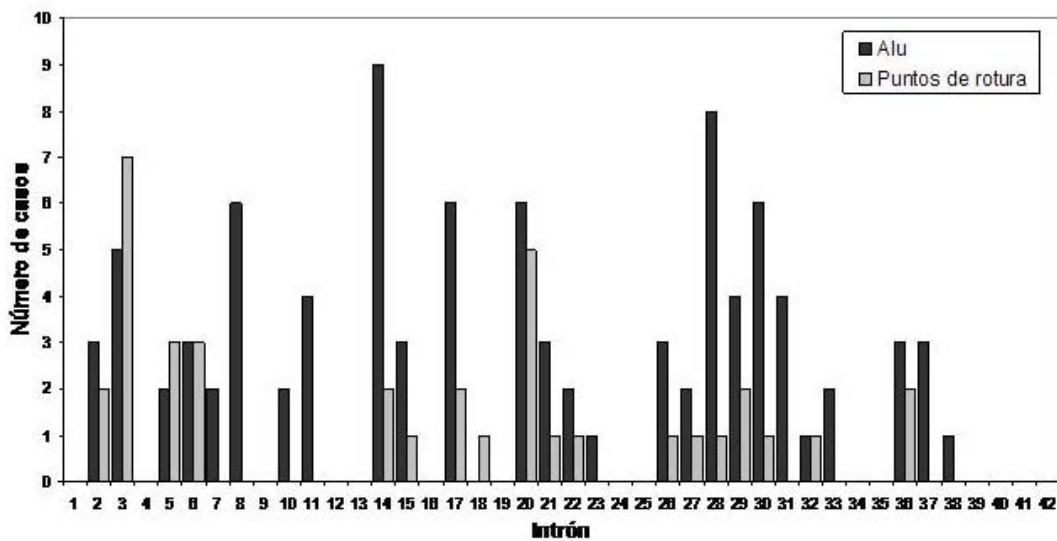


Figura 34. Distribución de secuencias *Alu* en los intrones del gen *FANCA* y comparación con los puntos de rotura de las deleciones encontradas en los pacientes españoles. Número de secuencias *Alu* según (Morgan *et al.* 1999).

Todas las deleciones encontradas en pacientes españoles tienen definidos los puntos de rotura en el interior del gen *FANCA* excepto 4. Tres de ellas tienen el extremo 5' de la deleción localizado más allá del exón 1 del gen (ex1-3del, ex1-6del y ex1-20del), y 1 de ellas incluye el exón 43 (ex15-43del), por lo que el extremo de la deleción está localizado a 3' del gen.

Las deleciones que presentan ambos puntos de rotura dentro del gen *FANCA*, se originan mediante recombinación entre dos secuencias homólogas en *cis*, en la gran mayoría de los casos entre fragmentos *Alu*, situadas a cierta distancia la una de la otra, con pérdida del fragmento interno. No obstante, las deleciones que presentan uno de sus puntos de rotura fuera del gen *FANCA*, podrían haber sido generadas por otros mecanismos. Se sabe que no solo el gen *FANCA* es especialmente rico en secuencias *Alu*, si no que todo el cromosoma 16 presenta una gran cantidad de estos elementos, siendo el cuarto cromosoma con más densidad de *Alu*, sólo superado por los cromosomas 22, 19 y 17 (Grover *et al.* 2004). Así pues, en los casos en los que uno de los extremos de la deleción se encuentra fuera del gen *FANCA*, el mecanismo de origen de la deleción podría deberse también a la recombinación entre *Alu*, en este caso, más distantes. No obstante, otros dos mecanismos podrían haber generado la deleción: translocación recíproca entre cromosomas o pérdida del fragmento terminal del cromosoma 16q.

La deleción ex1-20 se ha localizado en dos pacientes españoles distintos (FA58 y FA145) y no se había descrito en ningún otro paciente del mundo. Con el objetivo de determinar si los dos pacientes son portadores de la misma deleción (mismos puntos de rotura), conocer el alcance de la deleción y determinar el mecanismo de generación de esta deleción, se procede a localizar el punto de rotura a 5' del gen *FANCA*.

El análisis de MLPA en los pacientes FA145 y FA58, identifica la presencia de una sola copia de los exones 1-20 del gen. En caso de que la deleción fuera generada por translocación recíproca, el análisis de MLPA detectaría igual número de copias, por lo que se descarta este mecanismo.

Para delimitar la zona donde se encuentra el punto de rotura se utilizan distintas aproximaciones: CGH en microarrays, análisis de heterocigosidad de SNPs y PCR cuantitativa a tiempo real.

La primera aproximación utilizada consiste en la aplicación de microarray CGH sobre la muestra de ADN del paciente FA145, heterocigoto para la deleción ex1-20. Este análisis ha sido realizado como parte de un estudio de búsqueda de deleciones hemicigotas/homocigotos en todo el genoma en pacientes de AF sin gen conocido, dónde el paciente FA145 fue incluido como control de la capacidad del ensayo de detectar posibles deleciones. La información obtenida, se utilizó también para determinar el punto de rotura de la deleción. En la Figura 35a se muestran los valores medios del \log_2 ratio y SD de los BACs que comprenden el gen *FANCA* y situados a 3' de él, así como la posición de cada uno de ellos en el genoma, obtenidos en los dos microarrays utilizados. En el microarray de UCSF (2464 BACs), el gen *FANCA* está representado por el BAC RP11-7D23, el cuál, presenta un valor de \log_2 ratio=-0,48, valor esperado para una deleción en heterocigosis. En la Figura 35b, se muestran gráficamente todos los valores de \log_2 ratio obtenidos para los BACs del cromosoma 16, y observamos que el BAC RP11-7D23 es el único en el que se aprecia una deleción. El siguiente BAC situado a 3' del gen *FANCA*, PAC191P24, presenta un valor indicativo de igualdad número de copias entre las dos muestras para esta secuencia (\log_2 ratio=-0,11), indicando que la deleción no comprende también esta región, y por tanto, se descarta también la posibilidad que se haya perdido todo el extremo terminal del gen *FANCA*, con lo que se determina que el mecanismo de origen de la rotura es una recombinación entre dos secuencias homólogas localizadas una en el interior de *FANCA* y otra en un punto comprendido entre este gen y el PAC191P24, situado a 417Kb de

distancia. El array realizado en BCCRC, debido a su mayor resolución (32433 BACs), permite delimitar un poco mejor el alcance de la deleción. En este caso, el gen *FANCA* se encuentra incluido en el BAC RP11354M24, pero este no presenta el valor esperado para una deleción, en este caso $\log_2\text{ratio}=0,14$. La no detección de la deleción en este BAC se debe, muy probablemente, a que 2/3 partes del BAC se encuentran en la zona dónde no existe deleción, y únicamente el extremo final del BAC se encuentra dentro de la zona de la deleción (ver Figura 35c). Esto nos indica que la resolución de los microarrays, no depende sólo de la distancia a la que se encuentran situados los BACs, si no también del tamaño de estos. El siguiente BAC, RP11665E03, presenta un valor indicativo de igualdad número de copias, por lo que la deleción no llega a comprender toda la secuencia de este BAC, pero sí podría estar incluida parte de ella. Así pues, se define una zona en la que está comprendido el punto de rotura desde el extremo del gen *FANCA* hasta el final del BAC RP11665E03, una zona de 276Kb en la que se encuentran localizados 13 genes.

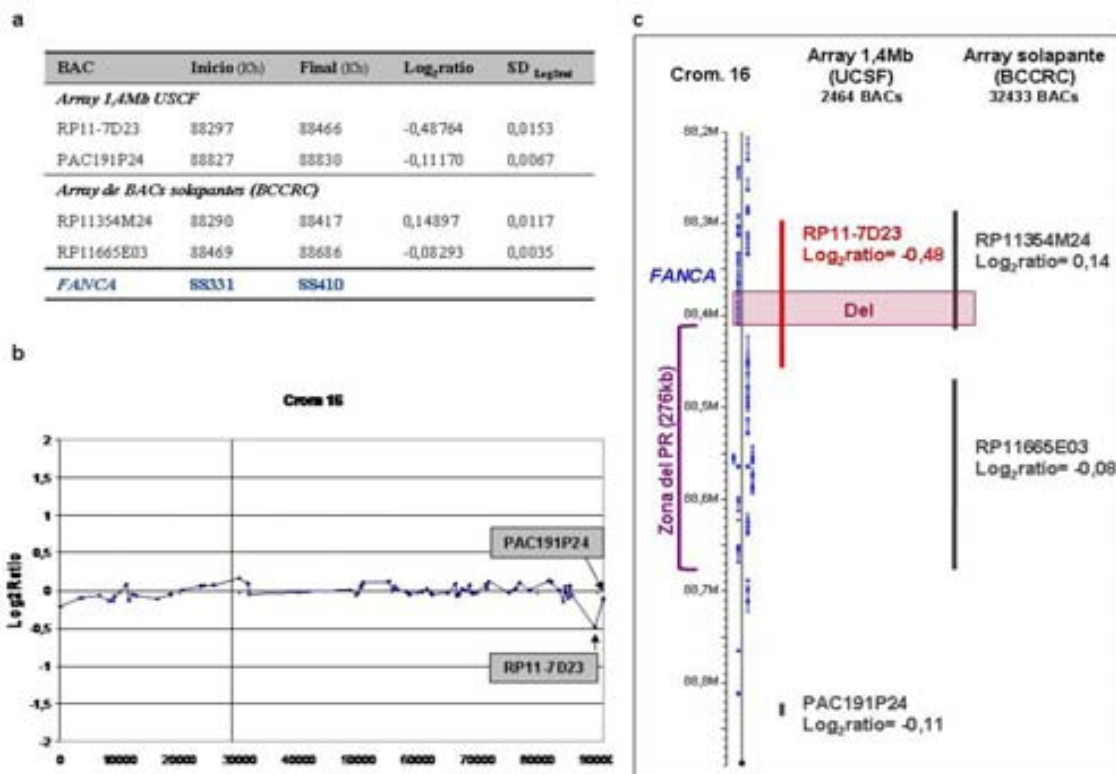


Figura 35. Delimitación del punto de rotura de la deleción ex1-20 en *FANCA* en el paciente FA145 mediante microarray CGH. (a) Localización y valores obtenidos para la media de $\log_2\text{ratio}$ y SD de los BACs que comprenden el gen *FANCA* o adyacentes a él. Se muestra también la posición del gen *FANCA*. (b) Representación de los valores de $\log_2\text{ratio}$ de los BACs del cromosoma 16 (microarray UCSF). Se señalan los BACs relevantes en este estudio. (c) Esquema de la región estudiada. Se indica la posición de los BACs y los genes. Se señala la región que comprende la deleción (exones 1-20 de *FANCA*) y también la zona en la que está comprendido el punto de rotura a 3' de *FANCA* (Zona del PR).

Para seguir delimitando el punto de rotura se utiliza otra aproximación, el análisis de hemicigosidad de marcadores genéticos, en este caso, SNPs. Para ello, disponemos de ADN paterno (FA145p) y materno (FA145m). En este caso, la madre es la portadora de la delección y el padre de otra mutación distinta en *FANCA*. Se amplifican distintas regiones a lo largo de toda la región donde encontramos SNPs polimórficos. El estudio se realiza en distintas fases y en cada fase se va delimitando la región que comprende la delección. El listado de todos los SNPs analizados y la frecuencia de heterocigosis que presenta cada uno de ellos en la población caucásica (CEU), se presenta en la Tabla 17. Para facilitar la comprensión del análisis, los SNPs se han codificado tal y como se muestra en esta tabla.

Tabla 17. SNPs analizados dentro de la región de 276Kb dónde potencialmente se encuentra el punto de rotura de la delección ex1-20 de *FANCA*.

Gen	Código	SNP	Frec. Het.
<i>SNPs fase 1</i>			
SPIRE2	SP1	rs9928396	0,450
	SP2	rs9935541	0,415
FLJ20286	FL1	rs12596872	0,430
	FL2	rs8049897	0,287
	FL3	rs8051733	0,294
GAS8	GA1	rs3743829	0,600
	GA2	rs3743827	0,497
	GA3	rs3743826	0,517
<i>SNPs fase 2</i>			
TCF25	TC1	rs1109334	0,400
	TC2	rs11866200	0,164
	TC3	rs2270461	0,150
	TC4	rs2270460	0,119
MC1R	MC1	rs3212359	0,609
	MC2	rs3212361	0,391
	MC3	rs3212363	0,550
<i>SNPs fase 3</i>			
TCF25	TC5	rs7199642	0,017
	TC6	rs7184225	0,017
	TC7	rs12919894	0,019
	TC8	rs12930056	0,119
	TC9	rs12930606	0,119
	TC10	rs17784386	0,117
	TC11	rs9806913	0,150
	TC12	rs9922515	0,150
	TC13	rs7184960	0,113
	TC14	rs2293586	0,180
	TC15	rs11646448	0,117
	TC16	rs10153210	0,033
	TC17	rs10153196	0,136

Los resultados del análisis de estos SNPs en el paciente FA145 y sus progenitores se muestran en la Figura 36.

En la primera fase, dentro de la región de 276Kb, se analizan 3 bloques de SNPs, localizados en los genes *SPIRE2*, *FLJ20186* y *GAS8*. El polimorfismo SP2 indica que la delección incluye este punto, ya que paciente y madre (portadora de la delección) muestran un solo alelo y éste es distinto entre ellos, indicando que el alelo recibido por vía materna presenta una delección. El siguiente SNP analizado en el gen *FLJ20186* (FL1) indica que en este punto no existe delección, ya que el paciente presenta 2 alelos distintos. Así pues, el punto de rotura se encuentra entre estos dos SNPs, en una región de 128Kb. En la fase 2, se analizan 3 bloques de SNPs adicionales, situados en el extremo 5' del gen *TCF25*, en el extremo 3' de este mismo gen y en el gen *MC1R*. De un modo similar a lo obtenido en la anterior fase, se comprueba que la delección alcanza hasta el SNP TC1, pero no llega hasta TC2 ya que FA145m es heterocigoto. Así pues, se determina que la delección llega hasta el inicio del gen *TCF25*, pero no hasta su extremo 3', de modo que el punto de rotura se localiza en una región de 35Kb entre el promotor y el intrón 14 del gen. Dentro del gen *TCF25*, no se encuentran SNPs de elevada frecuencia de heterocigosis en la población. Aún así, se analizan 13 SNPs situados en esta región (fase 3) obteniendo que ninguno de estos SNPs es informativo y no nos permiten concretar más el punto de rotura de la delección.

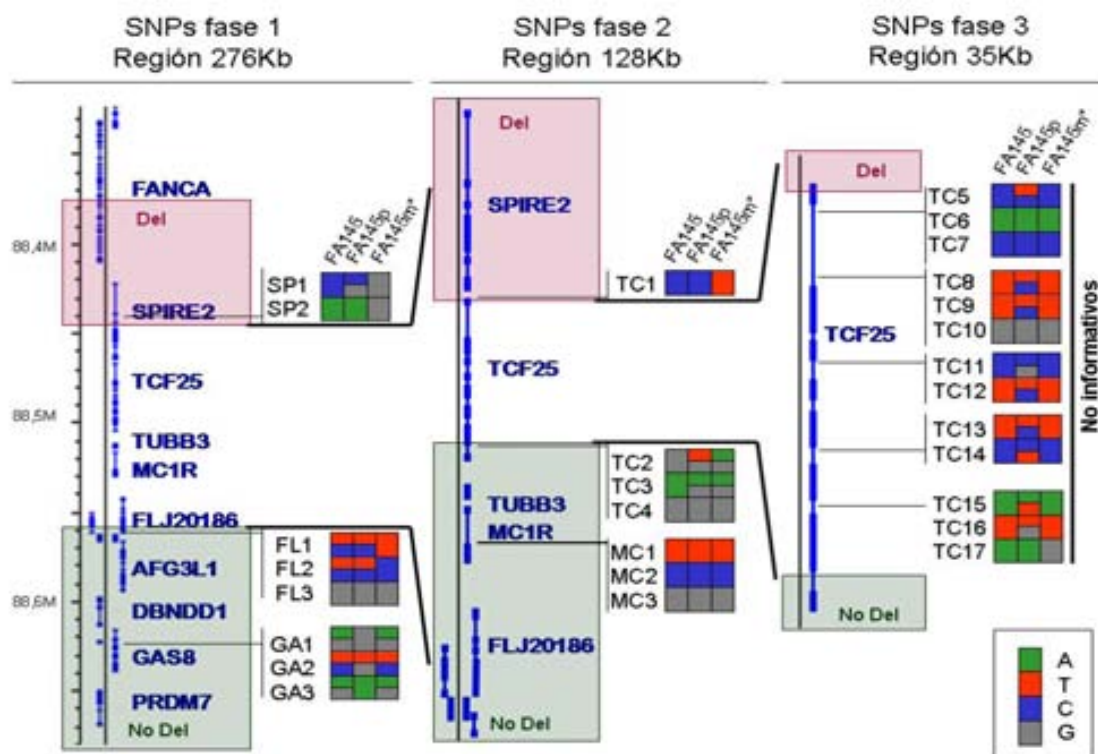
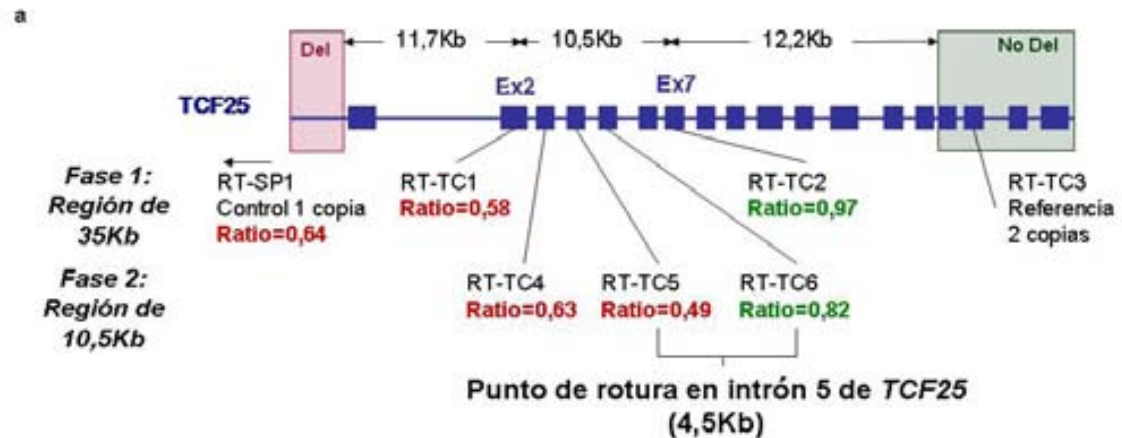


Figura 36. Delimitación del punto de rotura y longitud de la delección ex1-20 de *FANCA* en FA145 mediante análisis de SNPs en 3 fases.

Mediante el análisis de SNPs, se ha determinado que el punto de rotura se encuentra dentro de una región de 35Kb en el interior del gen *TCF25* y que en esta región no se encuentran SNPs informativos que permitan seguir delimitando el alcance de la deleción. Para llegar a concretar el punto de rotura, se procede mediante PCR cuantitativa a tiempo real sobre ADN, que permite determinar la existencia de una o dos copias de la región amplificada. La cuantificación realizada es relativa, es decir, se compara el valor de cantidad de ADN inicial (ADNi) para una determinada región obtenido en el paciente FA145 con el valor obtenido en un individuo control (presenta 2 copias en el genoma para la región estudiada). Como individuo control se utiliza el ADN del padre (FA145p) ya que no es portador de la deleción. Partiendo de una misma cantidad de ADN total para dos muestras distintas, diferencias en la cantidad de ADNi de la región amplificada indica distinto número de copias en el genoma. Así pues, para el paciente FA145, en una región con 2 copias del gen, esperamos que [Ratio FA145/FA145p \approx 1] y en una región con 1 copia [Ratio FA145/FA145p \approx 0,5]. Como referencia, se utiliza una región en el exón 16 del gen *TCF25* ya que FA145 presenta 2 copias de esta región según lo determinado en el análisis de SNPs (Región RT-TC3). Para minimizar el error que se puede cometer por diferencias mínimas en la cantidad de ADN total de FA145 y FA145p en la reacción de amplificación, se normaliza el valor de las distintas amplificaciones, por el valor obtenido en la región control, en este caso, RT-TC3, ya que el valor obtenido de ADNi en esta región debe ser igual para las dos muestras. Este análisis se realiza en 2 fases, tal y como muestra la Figura 37.

En la primera fase, se diseñan 2 amplificaciones dentro de la región de 35Kb separadas entre ellas unas 11Kb (RT-TC1 y RT-TC2), además de amplificar una región dentro del gen *SPIRE2* (RT-SP1) que nos sirve de control interno de deleción. Los ratios obtenidos muestran que la técnica es capaz de detectar la deleción, ya que la región RT-SP1 muestra un ratio FA145/FA145p=0,64 (próximo al 0,5 esperado). La región RT-TC1 muestra un ratio=0,58, indicativo de que en este punto también se encuentra la deleción, mientras que la región RT-TC2 presenta un ratio=0,97, que indica igualdad de número de copias entre la muestra control y FA145. Así pues, el punto de rotura se encuentra en una región de 10,5Kb, entre los exones 2 y 7 del gen *TCF25*. En una segunda fase, se diseñan 3 amplificaciones más, correspondientes a los exones 3, 4 y 5 del gen, a las que nos referimos como RT-TC3, RT-TC4 y RT-TC5, respectivamente. En esta ocasión, se observa que mientras que RT-TC3 y RT-TC4 presentan ratios de 0,63 y 0,49, indicando

que la deleción llega hasta este punto, RT-TC5 presenta un valor de 0,82, más próximo a la igualdad de número de copias entre las dos muestras. Así pues, mediante el análisis por PCR cuantitativa se ha determinado que el punto de rotura a 5' del gen *FANCA* se encuentra dentro de una región de 4,5Kb entre los exones 5 y 6 del gen *TCF25*.



b

PCR a tiempo real Fase 1				PCR a tiempo real Fase 2					
	RT_TC3	RT_SP1	RT_TC1	RT_TC2		RT_TC3	RT_TC4	RT_TC5	RT_TC6
FA145p	1	14,44	41,59	2,08	FA145p	1	4,67	2,87	1,51
FA145	1,04	9,72	25,33	2,10	FA145	1,24	3,70	1,76	1,54
FA145_Norm		9,34	24,35	2,02	FA145_Norm		2,98	1,41	1,24
Ratio (FA145/FA145p)		0,64	0,58	0,97	Ratio (FA145/FA145p)		0,63	0,49	0,82

Figura 37. Delimitación del punto de rotura de la deleción ex1-20 en *FANCA* en FA145 mediante PCR cuantitativa a tiempo real, realizado en 2 fases. (a) Esquema de la posición de las regiones amplificadas dentro del gen *TCF25* y valor de Ratio (FA145/FA145p) obtenido en cada una de las regiones. (b) Valores de cantidad de ADN_i de la muestra relativizados al valor obtenido en FA145p para la región control (RT_TC3), normalización de cantidad de ADN total y valores de ratio obtenidos.

En el intrón 5 de *TCF25* se localizan 5 secuencias *Alu* distribuidas en dos bloques, uno de 3 *Alu* situado a tan solo 170pb del exón 5 del gen, y un segundo bloque formado por 2 *Alu* situado a 1,2Kb del primer bloque, tal y como se muestra en el esquema de la Figura 38a. El extremo 3' de la deleción, se conoce que está situado dentro del intrón 20 de *FANCA*. Este intrón tiene una longitud de 3Kb y en él encontramos 4 secuencias *Alu* completas (≈ 280 pb) y una *Alu* parcial. La elevada densidad de secuencias *Alu* que se encuentra a ambos extremos de la deleción, nos confirma que el mecanismo más probable de origen de la deleción es una recombinación entre dos de estos elementos

repetitivos. Para amplificar un fragmento de ADN mediante PCR en el paciente FA145 que contenga el punto de rotura, se diseñan 2 PCRs. La primera PCR con un cebador situado en el exón 21 del gen *FANCA* (Cebador F), que no está deleciónado en el paciente FA145, y un segundo cebador (Cebador R1) situado dentro del intrón 5 de *TCF25*, justo delante del bloque de 3 secuencias *Alu* que se encuentra cercano al exón 6 del gen (que no se encontraba dentro de la zona de la deleción según los análisis por PCR cuantitativa). En esta PCR, el tamaño máximo que podemos esperar del fragmento amplificado es de 5,6Kb si se incorpora todo el intrón 20 de *FANCA* (3Kb) y todo el fragmento de intrón de *TCF25* hasta el cebador (2,6Kb). Se diseña una segunda PCR manteniendo el cebador F, pero situando el cebador del otro extremo, justo delante del bloque de *Alu* más cercano al exón 5 de *TCF25*. De este modo, en caso de que este fragmento, no esté incorporado dentro de la deleción, se aumentan las probabilidades de obtener una buena amplificación, ya que el producto es 1,2Kb más corto. La amplificación se realiza utilizando una polimerasa de alta procesividad, que permite amplificar fragmentos de hasta 12Kb. Se realiza la PCR sobre ADN del paciente FA145 y también el paciente FA58 que presenta también la deleción ex1-20 en *FANCA*. Como control de que el fragmento es específico, se incorpora una muestra de ADN del padre del paciente FA145 (FA145p) que no es portador de la deleción, y por tanto, no se debe producir amplificación debido a que los cebadores se encuentran separados por una distancia de unas 110Kb.

Como se muestra en la Figura 38b, se obtiene amplificación en las 2 PCRs, en los pacientes FA145 y FA58, pero no en FA145p, indicando que el punto de rotura se encuentra dentro de este fragmento amplificado. El fragmento de la PCR “F_R2”, mide aproximadamente 0,9Kb y el de la PCR “F_R1”, unas 2,1Kb, una diferencia de 1,2Kb que corresponde a la distancia entre los cebadores R1 y R2. El tamaño del fragmento obtenido en la PCR “F_R2” (0,9Kb) se corresponde con el tamaño mínimo de amplificación esperado, es decir la longitud desde ambos cebadores a su *Alu* más cercana, 440pb y 190pb respectivamente, más la longitud de una secuencia *Alu*, aproximadamente 280pb.

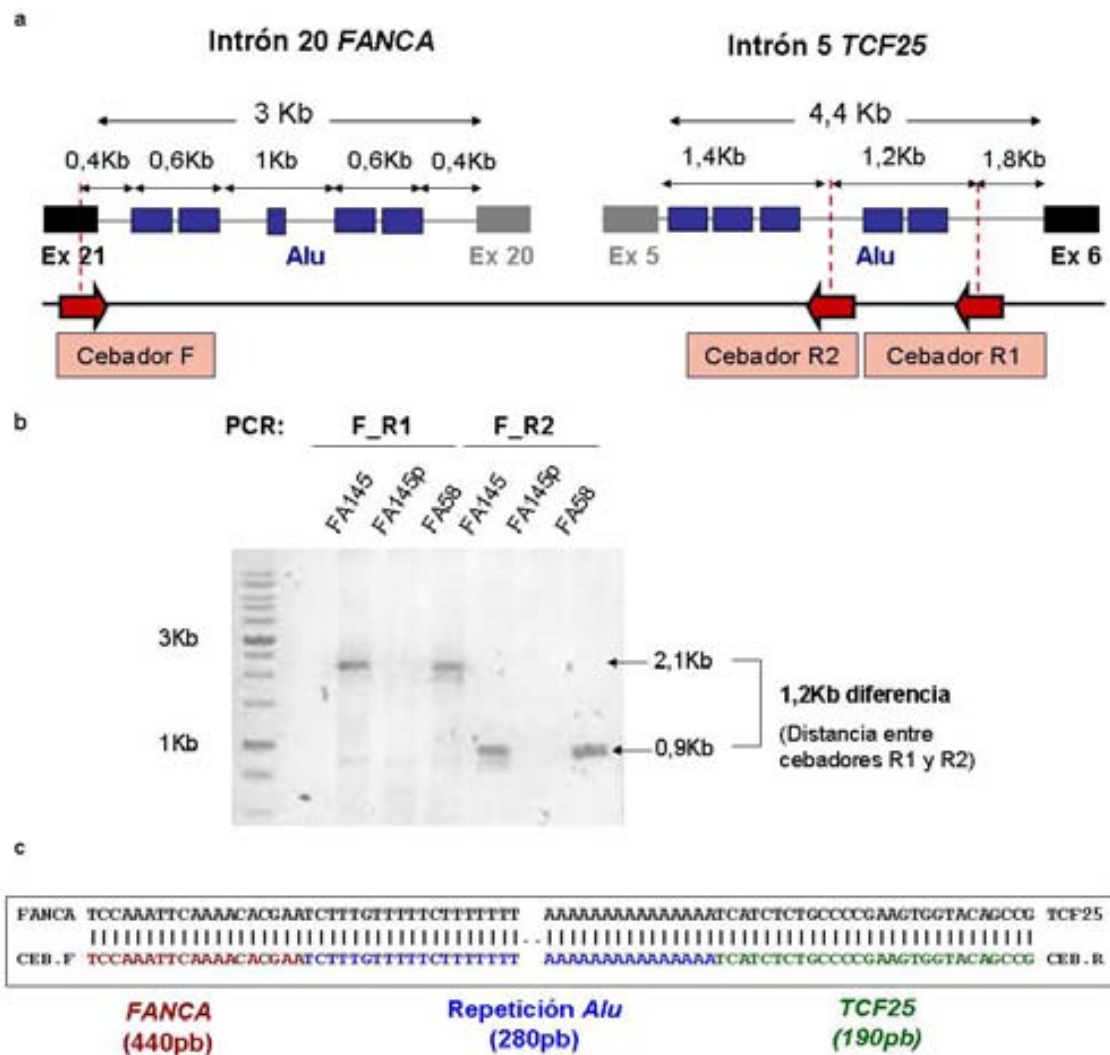


Figura 38. Amplificación por PCR de la región que contiene el punto de rotura de la delección ex1-20 de *FANCA*. (a) Diseño y posición de los cebadores utilizados, (b) resultado de la amplificación con el tamaño de las bandas obtenidas y (c) muestra de la secuenciación del fragmento amplificado (parte inferior coloreada) y alineamiento con la secuencia de referencia de los genes *FANCA* y *TCF25* (parte superior).

Como confirmación, se procede a la clonación del fragmento en un vector, mediante el sistema TOPO TA, y a la secuenciación del mismo desde los cebadores universales presentes en el vector. El resultado de la secuenciación confirma que el fragmento amplificado contiene la secuencia de 440pb desde el cebador F situado en el exón 21 de *FANCA* y la secuencia intrónica hasta la primera repetición *Alu*, el fragmento amplificado desde el cebador R muestra la secuencia del intrón 5 de *TCF25* comprendida entre el primer R2 y la primera secuencia *Alu* (190pb). En medio de los dos, se encuentra una secuencia *Alu* completa. Un fragmento de esta secuenciación y el

alineamiento con la secuencia correspondiente del gen *FANCA* y *TCF25* se muestran en la Figura 38c.

Finalmente, pues, se ha determinado que la deleción detectada inicialmente en el gen *FANCA* comprendiendo los exones 1 a 20, afecta también a los genes colindantes *SPIRE2* (deleción completa del gen) y *TCF25* (del exón 1 al 5), alcanzando una región de 112,2Kb. La deleción de los pacientes FA145 y FA58 presenta exactamente los mismos puntos de rotura, indicando que comparten un mismo alelo ancestral. La presencia de secuencias *Alu* a ambos extremos de la deleción, indica que la recombinación entre estos dos elementos es la causa del origen de esta deleción y, muy probablemente, de la gran mayoría de las deleciones que afectan al gen *FANCA*, aún cuando los extremos de la deleción se encuentran fuera del gen.

IV.2.2.3.3 Caracterización funcional de mutaciones no truncadoras en FANCA

De las 50 mutaciones distintas descritas en este trabajo, encontradas en pacientes FA-A españoles, 21 de ellas corresponden a mutaciones que no conllevan una interrupción prematura de la proteína, por lo que podrían tener un efecto hipomórfico. Se han encontrado 12 mutaciones de cambio de sentido, 1 microdeleción que no conlleva cambio en la pauta de lectura y 8 mutaciones que afectan al *splicing* del gen. Las mutaciones de *splicing* pueden tener consecuencias distintas: en caso de alteración de las secuencias de reconocimiento del *spliceosoma*, en la mayoría de casos se omite un exón del mRNA, pudiendo causar cambios en el marco de lectura, por lo que dichas mutaciones son en realidad, truncadoras. En otros casos, como el caso de la mutación c.709+5G>T o G>A en *FANCA*, se incorporan 30 nucleótidos en el ARNm sin que se incorpore ningún codón de terminación de la traducción y no se altera el marco de lectura, por lo que se obtiene una proteína no funcional que incorpora 10 aminoácidos más. En el caso de mutaciones que descubren sitios de *splicing* alternativos, pueden incorporar fragmentos intrónicos en el ARNm, pudiendo producir también una interrupción prematura de la traducción o cambios en el marco de lectura. No obstante, también es posible que en un bajo porcentaje de las ocasiones, se utilicen las secuencias de reconocimiento correctas, lo que daría lugar a cierta cantidad de proteína funcional (Kalb *et al.* 2007). Debido a esta variabilidad, las mutaciones de *splicing* nuevas

encontradas en nuestra población y que no han sido caracterizadas a nivel de expresión de la proteína, se consideran, *a priori*, mutaciones potencialmente no truncadoras. Son tres: c.710-5T>C, c.3348+5G>A y c.893+920C>A. Las mutaciones c.710-5T>C y c.3348+5G>A causan la omisión de los exones 8 y 33, respectivamente, en ambos casos produciendo un cambio en la pauta de lectura, por lo que se espera que sean mutaciones truncadoras. En el caso de la mutación c.893+920C>A, se podría reconocer en algunos casos, la secuencia de *splicing* normal, por lo que podría existir cierta cantidad de proteína funcional.

Existen pocos trabajos de caracterización de las repercusiones que este tipo de mutaciones tienen sobre la funcionalidad de la proteína. Nos proponemos analizar si estas mutaciones comprometen la estabilidad de la proteína y si permiten un mínimo de funcionalidad de la ruta FA/BRCA. Para realizar este estudio se dispone de 13 LCLs o fibroblastos primarios de pacientes españoles con, al menos, una mutación no truncadora. El listado de estas líneas y sus mutaciones correspondientes se especifican en la Tabla 18.

Tabla 18. Listado de los pacientes de los que se dispone de línea celular y sus mutaciones, para el estudio de caracterización de mutaciones no truncadoras.

Pac.	Mutación 1		Mutación 2	
	ADN	Proteína	ADN	Proteína
FA5	c. 4198C>T (Ex 42)	p.R1800C	T*	
FA40	c.1475A>G (Ex 16)	p.H492R	c.1475A>G (Ex 16)	p.H492R
FA52	c.710-5T>C (Ex 8)	<i>Splicing</i> alterado (T?)	T	
FA56	c.3913C>T (Ex 39)	p. L1305F	T	
FA58	c.821C>T (Ex 9)	p. L274P	T	
FA75	c.3788_3790delTCT (Ex 38)	p.F1263del	c.2639G>A (Ex 28)	p.R880Q
FA82	c.3788_3790delTCT (Ex 38)	p.F1263del	c.709+5G>T (Ex 7)	p.D237G+238ins10 (AFMTRCGFLD)
FA88	c.709+5G>A (Ex 7)	p.D237G+238ins10 (AFMTRCGFLD)	T	
FA91	c.2224C>A (Ex 25)	p. Q742K	T	
FA145	c.893+920C>A (Ex 10)	<i>Splicing</i> alterado (T?)	T	
FA155	c.3788_3790delTCT (Ex 38)	p.F1263del	c.3348+5G>A y 3335T>G (Ex 33)	<i>Splicing</i> alterado (T?)
FA170	c.3788_3790delTCT (Ex 38)	p.F1263del	T	
FA328	c.2303T>C (Ex 26)	p. L768P	c.2303T>C (Ex 26)	p. L768P

*T es mutación truncadora

Análisis de expresión de la proteína FANCA

Se analiza la expresión de la proteína FANCA en estas líneas celulares. Todas las líneas son LCLs, excepto las líneas de los pacientes FA5 y FA52 que son fibroblastos primarios, debido a que corresponden a pacientes mosaico y la LCL derivada no tiene fenotipo AF. También se incluirán como control, 2 LCLs de pacientes con dos mutaciones truncadoras: el paciente FA55 (homocigoto para c.295C>T, p.Q99X) y el paciente FA178 (homocigoto para c.3558insG, p. R1187EfsX28) en los que no se espera detectar expresión de la proteína.

La reversión espontánea de las LCLs de pacientes AF en cultivo es un fenómeno bastante habitual. Para descartar que cualquiera de estas líneas pudiera haber revertido, se ha comprobado previamente su condición de línea AF mediante un ensayo de bloqueo del ciclo celular en fase G2 después de 48h de tratamiento con MMC y todas ellas han mostrado el bloqueo característico de las células AF.

En la Figura 39a se muestran las imágenes de los WBs realizados en las líneas. Los WBs 1 y 2 corresponden a las muestras de LCLs y el WB3 a las líneas de fibroblastos primarios. Debido a que FANCA se expresa en mayor cantidad en LCLs que en fibroblastos primarios, la cantidad total de proteína utilizada es de 40µg para las LCLs y 70µg para las muestras de fibroblastos. Se incluye en el WB extracto de proteína de una línea control (WT) de LCL o fibroblastos según corresponda, como indicador de los niveles normales de proteína. De este extracto WT, se incluye un carril con la cantidad de proteína equivalente a la cargada en las muestras de los pacientes y un segundo carril con la cantidad mínima de extracto total que nos permite detectar la proteína FANCA (2µg en LCL y 4µg en fibroblastos), de modo que en los carriles dónde no se detecta la banda correspondiente a FANCA podemos afirmar que la expresión es inexistente o, en todo caso, inferior al 5% de la cantidad expresada en el control.

El resultado de los WBs muestra que todos los pacientes analizados expresan la proteína FANCA excepto dos: FA145 y FA52. En los dos casos, las mutaciones potencialmente no truncadoras de estos pacientes son mutaciones que de *splicing*: en el caso de FA145, la mutación c.893+920C>A, no permite pues, la expresión de proteína normal y en el caso de FA52, la mutación c.710-5T>C, conlleva, como se esperaba, la truncación de la proteína.

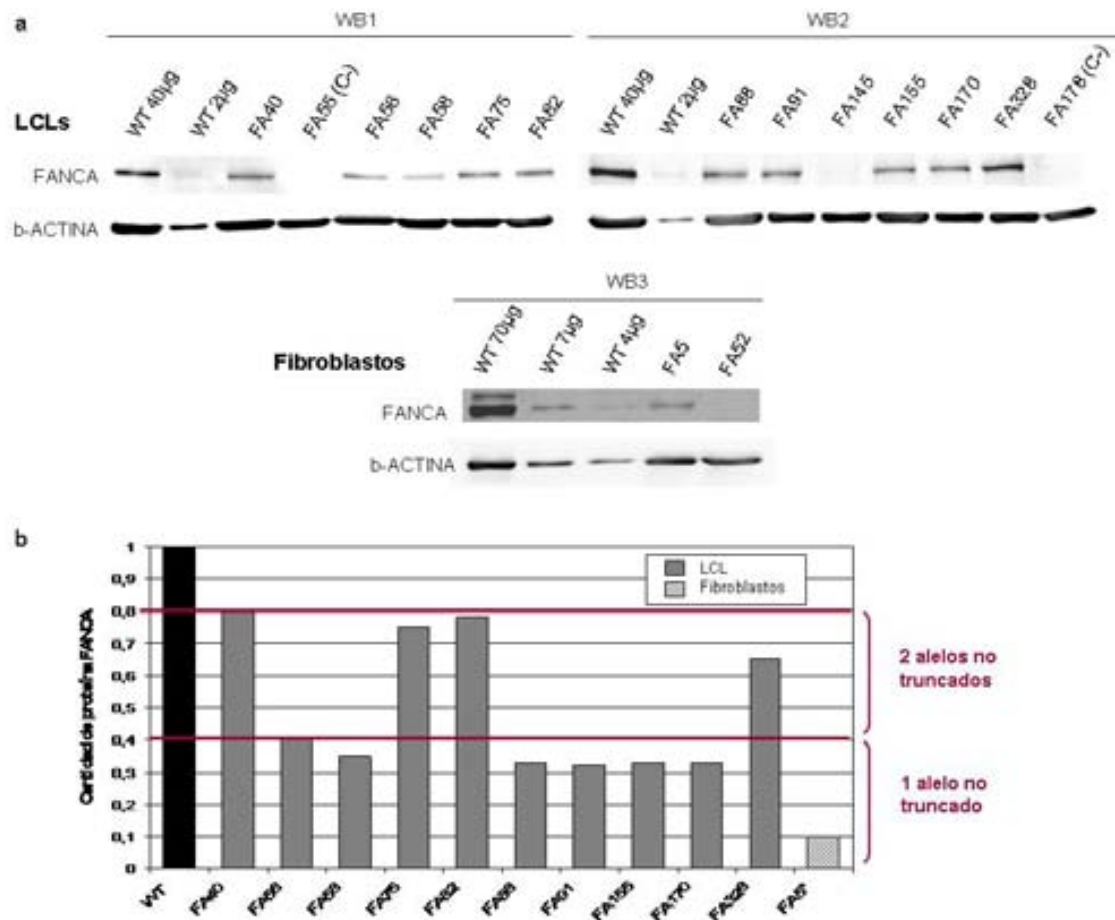


Figura 39. Análisis de la expresión de FANCA en pacientes con mutaciones no truncadoras. (a) WBs de FANCA en LCLs y fibroblastos. (b) Cuantificación de la cantidad de proteína FANCA expresada por cada uno de los pacientes relativo al control (WT).

Se ha cuantificado el nivel de proteína FANCA expresada en estos pacientes en relación al individuo sano (WT). En 6 de los pacientes (FA56, FA58, FA88, FA91, FA155 y FA170) los niveles expresados de FANCA son muy similares entre ellos, entre un 30 y un 40% de la cantidad observada en el control, mientras que en los pacientes FA40, FA75, FA82 y FA328, los niveles de proteína son de, aproximadamente, el doble (entre un 65 y un 80%). El paciente FA5 expresa solo un 10% de la proteína que expresa el control, pero el hecho que el análisis se haya realizado en fibroblastos hace que este valor pueda no ser comparable al obtenido en las LCLs. Los 6 pacientes que expresan menos cantidad de FANCA presentan un solo alelo no truncado (el paciente FA155 presenta una segunda mutación de *splicing* con omisión del exón 33, potencialmente truncadora), mientras que los 4 pacientes con más cantidad de FANCA, presentan 2 alelos con mutaciones no truncadoras.

Se observa pues, que las mutaciones no truncadoras en FANCA analizadas, conllevan todas unas consecuencias muy similares en cuanto a la estabilidad y expresión de la proteína. La estabilidad de la proteína podría verse afectada muy levemente (en nuestro estudio en un 10-20% por cada uno de los alelos mutados). Este efecto parece ser independiente del sitio en el que se encuentra la mutación, pues las mutaciones analizadas se encuentran repartidas a lo largo de todo el gen FANCA, en los exones 7, 9, 16, 25, 26, 28, 38, 39 y 42. Vemos también, que la cantidad de FANCA expresado es proporcional a la dosis génica.

Finalmente, el hecho que un elevado número de pacientes (43,8%) presenten mutaciones no truncadoras que permiten la expresión de la proteína, y que los niveles de expresión puedan ser cercanos a los observados en un control sano, desaconsejan el uso del WB como alternativa al subtipaje genético por complementación retroviral.

Análisis de la activación de la ruta FA/BRCA

Seguidamente, se quiere comprobar si en los pacientes en los que se ha detectado expresión de la proteína FANCA, ésta puede mantener una mínima funcionalidad y ser capaz de activar, aunque sea a niveles muy bajos, la ruta FA/BRCA. Para ello, se realiza un WB de FANCD2 después de tratamiento de las LCLs con hidroxurea (HU) 2mM durante 24h, que nos permite detectar la forma activa de esta proteína: FANCD2-ubiquitinada. Como se aprecia en la Figura 40, en ninguna de las líneas analizadas (LCLs) se observa monoubiquitinación residual de FANCD2, por lo que podemos concluir que la disrupción de la ruta FA/BRCA es completa también en los pacientes que expresan formas alteradas de la proteína FANCA.

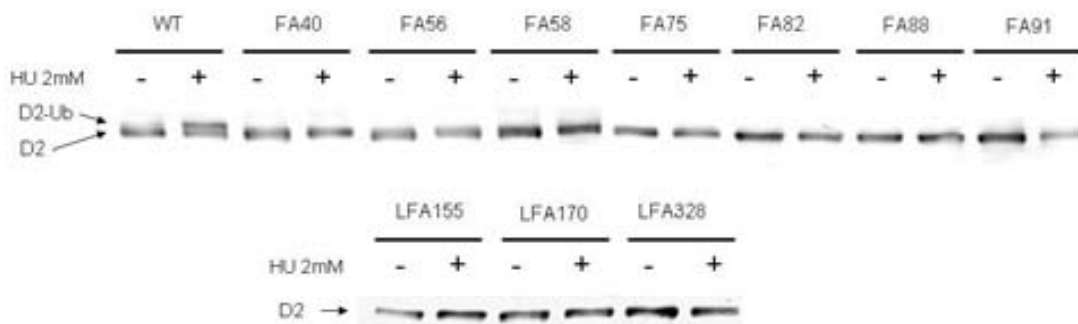


Figura 40. Análisis de la activación de FANCD2 en las líneas de pacientes de AF con mutaciones no truncadoras en la proteína FANCA.

Análisis de la capacidad de relocalización de FANCA al núcleo celular

Es conocido que FANCA se transloca del núcleo al citoplasma en función de la fase del ciclo celular (Mi y Kupfer 2005). Se quiere analizar si las formas mutadas de FANCA conservan o no la capacidad de translocarse al núcleo de la célula. Para ello, se realizan fraccionamientos de núcleo y citoplasma de las LCLs para ser analizados por WB, de un cultivo celular no tratado y asincrónico.

El resultado obtenido para todas las líneas con mutaciones no truncadoras es similar: a diferencia del control, la proporción de proteína FANCA que se encuentra en la fracción nuclear es muy reducida. El análisis de algunas de las LCLs se muestra en la Figura 41. Se observa que, para cantidades equivalentes de extracto proteico nuclear y citoplasmático, en una LCL control se detecta una proporción de proteína nuclear *v.s.* proteína citoplasmática de 1,23. Las líneas de los pacientes con mutaciones no truncadoras muestran una proporción de proteína nuclear muy inferior, de 6 a 44 veces menos que en el control. Ninguna de las formas mutadas por tanto, conserva la capacidad de entrar o de permanecer en el núcleo de una forma similar a la proteína WT. Este fenómeno también ha sido observado mediante inmunohistoquímica (Figura 41b). Después de tratamiento con 2mM de HU durante 24h, se observa que en el control WT, FANCA es mayoritariamente nuclear y forma focos en los sitios de horquillas de replicación bloqueadas (marcados con γ -H2AX). En la línea FA170, portadora de la mutación no truncadora p.F1263del, se observa que la señal de FANCA es mayoritariamente citoplasmática, aunque se observan algunas pocas células con señal nuclear de FANCA (célula marcada con una flecha en la figura), que coincide con una mínima cantidad de FANCA observada en la fracción nuclear en el análisis por WB.

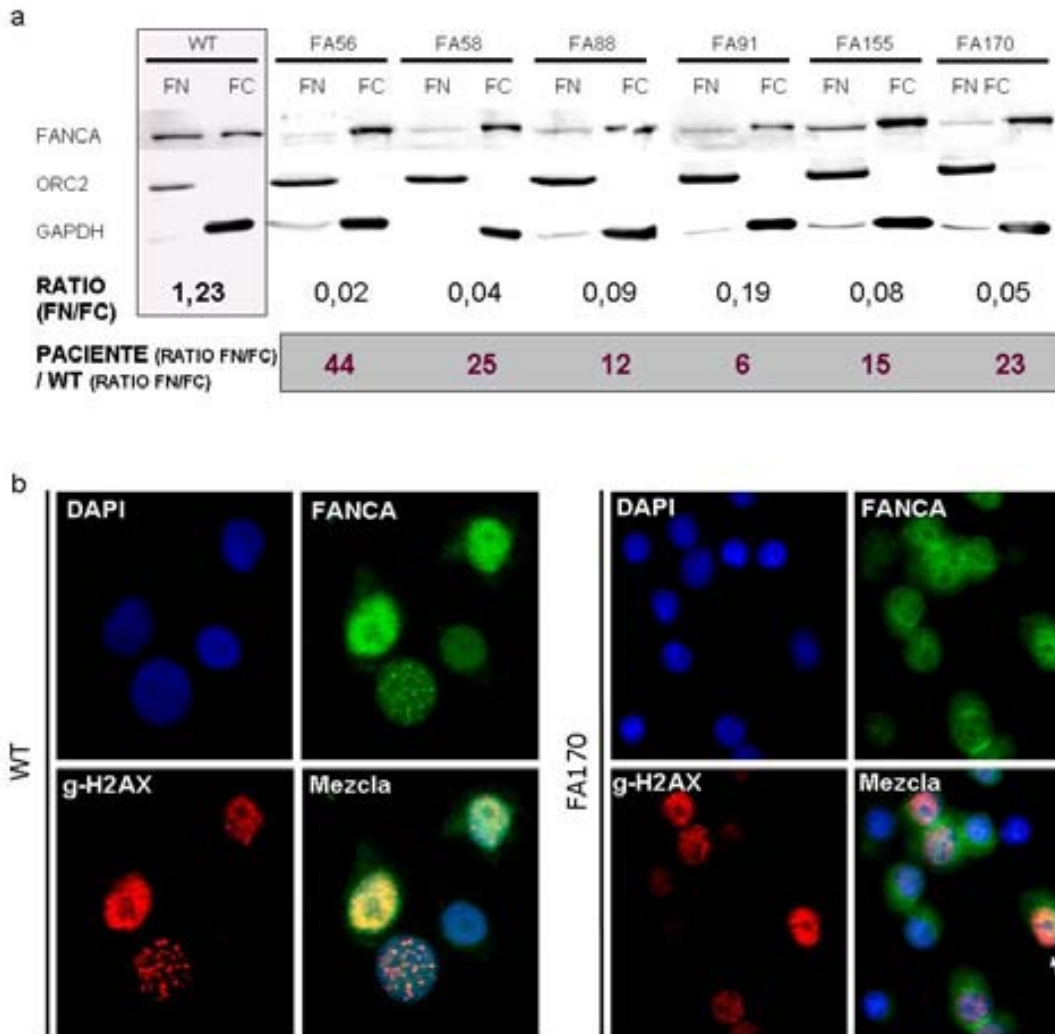


Figura 41. Análisis de la distribución de FANCA en el núcleo y citoplasma celular en los distintos mutantes. (a) Análisis mediante fraccionamiento celular y WB. FN es “Fracción nuclear” y FC es “Fracción citoplasmática”. Se calcula la proporción de proteína que se encuentra en núcleo y citoplasma en cada una de las líneas (Ratio FN/FC). Se compara el ratio obtenido en cada una de las líneas mutantes con el ratio de la línea control o WT. (b) Imágenes de inmunohistoquímica donde se aprecia la localización de FANCA en la línea WT y FA170, después de tratamiento con 2mM de HU.

Todas las formas mutantes analizadas presentan, pues, una disrupción de su capacidad de localizar en el núcleo celular, sea por incapacidad de entrar o de retenerse en él. La menor expresión de la proteína, junto con la incapacidad de concentrarse en el núcleo celular puede explicar la patogenicidad de estas mutaciones no truncadoras.

IV.3. FACTORES CONDICIONANTES DE LA SENSIBILIDAD CELULAR A ICLs

IV.3.1. Grupo de complementación

La existencia de distintos grupos de complementación dentro de la AF podría explicar parte de la variabilidad observada entre pacientes en cuanto a la sensibilidad celular a agentes inductores de ICLs, como el DEB o la MMC, aunque no se encuentran en la literatura referencias claras en este sentido. Se evalúa pues, este posible efecto en nuestra población.

Como se ha expuesto en el apartado anterior, cerca del 80% de pacientes de nuestra población pertenecen al grupo FA-A, de modo que, aunque contamos con un número considerable de pacientes FA-A para este estudio, el número de pacientes pertenecientes a los demás grupos de complementación es reducido. Aún así, siempre considerando que los resultados obtenidos son orientativos, se aprecian algunas diferencias en cuanto a la sensibilidad celular en los distintos grupos de complementación.

En la Figura 42a se muestra la distribución de los pacientes en función de su sensibilidad al DEB. Se observa una tendencia a que los pacientes no FA-A, a excepción de los FA-D2, se encuentren en la parte superior-derecha del gráfico, indicando una mayor sensibilidad a este agente inductor de ICLs. Expresando la sensibilidad al DEB en función del índice CFI y estableciendo las medias y el rango para cada grupo de complementación (Figura 42b), vemos que los pacientes FA-A y FA-D2 presentan una menor sensibilidad celular al DEB que el resto de los pacientes, pertenecientes a los grupos FA-D1, FA-E, FA-G y FA-J. Dentro de cada grupo, el índice CFI tiene una distribución normal, por lo que aplicamos el ANOVA de un factor para determinar si existen diferencias entre grupos, excluyendo los grupos FA-D1 y FA-E, de los cuales tenemos sólo un paciente. Este análisis muestra que, efectivamente, existen diferencias significativas entre grupos ($P=0,006$). El grupo que presenta mayor sensibilidad al DEB es el de los pacientes FA-G, y presenta diferencias significativas con el grupo de los pacientes FA-A y FA-D2, con una significación de $P=0,001$ y $P=0,018$, respectivamente, los cuáles, presentan una sensibilidad al DEB muy parecida.

El grupo de los pacientes FA-J, presenta una sensibilidad mayor que los grupos FA-A y FA-D2, pero la diferencia no es significativa.

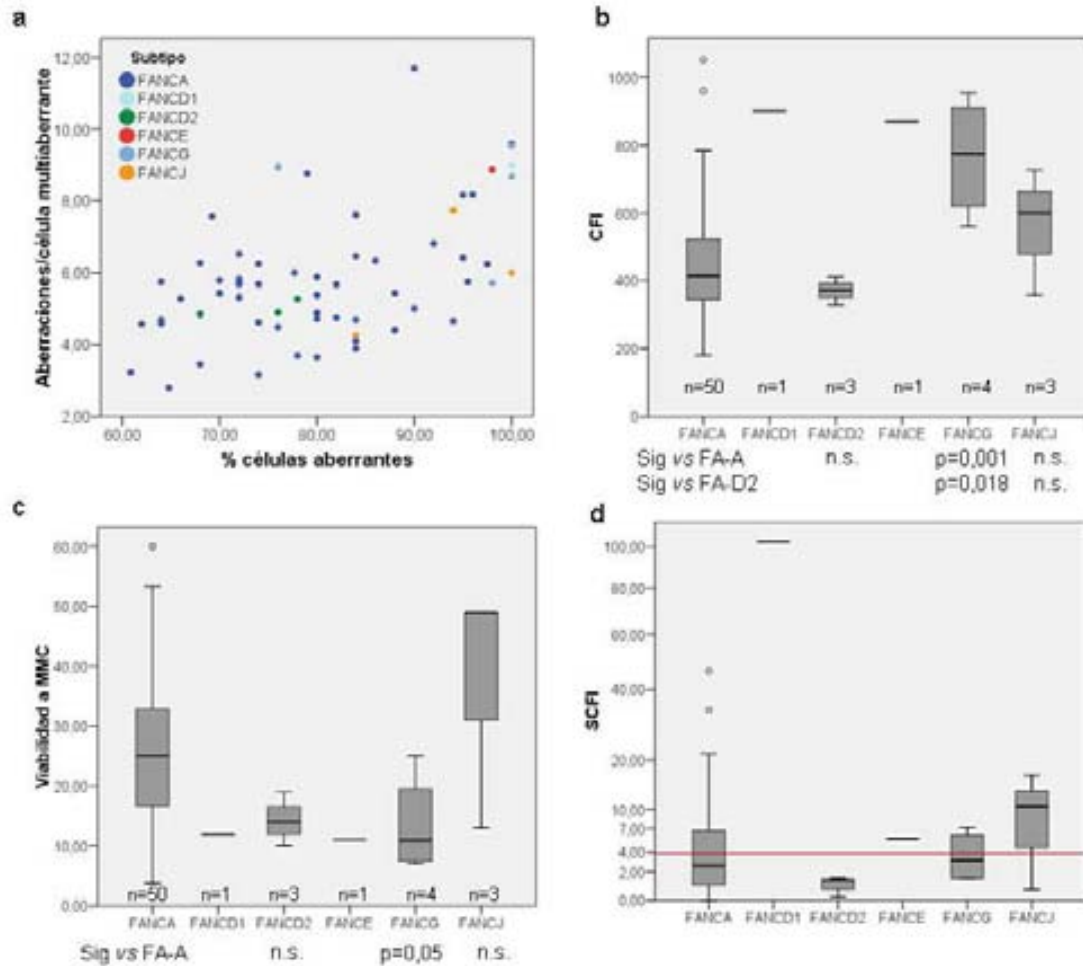


Figura 42. Sensibilidad celular al DEB, a la MMC y fragilidad espontánea en función de los distintos grupos de complementación en los pacientes AF no mosaico. (a) Distribución de los pacientes en función del % de células aberrantes y aberraciones/célula multiaberrante inducidos por DEB. (b) Índice CFI de sensibilidad al DEB en los distintos grupos. (c) Diferencias en la viabilidad celular a la MMC. (d) Diferencias en el índice de fragilidad cromosómica espontánea (SCFI. La línea roja indica el límite de fragilidad espontánea que presentan los individuos no AF. En las figuras (b) y (c) se muestran las diferencias estadísticas entre grupos.

En cuanto a la sensibilidad celular a la MMC (Figura 42c), se confirma que los pacientes FA-G son mas sensibles, ya que, en general, presentan una menor viabilidad que los pacientes de los demás grupos de complementación, siendo la significación estadística de $P=0,05$, es decir, marginalmente significativo comparándolos con los pacientes FA-A. No se observan diferencias entre los demás grupos de complementación.

Los datos referentes a la fragilidad cromosómica espontánea, representados en la Figura 42d por el índice SCFI, presentan una tendencia muy similar a los de fragilidad inducida por DEB, aunque las diferencias no son estadísticamente significativas. Los pacientes FA-A y FA-D2 presentan en conjunto una menor sensibilidad que el resto. Destaca la elevada fragilidad espontánea del paciente FA-D1 comparado con los pacientes de los demás grupos de complementación.

IV.3.2. Tipo de mutación

Para determinar si el tipo de mutación, truncadora o no truncadora, puede tener un efecto en cuanto a la sensibilidad de las células al DEB o MMC, así como a la fragilidad que se observa de forma espontánea, se clasifican los pacientes FA-A de nuestra población que han sido caracterizados a nivel mutacional, en función de si presentan 2 alelos truncados (no se observa expresión de proteína por WB) o si presentan al menos 1 alelo no truncado y por tanto, hay expresión de la proteína. Obtenemos que de los 68 pacientes FA-A, 41 de ellos (60,3%) presentan 2 mutaciones truncadoras y 27 (39,7%) presentan al menos una forma no truncada. Para realizar este análisis se excluyen los pacientes mosaico, por presentar valores anormales de fragilidad espontánea, sensibilidad al DEB y a la MMC. Como marcador de fragilidad espontánea se usa el índice SCFI y como marcador de sensibilidad al DEB, el índice CFI. Los tres marcadores de sensibilidad celular usados siguen una distribución normal dentro de cada grupo de pacientes según el tipo de mutación, de modo que se aplica un análisis paramétrico (prueba T o prueba post-hoc de Bonferroni), para la comparación entre grupos.

Tabla 19. Fragilidad espontánea y sensibilidad celular al DEB y MMC en función del tipo de mutación, en los pacientes FA-A.

Marcador sensibilidad	Tipo de mutación	n	Media± SD	P
Espontánea (SCFI)	Truncadoras	22	6,34±10,25	0,595
	No truncadoras	20	4,98±2,19	
DEB (CFI)	Truncadoras	22	451,09±158,93	0,585
	No truncadoras	18	484,97±229,01	
MMC (Viabilidad)	Truncadoras	24	29,25±11,81	0,057
	No truncadoras	19	22,99±8,30	

En la Tabla 19 se exponen los valores obtenidos de sensibilidad celular para cada uno de los dos grupos. No se observa relación entre la fragilidad espontánea o inducida por DEB y el tipo de mutación. En cuanto a la sensibilidad celular a MMC, se observa una tendencia a que los individuos con ausencia de proteína, presenten una viabilidad mayor a la MMC que los individuos que presentan una forma no funcional de FANCA, aunque no llega a ser estadísticamente significativo (Figura 43).

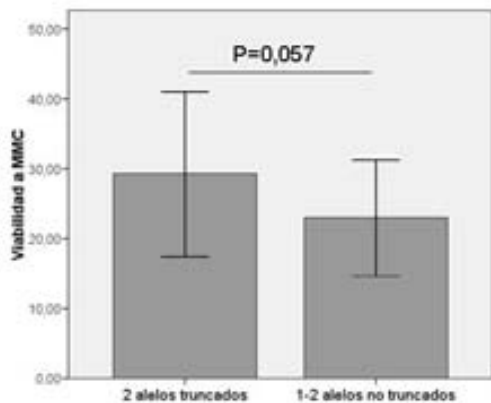


Figura 43. Viabilidad celular a MMC en función del tipo de mutación.

IV.4. FACTORES CONDICIONANTES DE LA SEVERIDAD DEL FENOTIPO CLÍNICO

La severidad del fenotipo clínico de los pacientes de AF es muy variable, como se ha comentado extensamente en la introducción, sin que los motivos de tal variabilidad hayan sido hasta el momento determinados. La identificación de marcadores asociados a la severidad del paciente, podrían ser usados como marcadores de pronóstico de la evolución de la enfermedad y constituir una herramienta en la elección del mejor tratamiento para cada paciente. Así pues, nos proponemos determinar si la sensibilidad celular o el tipo de mutación en *FANCA* muestran una correlación con la severidad clínica del paciente. El análisis del efecto del grupo de complementación en la severidad clínica no ha sido realizado debido al reducido número de pacientes pertenecientes a los grupos no FA-A de los que se dispone de la información clínica.

Como marcadores de la severidad del fenotipo clínico en cada uno de los pacientes, se pueden utilizar muchas variables, como el requerimiento de andrógenos o TMO, el

desarrollo de tumores, la supervivencia, etc., aunque la mayoría de ellas, dependen en gran medida de la edad del paciente en el momento del estudio. Así pues, elegimos como marcadores de severidad dos factores que no dependen de la edad: número de malformaciones y edad de aparición del fallo medular (la gran mayoría de los pacientes registrados han desarrollado ya anomalías hematológicas). Estas dos variables son, además, las más comúnmente usadas en la literatura (Kutler *et al.* 2003b).

En nuestra población, observamos que el número medio de malformaciones es de 3,43 (0-8) sin que se aprecien diferencias entre la población de mosaicos y no mosaicos, mientras que la edad media de fallo medular es de 6,51 años (1-14) en la población de pacientes no mosaico y 7,81 en la población de pacientes AF mosaicos (2-20).

IV.4.1. Sensibilidad celular: espontánea, al DEB y a la MMC

Se realizan correlaciones bivariadas entre los índices de fragilidad espontánea (SCFI), fragilidad inducida por DEB (CFI) y viabilidad a la MMC y los marcadores de severidad clínica: número de malformaciones y edad de aparición del fallo medular. Se realizan pruebas no paramétricas (Rho de Spearman), ya que es lo aconsejado en los estudios de fenotipo clínico (Morales *et al.* 2008). Para este análisis se descartan los pacientes mosaico.

En la Tabla 20 se muestra el número de individuos incluidos en cada uno de los análisis y la significación de la correlación. Se observa que mientras que la edad de debut hematológico no presenta ninguna correlación con los marcadores de sensibilidad celular, el número de malformaciones presenta una correlación significativa con la sensibilidad al DEB (índice CFI, $P=0,001$) y con la viabilidad a MMC ($P=0,030$). No se observa asociación con el índice de fragilidad cromosómica espontánea (SCFI).

Tabla 20. Correlaciones entre marcadores de sensibilidad celular y marcadores de severidad clínica. Se muestra para cada análisis, el número de pacientes incluidos (n) y la significación estadística (P).

	SCFI		CFI		MMC	
	n	P	n	P	n	P
Número de malformaciones	54	0,970	52	0,001	54	0,030
Edad de aparición del fallo medular	49	0,932	48	0,943	49	0,902

Las correlaciones efectuadas entre CFI o MMC y número de malformaciones, muestran que a mayor número de malformaciones, más elevada es la sensibilidad celular: mayor índice de CFI (Figura 44a) y menor viabilidad a la MMC (Figura 44b).

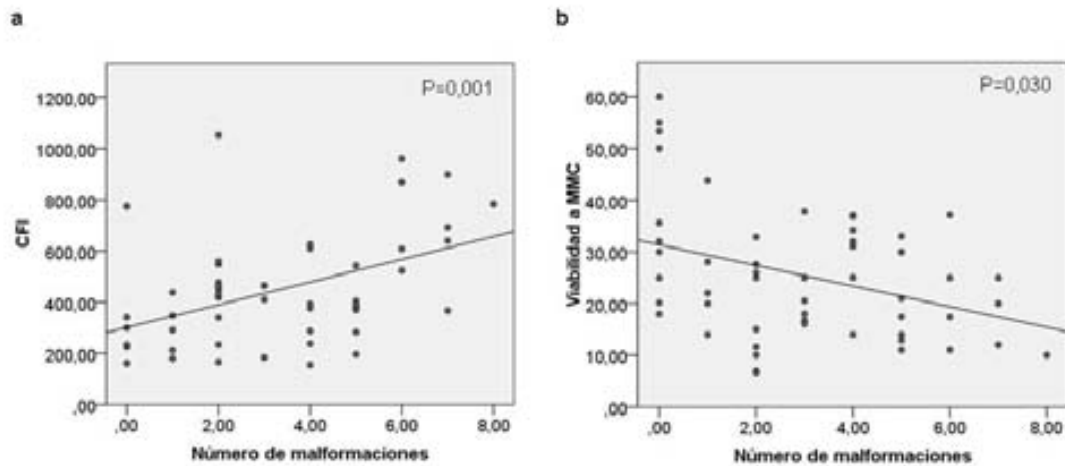


Figura 44. Correlaciones entre número de malformaciones y (a) sensibilidad al DEB (CFI) y (b) viabilidad a la MMC.

IV.4.2. Tipo de mutación

Se quiere determinar si el tipo de mutación tiene consecuencias en cuanto a la severidad clínica de los pacientes, según el número de malformaciones o la edad de debut hematológico. Para ello se realizan comparaciones mediante pruebas no paramétricas entre los pacientes FA-A que no expresan proteína y los que expresan una proteína no funcional. Estos últimos, los podemos subdividir entre los que presentan un alelo con una mutación no truncadora y los que presentan dos alelos con mutaciones no truncadoras (presentan el doble de FANCA en la célula). En el caso de la variable de “Edad de aparición de fallo medular” se descartan los mosaicos, ya que debido a esta condición, se ha detectado que presentan fallo medular a una edad más tardía.

En la Tabla 21 se muestra el número de individuos incorporados en este análisis para cada grupo, la media y la desviación estándar, así como la significación estadística obtenida en cada comparación.

Tabla 21. Análisis de la relación entre tipo de mutación y los marcadores de severidad clínica. Se muestra para cada análisis, el número de pacientes incluidos (n) la media (\bar{x}), la desviación estándar (SD) y la significación estadística (P).

Tipo de mutación	Número de malformaciones				Edad de aparición fallo medular			
	n	\bar{x}	SD	P	n	\bar{x}	SD	P
2 mut. truncadoras	40	3,25	0,36	0,84	32	6,65	0,47	0,47
1-2 mut. no truncadoras	19	3,36	0,53		16	6,25	1,11	

Como se observa, el tipo de mutación no parece repercutir de modo importante en el número de malformaciones que presenta el paciente o la edad de aparición del fallo medular.

IV.5.DETERMINACIÓN DE PROCESOS CELULARES DESREGULADOS EN AF

Pueden existir otros factores que expliquen parte de la gran variabilidad que existe entre pacientes de AF, en cuanto a la sensibilidad celular y a la severidad del fenotipo clínico, a parte de los que afectan directamente los propios genes FA (grupo de complementación o tipo de mutación), analizados en los apartados anteriores. Se pretende pues, determinar rutas y procesos celulares que se encuentran alterados en células de AF, que pueden conducir a la descripción de nuevas funciones de los genes FA y a explicar la variabilidad observada entre pacientes.

Para realizar este estudio se pretende comparar el proteoma de células FA y células WT, e identificar aquellas proteínas en las que se observa una expresión diferencial, mediante el sistema 2D-DIGE, en el que la fracción proteica de cada una de las líneas marcada con un fluorocromo distinto, se resuelve en un gel en 2D, para después poder realizar la cuantificación de las distintas proteínas a partir de la cantidad de fluorescencia. En aquellas en las que se aprecia una expresión diferencial, se procede a su identificación por espectrometría de masas.

Uno de los problemas habituales de este tipo de estudios es que gran parte de las diferencias observadas en la expresión de las proteínas puede deberse a diferencias en el contexto genético de las líneas comparadas y no a la deficiencia en un gen concreto. Para evitar que estas diferencias enmascaren los resultados obtenidos, se comparan en

este estudio líneas isogénicas, es decir, derivadas del mismo paciente, una deficiente en un gen FA y la otra revertida espontáneamente en cultivo, de modo que tampoco se introduce en la línea celular ninguna manipulación externa como podría ser la complementación con vectores virales. Así pues, se comparan las LCLs EUFA274, deficiente en el gen FANCA, y su línea revertida EUFA274r, y la línea EUFA450, deficiente en el gen FANCC, y su línea revertida EUFA450r, todas ellas cedidas por el Dr. H. Joenje (VUMC, Amsterdam).

IV.5.1. Caracterización genética de las LCLs EUFA274 y EUFA450

Se realiza una caracterización genética de las líneas que serán utilizadas en el estudio. Se comprueba el fenotipo FA en las líneas deficientes (EUFA274 y EUFA450) y el fenotipo normal en las líneas revertidas (EUFA274r y EUFA450r), mediante un ensayo de bloqueo de ciclo celular en G2 en respuesta a MMC. La reversión de las líneas también se comprueba a nivel mutacional. Finalmente, la isogenicidad entre las líneas es comprobada mediante un análisis de marcadores genéticos altamente polimórficos.

En la Figura 45a se muestra como, en respuesta al tratamiento con 50nM de MMC, las líneas deficientes EUFA274 y EUFA450, muestran un bloqueo en G2 comparable al observado en la línea FA control, mientras que este bloqueo no se observa en las líneas EUFA274r y EUFA450r indicando que las líneas han revertido. Igualmente, el análisis mutacional realizado (Figura 45b), indica que la línea EUFA274 presenta las mutaciones c.709+5G>A (Exón 7), p.D237G+238ins10(AFMTRCGFLD) y c.3763G>T (Exón 37), p.E1255X, pero la mutación c.709+5G>A no se detecta en EUFA274r, relevando la base molecular de la reversión de la línea. Del mismo modo, la línea EUFA450, presenta las mutaciones c.67delG (Exón 1), p.D23IfxX23 y c.1661T>C (Exón 14), p.L554P (Lo Ten Foe *et al.* 1997), mientras que en la línea EUFA450r, la mutación c.67delG no se detecta, dando lugar a un alelo funcional.

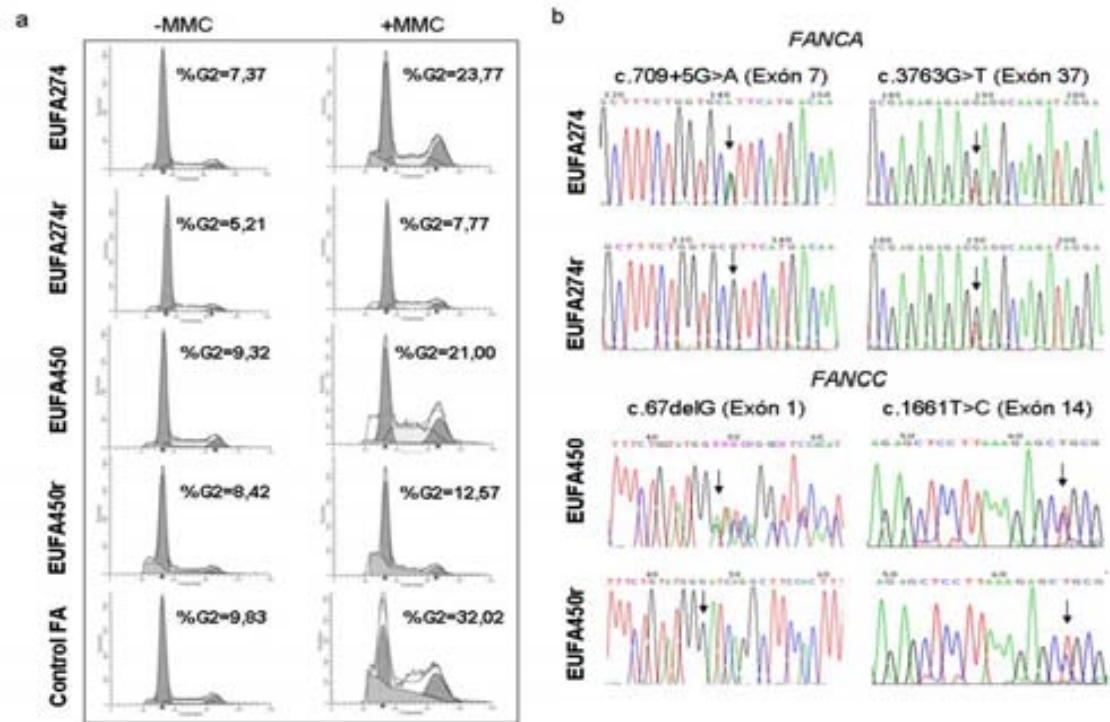


Figura 45. Comprobación del fenotipo FA o WT de las líneas EUFA274, EUFA274r, EUFA450 y EUFA450r mediante ensayo de bloqueo del ciclo celular en G2 (a) y análisis mutacional (b).

En la Tabla 22 se muestra el resultado del análisis de SNPs altamente polimórficos para la comprobación de isogenicidad de las líneas. Se amplifican dos fragmentos, en el cromosoma 1 y 6, que contienen 4 y 5 SNPs respectivamente. Se observa que las parejas EUFA274-EUFA274r y EUFA450-EUFA450r son isogénicas, ya que presentan la misma secuencia para todos los SNPs analizados.

Tabla 22. Comprobación de la isogenicidad de las LCLs mediante análisis de SNPs.

	Freq. het.	EUFA274	EUFA274r	EUFA450	EUFA450r
SNPs Crom. 1					
rs6699418	0,524	A/G	A/G	G/G	G/G
rs10890333	0,483	C/T	C/T	T/T	T/T
rs10890334	0,536	T/A	T/A	A/A	A/A
rs10890335	0,500	G/C	G/C	G/G	G/G
SNPs Crom. 6					
rs2206286	0,375	A/G	A/G	A/G	A/G
rs12210583	0,136	G/G	G/G	G/G	G/G
rs4710839	0,525	G/C	G/C	G/G	G/G
rs12717	0,550	G/C	G/C	G/G	G/G
rs10946279	0,136	G/G	G/G	G/G	G/G
		Isogénicas		Isogénicas	

IV.5.2. Expresión diferencial de proteínas

Mediante este estudio se pretende comparar, dentro del mismo contexto genético, una línea FANCA deficiente (EUFA274) con su WT (EUFA274r), una línea FANCC deficiente (EUFA450) con su WT (EUFA450r), y también una línea FANCA deficiente con una línea FANCC deficiente. Debido a que las líneas FANCA y FANCC proceden de un contexto genético distinto, sólo se aceptarán como válidos, aquellos puntos que muestren diferencias de expresión entre las dos líneas deficientes (EUFA274 v.s. EUFA450) pero no entre las mismas dos líneas revertidas (EUFA274r v.s. EUFA450r). Se realizan 6 geles: tres réplicas de la comparación entre EUFA274 y EUFA274r y tres réplicas de la comparación entre EUFA450 y EUFA450r. Para poder comparar las cuatro líneas entre ellas, la electroforesis de los 6 geles se realiza conjuntamente para obtener migraciones lo más parecidas posible, y se añade en cada gel, una tercera muestra (resultado de la mezcla de los lisados proteicos de las cuatro líneas) marcada con el fluorocromo Cy2, que permitirá normalizar las variaciones en la fluorescencia total de cada uno de los geles.

Se identifican unos 2500 puntos separados electroforéticamente. Los valores comparativos de cantidad de proteína entre las dos líneas (ratio) muestran una distribución normal. La mayoría de ellos, presentan valores de ratio próximos a 1, es decir, igual cantidad de proteína entre las dos líneas comparadas. Como criterio de selección, se considera expresión diferencial en aquellos puntos que presentan un valor medio de ratio superior a $\pm 1,6$, y que además, presentan significación estadística ($P < 0,05$) en la prueba T (comparando los valores obtenidos en las 3 réplicas realizadas). Así pues, tal y como se muestra en la Tabla 23, se han identificado 49 puntos (proteínas distintas) con expresión diferencial entre la línea FA-A^{-/-} y la misma línea revertida, 36 entre FA-C^{-/-} y su línea revertida, 54 en la comparación entre FA-A^{-/-} y FA-C^{-/-} y 84 comparando las dos líneas revertidas. Tal y como se esperaba, se identifican más proteínas con expresión diferencial en las comparaciones entre líneas con un contexto genético distinto (FA-A^{-/-} v.s. FA-C^{-/-} y FA-Ar v.s. FA-Cr) que en las comparaciones entre líneas isogénicas (FA-A^{-/-} v.s. FA-Ar y FA-C^{-/-} v.s. FA-Cr), indicando, que muchas de las diferencias de expresión observadas entre líneas no isogénicas, se deben a diversidad en el genoma. Para eliminar este factor de confusión en la comparación entre las líneas FA-A^{-/-} y FA-C^{-/-}, solo se tienen en cuenta, aquellas proteínas que no muestran

también una expresión diferencial en la comparación entre las mismas dos líneas revertidas. Entonces, de las 54 proteínas identificadas en la comparación entre FA-A^{-/-} y FA-C^{-/-}, se consideran válidas 40 de ellos, ya que 14 se observan también en la comparación entre FA-Ar y FA-Cr, y por tanto, son atribuibles a diferencias entre las líneas, independientes de los genes FA.

Tabla 23. Número de puntos (proteínas) que muestran una expresión diferencial identificados en cada una de las comparaciones realizadas.

Comparación	Nº puntos diferenciales	Puntos válidos
FA-A ^{-/-} v.s. FA-Ar	49	49
FA-C ^{-/-} v.s. FA-Cr	36	36
FA-A ^{-/-} v.s. FA-C ^{-/-}	No presentes en FA-Ar v.s. FA-Cr	40
	Presentes en FA-Ar v.s. FA-Cr	14
FA-Ar v.s. FA-Cr	84	-

Algunos de los puntos diferenciales observados, se detectan en más de una comparación, por lo que el total de proteínas distintas a identificar es de 90. De estas, no todas pudieron ser identificadas debido a que muchos de los puntos presentaban una cantidad de proteína muy baja: 75 fueron recortados del gel con éxito y 45 pudieron ser identificados inequívocamente por espectrometría de masas. El listado de proteínas identificadas, los ratios y la significación obtenidas en las comparaciones se muestran en la Tabla 24.

De las 45 proteínas identificadas, 7 corresponden a inmunoglobulinas, 3 a proteínas del complejo mayor de histocompatibilidad (HLA), 2 corresponden a la proteína del citoesqueleto Actina y 3 de los puntos presentan una mezcla de dos proteínas, por lo que no serán tenidos en cuenta (sombreados en gris en la tabla).

Tabla 24. Proteínas con expresión diferencial identificadas

Punto	FA-Ar vs. FA-A ^{-/-}		FA-Cr vs. FA-C ^{-/-}		FA-A ^{-/-} vs. FA-C ^{-/-}		FA-Ar vs. FA-Cr		Identificación	Observ.
	Ratio	P (T-test)	Ratio	P (T-test)	Ratio	P (T-test)	Ratio	P (T-test)		
1	1,14	2,89E-01	-21,74	1,09E-03	-28,98	1,08E-03	-1,17	6,73E-02	IGKC	
2	-9,41	4,02E-05	1,20	5,24E-01	18,37	1,78E-05	1,63	2,16E-01	IGHM	
3	-9,05	4,43E-04	-1,27	4,54E-01	10,15	3,70E-04	1,42	3,73E-01	ATAD3A	
4	1,07	5,43E-01	9,60	7,84E-03	-1,17	9,22E-02	-10,43	7,76E-03	IGHM	
6	2,12	1,26E-04	1,00	9,82E-01	4,03	1,80E-05	8,52	1,85E-05	HLA-DRB1	
8	-7,68	5,22E-03	-1,00	1,00E+00	6,49	2,01E-04	-1,18	1,46E-01	IGL@	
9	-1,10	6,53E-01	-7,34	7,21E-03	-6,82	3,70E-02	-1,02	9,35E-01	IGHM	
12	-4,06	7,85E-04	-1,18	6,81E-01	4,57	1,11E-03	1,33	3,84E-01	ATAD3A	
15	-1,26	2,57E-02	-3,56	2,25E-04	-3,92	4,41E-03	-1,39	6,67E-02	IGHM	
17	1,80	8,53E-06	1,30	1,41E-01	2,49	3,10E-05	3,44	4,26E-05	WDR1 / IGHA1	Mezcla
22	-1,98	1,44E-03	2,34	6,68E-04	1,22	5,36E-02	-3,79	2,33E-04	NSF	
24	2,35	3,05E-05	1,14	1,71E-01	1,56	2,85E-03	3,21	1,49E-05	HLA-DRB1	
30	-1,54	6,71E-05	2,20	1,24E-04	1,07	8,17E-02	-3,14	2,69E-03	SEC23B	
33	-1,04	8,69E-01	2,92	6,34E-04	1,45	2,39E-01	-2,10	1,55E-03	CHCHD3	
34	1,03	6,15E-01	2,85	2,03E-06	2,20	3,69E-04	-1,26	4,76E-04	LGALS1	
38	-2,67	8,69E-07	1,12	1,98E-01	2,36	5,89E-05	-1,26	1,46E-03	CHCHD3	
44	-1,08	4,38E-01	2,55	5,83E-03	1,22	7,70E-02	-2,25	8,34E-03	IGHM	
45	-2,16	5,85E-03	-1,42	5,04E-04	-1,15	3,67E-02	-1,76	4,34E-05	MX1	
47	-1,06	8,01E-01	2,02	3,80E-02	-1,14	3,50E-01	-2,43	2,99E-02	LMNA / IGHM	Mezcla
48	2,00	1,22E-05	1,23	1,08E-02	1,20	6,81E-03	1,95	3,21E-05	HSPA1A	
54	-2,29	1,75E-05	-1,50	4,40E-04	1,50	2,64E-04	-1,02	5,55E-01	TXNDC5	
56	-2,02	1,75E-03	-1,27	5,99E-03	-1,13	1,52E-01	-1,80	4,75E-04	MX1	
65	2,17	4,79E-04	-1,41	1,55E-01	-1,46	1,73E-01	2,10	1,60E-03	ACTB	
66	-1,04	4,97E-01	1,51	5,17E-03	2,17	9,30E-05	1,39	7,82E-03	EHD1	
73	1,96	1,59E-04	1,37	1,15E-02	-1,57	2,93E-04	-1,09	2,59E-01	HLA-DRA	
74	-1,98	4,23E-03	-1,36	3,63E-04	-1,08	1,28E-01	-1,57	8,32E-06	MX1	
83	-1,17	2,57E-02	2,06	1,29E-03	1,25	2,05E-02	-1,92	1,35E-03	DDX3 / IGHM	Mezcla
101	-1,34	3,64E-03	-1,73	7,42E-04	-1,47	3,02E-03	-1,14	2,30E-02	SET	
104	-1,03	8,16E-01	-1,94	1,07E-03	-1,11	4,51E-01	1,70	5,93E-03	DDX5	
110	-1,04	7,45E-01	1,31	1,08E-02	1,91	3,29E-03	1,40	2,56E-02	TPI1	
117	1,09	2,12E-01	1,88	7,36E-03	1,66	3,58E-03	-1,04	7,14E-01	STAT5A	
124	-1,80	2,57E-03	1,55	2,57E-02	1,51	1,15E-02	-1,84	8,51E-03	WARS	
130	1,23	3,86E-02	1,62	3,97E-04	-1,12	9,22E-02	-1,47	2,27E-03	CYB5A	
132	1,28	5,48E-04	-1,13	7,57E-03	-1,80	2,97E-05	-1,24	7,33E-04	HNRNPL	
141	-1,78	2,56E-02	1,34	9,66E-04	1,50	1,10E-02	-1,59	4,20E-05	HYOU1	
147	-1,77	2,26E-03	-1,08	3,32E-01	1,20	7,44E-02	-1,36	1,47E-02	PYGB	
160	-1,20	3,24E-01	1,06	6,48E-01	1,73	4,69E-02	1,36	2,59E-02	FAH	
164	-1,72	5,86E-03	1,43	1,50E-02	1,71	4,53E-03	-1,44	2,02E-02	PACAP	
165	1,72	3,37E-04	-1,19	6,67E-02	-1,34	2,34E-03	1,52	3,20E-03	ACTB	
173	-1,63	4,77E-02	-1,21	9,51E-02	1,41	2,79E-02	1,05	8,21E-01	SFRS7	
191	1,42	1,47E-03	-1,60	5,18E-04	-1,66	5,27E-04	1,36	1,46E-03	SSBP1	
201	1,65	1,63E-05	1,05	4,50E-01	-1,45	1,05E-03	1,09	1,09E-01	UROD	
204	1,30	2,09E-03	1,62	1,16E-04	1,27	2,47E-02	1,02	4,03E-01	RNPEP	
205	1,46	1,60E-05	-1,57	1,96E-04	-1,65	1,37E-04	1,39	3,43E-05	ACADM	
234	1,16	2,29E-01	-1,17	1,81E-02	-1,61	5,47E-03	-1,18	3,81E-02	ACADM	

Se muestran coloreados los ratios significativos superiores a $\pm 1,6$. En las dos primeras comparaciones: en verde, más expresados en la línea deficiente (FA-A o FA-C) y en rojo menos expresados en la línea deficiente. En la tercera y cuarta comparación: en verde, más expresado en FA-C respecto a FA-A, y en rojo, menos expresado en FA-C respecto a FA-A. Las proteínas sombreadas en gris, no son relevantes en este estudio.

Cuatro de las proteínas (ATAD3A, CHCHD3, MX1 y ACADM) han sido identificadas en más de un punto, indicando que la proteína presenta formas distintas. En los cuatro casos, las formas presentan pequeñas variaciones en el punto isoeléctrico (pI), indicativo de modificaciones posttraduccionales tales como la fosforilación o la acetilación (Figura 46). En las proteínas ATAD3A (puntos 3 y 12), CHCHD3 (puntos 33 y 38), MX1 (puntos 45, 56 y 74) y ACADM (puntos 205 y 234), las diferencias de

expresión se muestran iguales, o con la misma tendencia, entre los distintos puntos, indicando que las diferencias, se encuentran efectivamente en la expresión y no en modificaciones postraduccionales. Para la proteína MX1 se han descrito dos sitios de fosforilación (Rikova *et al.* 2007), para CHCHD3 y ATAD3A se ha descrito un sitio de fosforilación en cada una (Nousiainen *et al.* 2006; Daub *et al.* 2008) y hasta el momento no ha sido descrito ninguna modificación postraducciona en ACADM.

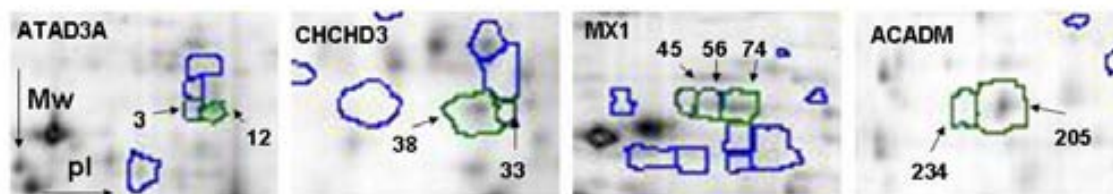


Figura 46. Proteínas detectadas en más de un punto. Presentan pequeñas variaciones en el punto isoelectrico (pI).

IV.5.2.1 Expresión diferencial de la AF

En total, se han identificado 25 proteínas distintas con expresión diferencial en alguna de las tres comparaciones realizadas o en más de una. Destaca el hecho que ninguna de las proteínas identificadas con expresión diferencial, se detecta a la vez en las dos líneas AF analizadas, a excepción de NSF y CHCHD3, pero estas se encuentran desreguladas en sentidos opuestos (más expresadas en FA-A^{-/-} y menos expresadas en FA-C^{-/-} que en sus respectivos WTs). Aún así, se detectan algunas proteínas que se expresan en el mismo sentido en las dos líneas deficientes, aunque su nivel de expresión diferencial no llega al ratio $\pm 1,6$ en alguno de los dos casos, pero que aún así, el valor de significación estadística es $<0,05$. Estas proteínas se detallan en la Tabla 25.

Tabla 25. Proteínas desreguladas en AF.

Proteína	Nombre	FA-Ar vs. FA-A ^{-/-}	FA-Cr vs. FA-C ^{-/-}
<i>Respuesta a estrés (IFN-γ)</i>			
MX1	Inducible por interferón, proteína p78	-2,16 / -2,02 / -1,98	-1,42 / -1,27 / -1,36
HSPA1A	Chaperona tipo dnaK, HSP70 1A	2,00	1,23
SET	Oncogen nuclear SET	-1,34	-1,73
RNPEP	Arginil aminopeptidasa	1,30	1,62
<i>Metabolismo oxidativo</i>			
TXNDC5	Contiene dominio tioredoxina, proteína 5	-2,29	-1,50
CYB5A	Citocromo B5A	1,23	1,62

Las proteínas que se encuentran desreguladas en ambas líneas de AF, son interesantes ya que representan rutas que pueden estar alteradas en el conjunto de los pacientes de AF, independientemente del grupo de complementación.

Las proteínas encontradas se pueden clasificar básicamente en dos grupos: (i) involucradas en la respuesta a estrés: MX1, HSPA1A, SET y posiblemente, RNPEP y (ii) involucradas en procesos de metabolismo oxidativo: TXNDC5 y CYB5A.

Dos de las proteínas se han relacionado previamente con la AF: MX1 y HSPA1A, también conocida como HSP70. Ambas proteínas actúan en respuesta a señales de estrés como por ejemplo, el IFN- γ , una conocida citoquina proapoptótica sobreexpresada en la médula ósea de pacientes de AF (Dufour *et al.* 2003). MX1 es una proteína GTPasa inducible por IFN- γ . Su sobreexpresión en líneas celulares de pacientes FA-A, -C y -D2 ha sido previamente descrita (Li y Youssoufian 1997), confirmando los resultados obtenidos el estudio de proteómica diferencial. Además, se ha descrito una posible interacción molecular directa con la proteína FANCA, mediante el sistema del doble híbrido en levadura (Reuter *et al.* 2003). HSPA1A es una chaperona que actúa protegiendo la célula de apoptosis en respuesta también a IFN- γ o TNF- α . Para ejercer dicha función, es necesaria la interacción de HSPA1A con FANCC (Pang *et al.* 2001). SET activa la producción de IFN- γ mediante la inhibición de PP2A (Trotta *et al.* 2007). La sobreexpresión de SET detectada en las líneas de AF podría explicar los niveles elevados de IFN- γ . RNPEP es una arginil aminopeptidasa poco documentada. Pertenece a la familia de las peptidasas M1 (metaloproteasas), algunas de las cuales, se conoce que presentan una regulación por varias citoquinas, entre ellas, el IFN- γ (Gabrilovac *et al.* 2004; Shin *et al.* 2007). RNPEP es capaz de hidrolizar Leucotrieno A4 en Leucotrieno B4, un importante mediador de la inflamación (Crooks y Stockley 1998; Foulon *et al.* 1999).

Dos de las proteínas participan en el metabolismo oxidativo: TXNDC5 y CYB5A. TXNDC5 contiene dos dominios activos tiol-disulfuro. Participa en la reducción de grupos tiol de determinadas proteínas, facilitando su correcto plegamiento y protegiendo de este modo las células de apoptosis en condiciones de estrés, como puede ser la hipoxia (Sullivan *et al.* 2003). La implicación en AF de otra proteína con actividad reductora de grupos tiol, la tiorredoxina (TXN) ha sido anteriormente descrita. TXN se encuentra subexpresada en células AF y su sobreexpresión disminuye el daño en el ADN causado por agentes inductores de ICLs (Ruppitsch *et al.* 1998; Kontou *et al.*

2003). CYB5A interviene en el metabolismo oxidativo de compuestos exógenos y endógenos mediante transferencia de electrones (Schenkman y Jansson 2003). Actúa modulando las reacciones catalizadas por el Citocromo P450, el cual, ha sido anteriormente implicado en AF ya que interacciona directamente con la proteína FANCG y sus niveles se encuentran incrementados en pacientes de este grupo de complementación (Futaki *et al.* 2002).

IV.5.2.2 Expresión diferencial de FA-A y de FA-C

A parte de estas 6 proteínas que podrían estar desreguladas de igual forma en las dos líneas de AF, el resto de las proteínas con expresión diferencial se encuentra en sólo una de ellas, poniendo de manifiesto que existen importantes diferencias entre los grupos de complementación. Se encontraron 12 proteínas en la comparación entre FA-A^{-/-} y WT (Tabla 26), 10 proteínas en la comparación entre FA-C^{-/-} y el WT (Tabla 27) y 11 proteínas en la comparación entre FA-A^{-/-} y FA-C^{-/-} (Tabla 28). Aparecen varias proteínas con funciones en procesos celulares que se repiten en ambas comparaciones: la respuesta a IFN- γ y los procesos de metabolismo oxidativo, ya mencionados anteriormente, y también varias proteínas mitocondriales, proteínas que participan en la regulación del transporte vesicular y proteínas de procesamiento del ARNm.

Tabla 26. Proteínas con expresión diferencial entre la línea FA-A^{-/-} y revertida.

Proteína	Nombre	FA-A ^r vs. FA-A ^{-/-}
Respuesta a estrés (IFN-γ)		
HSPA1A	Chaperona tipo dnaK, HSP70 1A	2,00
HYOU1	Sobreexpresado en hipoxia 1	-1,78
MX1	Inducible por interferón, proteína p78	-2,16 / -2,02 / -1,98
WARS	Triptofanil-tRNA sintetasa	-1,80
Metabolismo oxidativo		
TXNDC5	Contiene dominio tioredoxina, proteína 5	-2,29
Proteínas mitocondriales		
ATAD3A	ATPasa con dominio AAA, proteína 3A	-9,05 / -4,06
CHCHD3	Contiene dominio coiled-coil-helix-coiled-coil-helix, proteína 3	-2,67
Transporte vesicular		
NSF	Factor sensible a N-etilmaleimida	-1,98
Procesamiento del ARNm		
SFRS7	Factor de splicing 7, rico en Arg/Ser	-1,63
Otras		
PYGB	Glicógeno fosforilasa	-1,77
PACAP	Proteína proapoptótica adaptadora de caspasa	-1,72
UROD	Uroporfirinógeno descarboxilasa	1,65

En la comparación entre la línea FA-A y su revertida, se han detectado cuatro proteínas de respuesta a estrés: MX1, HSPA1A, HYOU1 y WARS. Las dos primeras ya han sido comentadas en el apartado anterior. HYOU1 es una proteína de la familia HSP70, a la que también pertenece HSPA1A (Brocchieri *et al.* 2008). WARS es una aminoaciltransferasa que cataliza la unión de triptófano (Trp) a su tRNA y es inducible por IFN- γ (Bange *et al.* 1992). El IFN- γ induce depleción de los niveles de Trp en la célula como mecanismo de protección contra infecciones. La inducción de WARS parece ser un mecanismo compensatorio contra la falta de Trp en la célula (Sarkar *et al.* 2007). Se detecta la proteína TXNDC5 de metabolismo oxidativo, comentada en el apartado anterior, más expresada en la línea FA-A deficiente. En esta comparación se detectan dos proteínas mitocondriales: ATAD3A y CHCHD3, ambas codificadas en el ADN nuclear. Se ha demostrado recientemente la implicación de ATAD3A en la organización del nucleoide o ADN mitocondrial (ADNmt). La subexpresión de ATAD3A en la célula permite la relajación de la estructura del ADNmt, necesario para su replicación (He *et al.* 2007; Holt *et al.* 2007). Menos se conoce de la función de CHCHD3: esta proteína se encuentra en la membrana mitocondrial y es sustrato de PKA (Schauble *et al.* 2007). Se detecta también desregulación en la proteína implicada en exocitosis, NSF, más expresada en la línea FA-A deficiente. La regulación de la liberación de citoquinas en el espacio extracelular puede ser el mecanismo que explica la relación de esta proteína con el fenotipo de las células AF. Este proceso está regulado por óxido nítrico (NO), el cuál inhibe la inflamación mediante el bloqueo de NSF (Matsushita *et al.* 2003). SFRS7 es una proteína que participa en el procesamiento del ARN y se encuentra sobreexpresada en la línea FA-A^{-/-}. Modula la expresión de determinadas proteínas mediante la regulación del proceso de *splicing* de pre-ARNm (Cavaloc *et al.* 1994). Se detecta la desregulación de tres proteínas más, implicadas en funciones celulares diversas: PYGB es una fosforilasa implicada en el metabolismo de carbohidratos, concretamente en la degradación de glicógeno, se expresa en algunos tipos de tumores, entre ellos el SCC y se relaciona con un peor pronóstico (Lee *et al.* 2006); PACAP es una proteína proapoptótica, de unión a caspasa 2 y 9 (Bonfoco *et al.* 2001), de modo que su sobreexpresión en la línea FA-A deficiente podría reflejar un índice más elevado de apoptosis en esta línea celular; y finalmente, UROD interviene en la biosíntesis del grupo hemo y porfirina (Elder y Roberts 1995). Mutaciones en este gen causan un tipo de Porfiria cutánea familiar (Kushner *et al.* 1976).

Tabla 27. Proteínas con expresión diferencial entre la línea FA-C^{-/-} y revertida.

Proteína	Nombre	FA-Cr vs. FA-C ^{-/-}
Respuesta a estrés (IFN-γ)		
RNPEP	Arginil aminopeptidasa	1,62
SET	Oncogen nuclear SET	-1,73
STAT5A	Transductor de señales y activador de la transcripción 5A	1,88
Metabolismo oxidativo		
CYB5A	Citocromo B5A	1,62
Proteínas mitocondriales		
CHCHD3	Contiene dominio coiled-coil-helix-coiled-coil-helix, proteína 3	2,92
SSBP1	Proteína de unión a ADN monocadena 1	-1,60
Transporte vesicular		
NSF	Factor sensible a N-etilmaleimida	2,34
SEC23B	Proteína homóloga a Sec23 (<i>S. Cerevisiae</i>) B	2,20
Procesamiento de ARNm		
DDX5	Polipéptido con dominio DEAD 5	-1,94
Otras		
LGALS1	Lectina de unión a galactosidasa, soluble 1	2,85

En la comparación entre la línea FA-C y su revertida, aparecen igualmente, proteínas implicadas en la respuesta a IFN- γ : RNPEP y SET, también muy probablemente desreguladas en la línea FA-A^{-/-}, y también STAT5A. Esta proteína es un factor de transcripción inducido por numerosas citoquinas (entre ellas IFN- γ) y factores de crecimiento celular, que interviene en la regulación de la proliferación y diferenciación celular, además de proteger las células de apoptosis durante el proceso de hematopoyesis (Hennighausen y Robinson 2008). Su activación es inhibida por las proteínas BRCA1 y BRCA2 (Vidarsson *et al.* 2002), reforzando su conexión con la AF, y se ha observado también un defecto de activación en células FA-C^{-/-} (Fagerlie *et al.* 2004). Aparece la proteína implicada en metabolismo oxidativo CYB5A, también subexpresada en células FA-A^{-/-}. Se encuentran también dos proteínas mitocondriales, CHCHD3, ya comentada anteriormente, aunque, en este caso, menos expresada en la línea FA-C^{-/-}, y SSBP1, una proteína de unión a ADNmt monocadena que estimula la acción de la polimerasa gamma (POLG), responsable de la replicación del ADNmt (Williams y Kaguni 1995; Li y Williams 1997). Esta proteína es sustrato de fosforilación por parte de ATM o ATR (Matsuoka *et al.* 2007), quinasas implicadas en la regulación de la respuesta al daño. Se detectan dos proteínas implicadas en el transporte vesicular: NSF, que en este caso se encuentra subexpresada en la línea FA-C^{-/-} y SEC23B, que forma parte del complejo COPII que recubre las vesículas de transporte entre el retículo endoplasmático y el aparato de Golgi (Tang *et al.* 1999). Recientemente, se ha identificado que mutaciones en el gen *SEC23B* causan anemia diseritropoyética tipo II (CDAII) caracterizada por disfunciones en la eritropoyesis y

presencia de eritrocitos multinucleados en sangre (Schwarz *et al.* 2009). Se detecta una proteína implicada en el procesamiento del ARNm, DDX5, una RNA helicasa que actúa como modulador del proceso de *splicing* y como factor de transcripción (Fuller-Pace y Ali 2008) de genes como el receptor de estrógenos α (Endoh *et al.* 1999) y p53 (Bates *et al.* 2005). Finalmente, la proteína LGALS1 se encuentra subexpresada en células FA-C^{-/-}. Los niveles de LGALS1 condicionan la proliferación y supervivencia de las células madre hematopoyéticas (Vas *et al.* 2005) y su expresión en células tumorales indica transformación maligna y diseminación (Camby *et al.* 2006).

Tabla 28. Proteínas con expresión diferencial entre la línea FA-A^{-/-} y FA-C^{-/-}.

Proteína	Nombre	FA-A ^{-/-} vs. FA-C ^{-/-}
Respuesta a estrés (IFN-γ)		
STAT5A	Transductor de señales y activador de la transcripción 5A	1,66
Proteínas mitocondriales		
ACADM	Acetil coenzima A deshidrogenasa	-1,65/-1,61
ATAD3A	ATPasa con dominio AAA, proteína 3A	10,15
CHCHD3	Contiene dominio coiled-coil-helix-coiled-coil-helix, proteína 3	2,36
SSBP1	Proteína de unión a ADN monocadena 1	-1,66
Transporte vesicular		
EHD1	Contiene dominio EH 1	2,17
Procesamiento de ARNm		
HNRNPL	Ribonucleoproteína heterogénea nuclear L	-1,80
Otras		
FAH	Fumarylacetoacetato hidrolasa	1,73
LGALS1	Lectina de unión a galactosidasa, soluble 1	2,20
PACAP	Proteína proapoptótica adaptadora de caspasa	1,71
TPI1	Triosafosfato isomerasa 1	1,91

En la Tabla 28, se muestran las proteínas que se expresan diferencialmente entre las líneas deficientes en FANCA y FANCC. La mayoría de estas proteínas ya han sido comentadas anteriormente, ya que se encuentran desreguladas en solo una de las líneas y por tanto, aparecen también en la comparación entre las dos líneas deficientes, como es el caso de STAT5A, que parece estar desregulada solo en la línea FA-C^{-/-}. El resto de proteínas de respuesta a IFN- γ no aparecen, ya que la desregulación de esta vía parece ser común en los pacientes de AF, independientemente del grupo de complementación. Todas las proteínas mitocondriales con expresión diferencial detectadas en las comparaciones entre las líneas deficientes y revertidas, muestran también una expresión diferencial entre las líneas FA-A^{-/-} y FA-C^{-/-} y además, se detecta una proteína más, ACADM, implicada en el metabolismo del acetil-CoA, paso inicial en la β -oxidación de los ácidos grasos (Frerman 1988). ACADM y SSBP1 aparecen más expresadas en la línea FA-C^{-/-}, mientras que ATAD3A y CHCHD3 aparecen más expresadas en FA-A^{-/-}.

Así pues, aunque la desregulación de proteínas mitocondriales parece ser común en las dos líneas de AF analizadas, los procesos celulares concretos implicados parecen variar entre los grupos. La proteína EHD1 se encuentra más expresada en la línea FA-A. Es una proteína involucrada en endocitosis de receptores de factores de crecimiento como IGF-R1 (Rotem-Yehudar *et al.* 2001). Aparece también otra proteína de procesamiento de ARNm, HNRNPL, una ribonucleoproteína que regula la expresión génica a partir de la regulación del proceso de *splicing* (Hui *et al.* 2003). Además, se detectan 4 proteínas que intervienen en distintos procesos: PACAP y LGALS1, ya descritas anteriormente, ambas más expresadas en FA-A^{-/-} que en FA-C^{-/-}. FAH, más expresado en FA-A^{-/-}, es una enzima implicada en el catabolismo de la tirosina, a partir de la cual se sintetizan la melanina y la hormona tiroxina. Mutaciones en FAH, causan Tirosinemia familiar tipo I, una acumulación de metabolitos hepatotóxicos que conlleva fallo hepático (Lindblad *et al.* 1977). Finalmente, la TPI es una enzima del metabolismo de la glucosa. Deficiencias en este gen producen anemia hemolítica (Vives-Corrons *et al.* 1978).

V. DISCUSIÓN

V.1. ANÁLISIS DE LA VARIABILIDAD EN LA SENSIBILIDAD CELULAR A AGENTES INDUCTORES DE ICLs.

El ensayo de fragilidad cromosómica inducida por agentes formadores de ICLs es la prueba diagnóstica de AF más utilizada en todo el mundo debido a su gran sensibilidad, aunque es considerablemente más laboriosa que otras técnicas, como puede ser el análisis del bloqueo del ciclo celular en fase G2, y además requiere personal altamente especializado. El DEB es el agente inductor de ICLs más utilizado debido a su gran estabilidad y a su elevada especificidad, ya que no se ha detectado hasta el momento otro grupo de pacientes que presente una sensibilidad al DEB comparable a la de los pacientes de AF. En este trabajo se presenta por primera vez los resultados obtenidos en este ensayo en la población española, realizado de forma sistemática y en condiciones muy controladas, de una serie larga de pacientes y individuos no AF, permitiendo así determinar la variabilidad que existe dentro de cada grupo (pacientes de AF no mosaico, pacientes de AF mosaico e individuos no AF) y establecer así, valores umbral para la categorización de los individuos, que no han sido descritos hasta el momento. Aunque la discriminación entre individuos no AF y pacientes AF no mosaico no ofrece ninguna duda, ya que los valores de cada grupo en los índices utilizados clásicamente para expresar la sensibilidad (% de células aberrantes y aberraciones/célula) son claramente distintos, la discriminación de los mosaicos no es tan clara, ya que los valores obtenidos con estos índices se solapan con los de los individuos no AF. Auerbach y colaboradores, en un estudio publicado en 1994, encontraban que el valor mínimo de aberraciones/célula detectado en un paciente FA era de 1,10, mientras que el valor máximo observado en población no AF era de 0,36, de modo que se podía establecer un valor umbral (Auerbach 1994). No obstante, la existencia de pacientes mosaico en la población, que presentan valores intermedios, desestima el uso de este índice para tal efecto: en el estudio presentado en este trabajo, vemos que el valor mínimo observado en la población de pacientes AF (incluyendo mosaicos) es de 0,31 aberraciones/célula, dentro del rango descrito para la población no AF. Además, usando el valor umbral de 1,10 aberraciones/célula, se hubiera obtenido un 14% de falsos negativos entre los pacientes incluidos en este trabajo. Así pues, para la discriminación de los pacientes AF

mosaicos, es imprescindible la utilización de un índice que integre el número de células aberrantes y el número de aberraciones observadas en estas células. Para ello, se ha creado el índice CFI, mediante el cuál es posible establecer un valor umbral entre las dos poblaciones. Este valor umbral es $CFI=40$, pues valores de $CFI<40$ indican que el individuo no padece AF. Los pacientes AF mosaicos y no mosaicos, presentan valores de $CFI>54$. Este índice puede ser utilizado como referencia en la categorización de los pacientes también en otros laboratorios. La distinción entre pacientes AF mosaico y AF no mosaico es más comprometida, ya que la reversión es un proceso dinámico y el grado de colonización por parte de las células revertidas en el momento del ensayo puede ser variable. Auerbach y colaboradores, el laboratorio pionero y con más experiencia en el ensayo de fragilidad inducida por DEB del mundo, utilizan el valor de 50% de células aberrantes como el límite divisorio entre pacientes mosaico y no mosaico (Auerbach 2009). En el análisis realizado en nuestra población, se ha utilizado un criterio más conservador, considerando mosaico, aquellos pacientes de AF con un valor de células aberrantes no superior al 40% (asegurando así, que los pacientes incluidos en el grupo de AF mosaicos pertenecen invariablemente a esta categoría). Aplicando este criterio, en nuestra población se ha detectado un 18% de pacientes mosaico, mientras que aplicando el criterio de porcentaje de células aberrantes $\leq 50\%$ la frecuencia llegaría a ser del 23%, coincidiendo con las frecuencias reportadas en otras poblaciones del mundo (15-25%) (Lo Ten Foe *et al.* 1997; Soulier *et al.* 2005). En nuestro estudio, aquellos pacientes con un porcentaje de células aberrantes entre un 40 y 60% son considerados posible mosaico. En estos casos, se requiere más información del paciente para determinar su condición de paciente mosaico o no mosaico: la viabilidad a MMC, la evolución de los recuentos hematopoyéticos o la repetición del ensayo de fragilidad cromosómica unos años después son algunas de las herramientas que permiten detectar si el mosaicismo ha progresado. En los casos de pacientes AF mosaico dudoso encontrados en este estudio, los datos de viabilidad a MMC no han aportado indicación de que puedan o no tratarse de pacientes mosaico, ya que se ha detectado que solo aquellos pacientes con más de un 80% de células revertidas presentan invariablemente resistencia a la MMC. Los datos de evolución hematológica pueden ser determinantes en la categorización de estos pacientes.

La presencia de figuras (estructuras tri- o tetra-radiales) en las células después del tratamiento con DEB, se usa muchos laboratorios como criterio indicativo de AF. En nuestra serie de 100 individuos no AF analizados, se han detectado 3 individuos que

presentaban una célula con una figura, es decir, que aunque la presencia de figuras es muy rara en un individuo no AF, la detección de una figura no es necesariamente indicativo de AF.

La primera descripción de la AF como un síndrome de inestabilidad genómica fue realizado en condiciones basales, es decir, sin tratamiento de las células con agentes inductores de ICLs (Schroeder 1966). Así pues, la AF siempre ha sido considerada un síndrome con inestabilidad cromosómica espontánea. En el análisis realizado en los individuos de nuestra población, se observa que aunque conjuntamente, los pacientes de AF presentan valores de fragilidad espontánea más elevados, un 54% de los pacientes de AF (no mosaicos) presentan valores medios incluidos dentro del rango observado en la población de individuos no AF, es decir, más de la mitad de los pacientes de AF no presentan fragilidad cromosómica espontánea. Así pues, la fragilidad cromosómica espontánea no puede usarse como ensayo diagnóstico de AF.

Dentro del grupo de pacientes de AF hemos determinado que existe una gran variabilidad en cuanto a la sensibilidad al DEB, MMC o fragilidad espontánea. Aunque es bien conocido que los pacientes de AF son muy sensibles a los ICLs, también se ha propuesto que otros tipos de daño, como el daño oxidativo acumulado en las células AF, podría ser el responsable del fenotipo celular observado. La MMC, además de la capacidad de formar ICLs, también es un potente inductor de ROS en ambientes oxidantes, por lo que el mecanismo de la generación del daño en las células de AF, en respuesta al DEB y a la MMC podría no ser el mismo. La causa de la fragilidad cromosómica espontánea no ha sido tampoco concretada hasta el momento. Los factores que modulan la sensibilidad de los pacientes a estos agentes son ampliamente desconocidos, aunque sí se ha determinado que, por ejemplo, polimorfismos en la enzima GSTT1, implicada en la detoxificación del DEB, modulan la sensibilidad a este agente (Davies *et al.* 2005). Hemos determinado que existe una buena correlación entre la sensibilidad al DEB y a la MMC, es decir, que en general, aquellos pacientes que presentan una mayor sensibilidad cromosómica al DEB, también presentan una mayor sensibilidad celular a la MMC. Este dato nos indica que el mecanismo principal de generación de daño en estas células por parte de ambos agentes es el mismo, y que la sensibilidad a DEB y MMC está mayoritariamente modulada por los mismos factores. La contribución de otros factores que actúan específicamente sobre el DEB o la MMC, como podría ser la enzima GSTT1, es por tanto, minoritaria. Del mismo modo,

detectamos también una correlación positiva entre la sensibilidad al DEB y la fragilidad cromosómica espontánea, indicando que el daño que se produce en las células de los pacientes de forma espontánea se debe en gran medida, a la formación de horquillas de replicación bloqueadas que no pueden ser reparadas, probablemente generadas endógenamente por metabolitos capaces de reaccionar con el ADN. Las correlaciones positivas entre sensibilidad al DEB, MMC y fragilidad espontánea, indican pues, que los tres índices reflejan la capacidad de reparación de horquillas de replicación bloqueadas en la célula.

V.2. CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE LA POBLACIÓN ESPAÑOLA DE AF

La implantación de una estrategia de subtipaje, comentada en los resultados de este trabajo y en el Anexo 5 (Casado *et al.* 2007), coordinada desde el grupo del Dr. Bueren en el CIEMAT (Madrid) ha permitido determinar el subtipo del 92% de los pacientes de AF españoles de etnia caucásica analizados hasta la fecha. En el Anexo 5, publicado en el año 2007, se presentan las frecuencias de cada grupo de complementación, a partir del estudio realizado en 73 familias caucásicas. En este trabajo, se presentan los resultados actualizados, con un total 91 familias incluidas. En la población española, cerca del 80% de los pacientes pertenecen al grupo de complementación FA-A. La gran prevalencia de este grupo es típica de las poblaciones mediterráneas, como Italia o Tunicia (Savoia *et al.* 1996; Bouchlaka *et al.* 2003), y también se refleja en las poblaciones de América del Sur como la brasileña (Magdalena *et al.* 2005), enfatizando la proximidad que existe entre estas poblaciones. Así pues, el 78% de los pacientes se han subtipado mediante complementación retroviral con los genes *FANCA/C/G* en la primera etapa del estudio. El 22% restante pertenece a grupos de complementación minoritarios o a pacientes en los que la complementación retroviral no ha funcionado. De este 22% (21 pacientes), 2 de ellos han sido subtipados también por complementación retroviral en una segunda ronda (pacientes FA-E), pero en la mayoría de los casos se requiere el uso de técnicas alternativas de determinación del subtipo: 4 pacientes FA-D2 han sido subtipados mediante WB y un 6 directamente por análisis

mutacional (2 FA-A, 1 FA-E, 1 FA-D1 y 2 FA-J), de modo que estas técnicas han permitido el subtipaje de un 10% de los pacientes españoles caucásicos más. En 8 pacientes, el subtipo no ha podido ser determinado hasta el momento. Todos ellos pertenecen a grupos de complementación minoritarios, ya que se han descartado los grupos más frecuentes. El subtipo ha podido ser aproximado mediante análisis de la activación de FANCD2 en 4 de ellos (en los 4 restantes no se dispone de línea celular para la realización del estudio) y actualmente se está realizando el análisis mutacional de los genes que aún quedan por analizar. Así pues, el WB y el análisis mutacional representan la principal vía de subtipaje de los pacientes que pertenecen a grupos de complementación minoritarios, complementando así los estudios de subtipaje genético mediante complementación retroviral. Finalmente, se ha determinado la existencia de dos pacientes que no presentan mutaciones en ninguno de los 12 genes FA identificados hasta el momento y que muestran monoubiquitinación normal de FANCD2, por lo que el defecto de estos pacientes, se debe a un gen que actúa por debajo de este punto de la ruta. La caracterización de líneas celulares de pacientes de AF que no presentan mutaciones en ninguno de los genes conocidos, es fundamental para la identificación de los genes FA aún por determinar, uno de los objetivos prioritarios en la investigación actual de la enfermedad y también el objetivo de varios proyectos que se han realizado y se están realizando en nuestro grupo. El conocimiento del gen mutado permitirá comprender mejor el defecto molecular subyacente y la posibilidad de desarrollar nuevas terapias, así como facilitar el diagnóstico en los pacientes pertenecientes a este grupo de complementación.

Una vez completado el subtipaje genético, el análisis mutacional es el último paso en la caracterización de la población española de pacientes de AF. El conocimiento del espectro mutacional de la población, permite desarrollar metodologías para la detección de las mutaciones más frecuentes y agilizar el análisis, reduciendo así considerablemente el tiempo de espera para las familias, muy importante sobretodo en casos de necesidad de diagnóstico prenatal o preimplantacional. Se ha realizado el análisis mutacional de un total de 82 pacientes, la mayoría de los cuales, pertenecen al grupo de complementación FA-A, obteniendo así una visión muy completa del espectro mutacional de la población para este gen. El espectro mutacional de la etnia gitana y caucásica es totalmente distinto, por lo que el conocimiento previo de la etnia de los pacientes es indispensable para acelerar el análisis mutacional. En la etnia gitana, la

gran mayoría de los pacientes presentan la mutación puntual en el exón 4 (c.295C>T) típica de esta población (Callen *et al.* 2005), aunque se ha encontrado un paciente con una delección en los exones 4-6 en homocigosis. Así pues, la no detección de la mutación c.295C>T en un paciente español de etnia gitana no implica directamente un diagnóstico negativo para AF, ya que se pueden presentar otras mutaciones, aunque en una frecuencia muy baja. La mutación c.295C>T no es exclusiva de los pacientes españoles ya que se ha detectado también en todos los pacientes de AF de etnia gitana de Portugal analizados, indicando que existe una estrecha relación entre ambas poblaciones y que dicha mutación es propia de la península Ibérica ya que no se ha detectado en pacientes gitanos originarios de otros países.

El espectro mutacional de la etnia caucásica revela, como es de esperar, una heterogeneidad de mutaciones mucho más elevada. En el gen *FANCA* se han detectado 50 mutaciones distintas. De estas 50, casi la mitad corresponden a mutaciones que no habían sido descritas anteriormente en ninguna otra población, por lo que la aportación de nuevas mutaciones por parte del análisis realizado en nuestra población es importante. Aunque muchas de las mutaciones encontradas son propias de una única familia, destacan por su elevada frecuencia en nuestra población, 3 mutaciones puntuales en el exón 13, 36 y 38. Estas 3 mutaciones ya habían sido descritas anteriormente, y son las tres mutaciones más frecuentes del mundo (ver FA mutation database). Se encuentra también una frecuencia elevada de delecciones intragénicas, un 15%, parecido a los valores encontrados en otras poblaciones como la Japonesa (Yagasaki *et al.* 2004) o la Italiana (Savino *et al.* 2003), aunque muy inferior al 40% detectado en las poblaciones del norte de Europa (Morgan *et al.* 1999).

La información obtenida en este estudio ha permitido la elaboración de un protocolo de trabajo que permite reducir considerablemente el coste económico y el tiempo necesario para realizar el análisis mutacional de los pacientes españoles. Esta estrategia consta de tres fases. En la primera fase del protocolo propuesto para el análisis mutacional de pacientes españoles, la realización del MLPA para la detección de grandes delecciones y la secuenciación de solo 3 de los 43 exones de *FANCA* (exones 13, 36 y 38) permite la identificación de 2 de cada 3 mutaciones en este gen. En la segunda fase, se realizan 15 secuenciaciones, detectando hasta el 92% de las mutaciones. En un 8% de los casos, se requiere la secuenciación de 8 exones más, completando la tercera fase del análisis. La primera fase sería también válida para detectar la mayoría de mutaciones de otras poblaciones. No obstante, para una mayor eficacia, el orden de análisis de los demás

exones debe ser determinado a partir del espectro mutacional de cada población, ya que pueden existir diferencias considerables.

Las mutaciones encontradas hasta el momento en los pacientes pertenecientes a otros grupos de complementación muestran que existe también en estos genes un espectro mutacional amplio dentro de la población española. Se ha detectado una elevada proporción de mutaciones nuevas (10/19), como ocurre también en el caso de *FANCA*. De particular relevancia son las mutaciones detectadas en los genes *FANCD1/BRCA2* y *FANCI*, ya que confieren, en los familiares portadores, un incremento del riesgo de desarrollar un cáncer de mama/ovario. La detección de la mutación permite incidir, pues, en el control y por consiguiente en el diagnóstico precoz, de estos individuos.

Entre todas las mutaciones encontradas en pacientes españoles, cinco de ellas son mutaciones de cambio de sentido (cuatro en *FANCA* y una en *FANCC*). La patogenicidad de estas mutaciones ha sido validada mediante análisis *in silico* utilizando distintos algoritmos de predicción de efecto de la variante. En cuatro de los casos los tres algoritmos aplicados, teniendo en cuenta el análisis de la diferencia de propiedades entre los aminoácidos y la conservación de la posición en la evolución, coinciden en que el cambio tiene consecuencias para la funcionalidad de la proteína. En uno de los casos, aunque la posición es conservada, el aminoácido incorporado es muy parecido al de la secuencia WT, por lo que el análisis *in silico* no es concluyente. En este caso, el hecho de detectar la mutación en tres pacientes distintos, confirma su patogenicidad. Así pues, estos resultados indican que los residuos en *FANCA*: p.L274, p.C625, p.Q742, p.L1305 y en *FANCC*: p.L386 son importantes para la funcionalidad de la proteína.

La mutación c.3788_3790delTCT en el gen *FANCA* es la más frecuente en la población española y también en muchas otras poblaciones del mundo. Es particularmente frecuente en la población de Brasil y también muy común en otras poblaciones de origen caucásico o latino, aunque también se ha detectado en poblaciones más alejadas como en Nigeria o en Pakistán. Dentro de España, se ha detectado un efecto fundador de esta mutación en la isla de La Palma, debido al cual, esta población presenta la frecuencia más elevada de AF del mundo (1 paciente por cada 16000 habitantes), superior incluso al de la población gitana española, que se calcula de 1 paciente por cada 18000. Mediante análisis del haplotipo asociado a dicha mutación se ha podido determinar que todos los pacientes analizados de poblaciones de Europa, América del Norte, América del Sur y Pakistán comparten el mismo alelo ancestral. Solo en el caso

del paciente nigeriano se ha detectado un haplotipo distinto. Así pues, la gran dispersión de la mutación en *FANCA* más frecuente del mundo, no se debe a que el sitio de la mutación constituye un “hot-spot” mutacional, si no a que se trata de una mutación muy ancestral que se ha difundido por el continente asiático, europeo y americano, por estar asociada a poblaciones que han experimentado flujos migratorios y expansivos importantes. La mutación fue introducida en Brasil y el resto de las poblaciones de América por las poblaciones europeas, ya que en el continente africano no se detecta el haplotipo asociado a la mutación. Durante estos flujos migratorios, desde Europa hacia América, la mutación también habría sido introducida en la isla de La Palma, puerto obligatorio de tránsito durante la colonización de América del Sur.

Las deleciones intragénicas son muy comunes en el gen *FANCA*, como se ha determinado en numerosos trabajos realizados en poblaciones distintas (Morgan *et al.* 1999; Callen *et al.* 2004). Se ha demostrado también repetidamente, que el origen de las deleciones se debe, en la mayoría de los casos, a recombinaciones entre elementos *Alu* colocados en *cis* y pérdida del fragmento interno, hecho que ha sido también comprobado en las deleciones encontradas en la población española. Sin embargo, no han sido caracterizadas hasta el momento, aquellas deleciones que presentan puntos de rotura fuera del gen *FANCA*. Mediante determinación de los puntos de rotura de una de estas deleciones encontrada en dos pacientes españoles, se ha determinado, que también la recombinación entre *Alu* puede ser en estos casos el origen de las deleciones, y que los extremos de la deleción pueden estar muy alejados, en este caso, hasta 112Kb e incorporar hasta 2 genes más. En este caso, la amplificación de la zona del punto de rotura, constituye también un método muy rápido de detección de la mutación ex1-20del, útil en el análisis de portadores en familiares de los pacientes.

Aproximadamente la mitad de las mutaciones en *FANCA* encontradas en los pacientes españoles son mutaciones no truncadoras, la mayoría mutaciones de cambio de sentido y también microinserciones/microdeleciones que no afectan el marco de lectura, las cuales se encuentran repartidas a lo largo de todo el gen. El estudio de la funcionalidad de la proteína en estos mutantes representa un modo de localizar dentro de la estructura de *FANCA* dominios que desarrollan funciones particulares, aunque hasta el momento, no se han descrito dominios funcionales, más allá del NLS y residuos de fosforilación (Lightfoot *et al.* 1999; Collins *et al.* 2009). El estudio llevado a cabo ha revelado que todas las mutaciones no truncadoras analizadas, independientemente de cuál sea su ubicación dentro del gen, permiten la expresión de una proteína con una estabilidad muy

parecida a la de la proteína WT. En ningún caso se detecta activación residual de la ruta FA/BRCA, por lo que ninguna de ellas tiene carácter hipomórfico. Finalmente, ninguna de las formas analizadas es capaz de localizar en el núcleo celular, acción imprescindible para la función de FANCA en la reparación del daño en el ADN, aún si ninguna de las mutaciones estudiadas afecta directamente el NLS, coincidiendo con los resultados previos publicados en otros estudios (Garcia-Higuera *et al.* 2000; Adachi *et al.* 2002). Una posible interpretación del hecho que todas las mutaciones analizadas conlleven consecuencias iguales para la funcionalidad de la proteína, es que la conformación tridimensional de la proteína podría verse afectada, impidiendo el reconocimiento del NLS. Debido a que todas las mutaciones no truncadoras presentan las mismas consecuencias funcionales, al menos en lo que se refiere a la reparación del daño en el ADN, el tipo de mutación, más allá de si permite o no la expresión de la proteína, no explica la variabilidad que existe entre pacientes en la sensibilidad celular a los ICLs (marcador de la capacidad de reparación de la célula). Dentro de los pacientes que presentan mutaciones no truncadoras, la única diferencia observada que podría ser causa de variabilidad es la cantidad de proteína FANCA, en función de si se expresa desde uno o dos alelos, ya que se ha detectado una correspondencia entre la cantidad de proteína en la célula y la dosis génica.

El WB de la proteína FANCA en líneas de pacientes puede ser útil en la aproximación del subtipaje genético en los casos donde no hay expresión de la proteína, en nuestra población, el 60% de los pacientes FA-A. En los casos donde no se detecta expresión de la proteína, el subtipo se reduce a los genes *FANCA* o *FANCG*, ya que la presencia de la proteína FANCG es necesaria para la estabilización de FANCA (Garcia-Higuera *et al.* 2000).

V.3. CAUSAS DE VARIABILIDAD EN LA SENSIBILIDAD CELULAR A ICLs EN LOS PACIENTES DE AF

La caracterización de la población española a nivel de subtipaje y de análisis mutacional, así como los estudios moleculares del tipo de mutación permiten realizar estudios sobre el efecto de la variabilidad dentro de los propios genes FA en la sensibilidad celular a los ICLs, evaluada mediante la sensibilidad al DEB, MMC o

fragilidad espontánea. Debido a la gran prevalencia de FA-A, la población española no es el mejor modelo para el estudio del efecto del grupo de complementación, ya que se cuenta con un número reducido de pacientes en los grupos de complementación minoritarios, aunque por otro lado, favorece el estudio sobre el efecto del tipo de mutación ya que permite disponer de una mayor población con mutaciones en el mismo gen. Los resultados obtenidos hasta el momento muestran que los pacientes FA-A junto con los FA-D2, presentan una menor sensibilidad al DEB, y en menor grado a la MMC, que los pacientes pertenecientes a los grupos FA-D1, FA-E, FA-G y FA-J. La menor sensibilidad de los pacientes FA-D2 podría explicarse por la presencia de mutaciones hipomórficas obligadas en los pacientes de este grupo de complementación (Kalb *et al.* 2007), que podría traducirse en la posibilidad de reparar correctamente un porcentaje bajo de las lesiones en el ADN. De este dato se desprende que mutaciones truncadoras en ambos alelos del gen *FANCD2* resultan letales para el embrión. Hemos comprobado también, que mutaciones bialélicas en el gen *FANCD1/BRCA2* conllevan una letalidad embrionaria elevada, ya que la frecuencia de nacimientos con mutaciones biálelicas en *BRCA2* es de 1/1000000 (calculado a partir de la frecuencia de portadores en la población general), por lo que en España se esperarían 40 casos y hasta el momento solo se ha detectado 1, el cual, nació además extremadamente polimalformado y se habían producido abortos repetidos previamente en el matrimonio. El tipo de mutación en este gen parece condicionar de forma importante la viabilidad en etapa embrionaria, ya que se ha detectado que ninguno de los pacientes FA-D1 descritos hasta el momento presenta mutaciones bialélicas que afectan el exón 11 del gen (zona de repeticiones BRC, de unión a RAD51), por lo que la presencia de una proteína que contenga esta región es crítica para la viabilidad del embrión (Neveling *et al.* 2009). Asimismo, el ratón deficiente en *BRCA2* es embrioletal (Sharan *et al.* 1997), mientras que solo la expresión de una forma hipomórfica permite el desarrollo embrionario aunque los ratones presentan una elevada incidencia de tumores (McAllister *et al.* 2002) y disfunción hematopoyética (Navarro *et al.* 2006). La elevada fragilidad cromosómica espontánea podría explicar la letalidad embrionaria detectada en los individuos con mutaciones bialélicas en el gen *BRCA2*. Esta elevada fragilidad espontánea ha sido descrita anteriormente en otros pacientes FA-D1 (Hirsch *et al.* 2004) aunque según Auerbach y colaboradores, la fragilidad espontánea de estos pacientes se encuentra dentro de los límites observados para los pacientes de otros grupos de complementación

(Wagner *et al.* 2004), por lo que podría no observarse en todos los pacientes o podría depender del tipo de mutación.

No ha sido determinada la frecuencia de portadores de mutaciones en otros genes FA en la población general, por lo que no es posible determinar si la letalidad embrionaria se asocia, en mayor o menor grado, a mutaciones bialélicas en los demás genes FA en humanos. Aún así, los ratones deficientes para los genes *FANCA*, *FANCC*, *FANCD2* y *FANCG* son viables, aunque en los ratones FA-C^{-/-} y FA-D2^{-/-} se detecta una frecuencia de nacimientos de ratones “*knock-out*” inferior a la esperada por mendelismo (Parmar *et al.* 2009), indicando que la deficiencia de estos genes no condiciona de forma tan importante la viabilidad embrionaria como en el caso de *BRCA2*. Así pues, es posible especular que la mayor prevalencia del grupo FA-A se deba, no sólo a un mayor número de portadores en la población, si no a una menor sensibilidad a ICLs en los pacientes con mutaciones en este gen, y en consiguiente, a una menor letalidad embrionaria.

Dentro de los pacientes FA-A, el tipo de mutación no parece explicar, al menos en gran parte, las variaciones en la sensibilidad a los ICLs, ya que no se han detectado diferencias significativas entre los grupos de pacientes con distinto tipo de mutación. Así pues, mientras que el grupo de complementación puede tener un efecto en la determinación de la sensibilidad celular de los pacientes a los ICLs, el efecto del tipo de mutación es inexistente o poco relevante, siempre que no sean mutaciones hipomórficas, que permiten una mínima funcionalidad de la ruta FA/BRCA de reparación de los ICLs, como sucede en el caso de los pacientes FA-D2 o de la mutación común en *FANCC* c.67delG (Yamashita *et al.* 1996). La menor sensibilidad de los pacientes FA-A, junto con la letalidad de mutaciones bialélicas truncadoras en FA-D2 o FA-D1 concuerdan con el modelo propuesto de la ruta FA/BRCA en que los genes que actúan más abajo en la ruta presentan más funciones, tanto en la reparación del daño como en otros procesos celulares, y por tanto, mutaciones en estos genes tienen consecuencias más graves para la viabilidad celular (Lyakhovich y Surralles 2007). Las proteínas FANCE y FANCG forman parte del complejo FA, y sin embargo, en los pacientes con mutaciones en estos genes, se ha detectado una sensibilidad mayor que la de los pacientes FA-A. Este hecho podría ser explicado por la implicación de estas proteínas también en etapas posteriores del proceso de reparación, ya que se ha descrito una interacción directa entre FANCG y BRCA2 (Hussain *et al.* 2003) aunque la función de dicha interacción no ha sido hasta el momento esclarecida. FANCE por otro

lado, constituye el enlace molecular entre FANCD2 y el complejo FA (Pace *et al.* 2002) y también se ha descrito la asociación de FANCE y BRCA2 en la cromatina (Wang *et al.* 2004). La fosforilación de FANCE por parte de CHK1, quinasa implicada en la regulación del punto de control de fase S, podría indicar también otras funciones de FANCE en el control de la progresión del ciclo celular y la reparación, independientes de la monoubiquitinación de FANCD2 (Wang *et al.* 2007).

V.4. VARIABILIDAD EN LA SEVERIDAD DEL FENOTIPO CLÍNICO

Las bases moleculares que causan el fenotipo clínico de los pacientes de AF son aún hoy en día motivo de controversia entre la comunidad científica. La gran toxicidad de los ICLs en las células AF podrían explicar las deficiencias en la proliferación celular de los progenitores hematopoyéticos de la médula ósea, las malformaciones congénitas y la predisposición al cáncer, aunque queda por resolver el origen de los ICLs en las células de forma endógena. El daño oxidativo, las disfunciones teloméricas o el estrés replicativo también podrían explicar una parte o la totalidad del fenotipo (Bogliolo *et al.* 2002). En este trabajo, se ha detectado una correlación positiva entre la sensibilidad al DEB y MMC y el número de malformaciones congénitas que presentan los pacientes de AF. Este dato indica que la incapacidad de reparar horquillas de replicación bloqueadas, y como consecuencia, la elevada apoptosis celular en fases del desarrollo embrionario, es con mucha probabilidad, la causa principal de las malformaciones observadas en los pacientes. Los genes implicados en la reparación del ADN parecen tener una función determinante durante el desarrollo embrionario, ya que las malformaciones congénitas son características de un elevado número de síndromes de inestabilidad cromosómica, como el síndrome de Cockayne, síndrome de Nijmegen o síndrome de Seckel (Hales 2005). Además, en el trabajo mostrado en el Anexo 3 (Raya *et al.* 2009), se pone de manifiesto que la ausencia de la proteína FANCA compromete enormemente en la viabilidad de las células pluripotentes, probablemente, debido a un mayor control de la integridad del ADN celular en este tipo de células y a una propensión a la apoptosis en caso de detectarse un mínimo daño genético (Marion *et al.* 2009).

Por otro lado, no se ha detectado correlación entre la sensibilidad celular a los ICLs y la edad de aparición del fallo medular. Las células progenitoras de la médula ósea son muy sensibles a citoquinas pro-apoptóticas expresadas en la médula en condiciones de estrés, por lo que su viabilidad podría estar regulada por otros factores paralelos a la reparación del ADN. Por tanto, los resultados obtenidos indican que la diversidad de síntomas observados en los pacientes de AF tiene desencadenantes distintos según el tipo de tejido, aunque la causa última, es decir la deficiencia en el gen FA, sea la misma.

La influencia del grupo de complementación en el número de malformaciones o la edad de aparición del fallo medular no ha podido ser analizado debido al bajo número de pacientes no FA-A de la población española, de los cuales se dispone de la información clínica. La correlación entre número de malformaciones y sensibilidad a los agentes inductores de ICLs indica que en aquellos grupos de complementación dónde se ha detectado una menor sensibilidad celular, se debería también apreciar un número menor de malformaciones. En nuestra población, el número medio de malformaciones de los pacientes FA-A es de 3,2, equivalente a los valores publicados en otros estudios (Faivre *et al.* 2000). En el estudio de asociación de marcadores genéticos asociados a severidad clínica realizada en 245 pacientes de diferentes países europeos, determinan que el grupo de pacientes FA-A es el que presenta menor número de malformaciones congénitas junto con FA-C, coincidiendo con los resultados obtenidos en este trabajo (Faivre *et al.* 2000).

No se ha detectado asociación entre el tipo de mutación en *FANCA* y los marcadores de severidad clínica. Aunque en un estudio anterior se había detectado que los pacientes que presentan mutaciones truncadoras bialélicas presentaban fallo medular a una edad más temprana (Faivre *et al.* 2000), este efecto no ha sido confirmado en el estudio realizado en nuestra población, por lo que el tipo de mutación puede no tener valor pronóstico en cuanto a la determinación de la progresión de la enfermedad.

V.5. DETERMINACIÓN DE PROCESOS CELULARES DESREGULADOS EN LAS CÉLULAS AF

El análisis de la variabilidad en el fenotipo clínico realizado en este estudio y también en otros estudios realizados en poblaciones con un mayor número de pacientes de AF

revela que la variabilidad dentro de los genes FA tiene poca repercusión en el fenotipo clínico de los pacientes. También hemos visto que el número de malformaciones congénitas parece estar directamente relacionado con la capacidad de reparación de los ICLs, pero no así la edad en la que aparece el fallo medular, por lo que las proteínas FA parecen estar implicadas en otros procesos celulares independientes de la reparación del daño, que podrían explicar parte del fenotipo clínico de los pacientes y plantear opciones para nuevas terapias. En este estudio se han detectado 90 proteínas desreguladas en las líneas FA, del total de 2500 proteínas que la técnica empleada nos permite detectada. De este dato se desprende que el defecto en un gen FA altera la expresión de hasta un 3,6% del total de proteínas expresadas en la célula. De estas 90, se han podido identificar 25 que muestran una expresión distinta en las líneas FA-A y/o FA-C deficientes con la misma línea revertida espontáneamente. Seis de ellas muestran una desregulación parecida en ambas líneas deficientes, por lo que podrían estar implicadas en procesos desregulados comunes en todos los pacientes de AF, pero la mayoría de proteínas se han detectado en solo uno de los subtipos indicando que existen diferencias importantes entre grupos de complementación. De las proteínas encontradas, dos de ellas: MX1 y HSPA1A han sido relacionadas con la AF anteriormente, validando así la metodología aplicada para detectar las diferencias de expresión. La mayoría de las proteínas encontradas presentan funciones conocidas en 5 procesos celulares concretos: respuesta a inflamación (mediada por IFN- γ), metabolismo oxidativo, proteínas mitocondriales, transporte vesicular o procesamiento del ARNm, indicando que las proteínas FA podrían participar en la regulación de estos procesos. La sobreproducción de la citoquina pro-apoptótica IFN- γ en las células AF es bien conocida (Dufour *et al.* 2003), por lo que muchas de las proteínas detectadas, como MX1, WARS o HYOU, están implicadas en la protección de la célula de los elevados niveles de IFN- γ . SET, por lo contrario, está implicado directamente en la producción de esta citoquina, por lo que los niveles elevados de SET podrían ser la causa de la sobreproducción de IFN- γ . La implicación de las proteínas FA en procesos de metabolismo oxidativo también ha sido apuntado anteriormente mediante la descripción de interacciones moleculares directas entre proteínas FA y proteínas implicadas en procesos de oxidación-reducción, como NADPH citocromo P450 reductasa (Kruyt *et al.* 1998), GSTP1 (Cumming *et al.* 2001) y CYP2E1 (Futaki *et al.* 2002). Tanto la sobreproducción de citoquinas pro-apoptóticas en la médula ósea de los pacientes, como la desregulación del metabolismo oxidativo

celular pueden explicar parte del fenotipo observado en los pacientes. Las citoquinas pro-apoptóticas afectan la proliferación de las células madre hematopoyéticas que causa el fallo medular (Dufour *et al.* 2003), por lo que se ha propuesto la utilización de terapias basadas en la supresión de citoquinas como el TNF- α como método para mitigar el fallo medular en los pacientes, aunque la utilización de este tipo de terapia, basada en la inhibición de la apoptosis, es discutida debido a que podría favorecer la aparición del cáncer, como ocurre en el modelo murino doble deficiente en *FANCD2* y *p53* (Houghtaling *et al.* 2005). De igual manera, el metabolismo oxidativo permite la eliminación de xenobióticos que pueden causar daño en el ADN. El desequilibrio en procesos redox genera ROS en las células, las cuales, han sido directamente relacionado con el fallo medular (Smith 1996; Umegaki *et al.* 2001) y la *diabetes mellitus* tipo II (Sheader *et al.* 2001; Vlassara y Palace 2002), frecuente en pacientes de AF. También se han detectado varias proteínas mitocondriales desreguladas. La mitocondria interviene en el mantenimiento del equilibrio redox, por lo que las proteínas detectadas podrían tener relación también con el estado pro-oxidativo de las células AF. Finalmente, la relación entre las proteínas FA y las funciones de transporte vesicular y procesamiento de ARNm no ha sido hasta el momento investigada, aunque en un estudio de interacción mediante el sistema de doble híbrido, se identificaron varias proteínas con estas funciones interaccionando con las proteínas FANCA, FANCC o FANCG (Reuter *et al.* 2003). Nuestro estudio refuerza, por tanto, la implicación de las proteínas FA en estos procesos celulares. Además, las proteínas detectadas en este estudio pueden constituir posibles dianas terapéuticas para mitigar el fenotipo clínico, de un modo similar al que se ha observado reduciendo los niveles de oxígeno (Joenje *et al.* 1981) o inhibiendo la acción de TNF- α (Milsom *et al.* 2009).

VI.CONCLUSIONES

1. En el diagnóstico de pacientes de AF mediante fragilidad cromosómica inducida por DEB, el índice CFI, que integra el porcentaje de células aberrantes y el número de aberraciones por célula multiaberrante, permite establecer un valor umbral entre individuos no AF y pacientes de AF (mosaicos y no mosaicos).
2. El 54% de los pacientes de AF no presentan valores de fragilidad cromosómica espontánea superiores a los de la población de individuos no AF, por lo que la fragilidad espontánea no es útil en el diagnóstico. La presencia de figuras cromosómicas tampoco es exclusiva de la población AF.
3. Existe una correlación positiva entre sensibilidad al DEB, a la MMC y la fragilidad espontánea en los pacientes de AF, por lo que los tres índices reflejan la capacidad de reparación de horquillas de replicación bloqueadas de la célula.
4. En la población española existen pacientes de AF que no pertenecen a ninguno de los grupos de complementación conocidos, lo que indica la presencia de al menos, un gen FA adicional, potencialmente implicado en la susceptibilidad al cáncer de mama.
5. La mutación en *FANCA* c.295C>T, inicialmente descrita en la población de AF gitana española, también se encuentra en todos los pacientes portugueses analizados, aunque no es la única mutación de esta etnia.
6. Las grandes deleciones y mutaciones puntuales en los exones 13, 36 y 38 representan el 59% de todas las mutaciones en *FANCA* encontradas en la población española caucásica. En base al espectro mutacional, se ha creado un protocolo de trabajo que permite detectar las mutaciones en este gen de una manera rápida y eficaz.
7. El análisis del haplotipo asociado a la mutación en *FANCA* más frecuente en España y en el mundo, c.3788_3790delTCT, muestra que todos los pacientes, a excepción de un paciente de Nigeria, comparten un mismo alelo ancestral, descartando que la elevada frecuencia y dispersión de esta mutación se deba a

- que el sitio de la mutación corresponde a un “hot-spot” mutacional. Se ha detectado un efecto fundacional de esta mutación en la isla de La Palma.
8. La gran mayoría de deleciones intragénicas, incluidas aquellas que presentan un extremo de la deleción fuera del gen *FANCA* están causadas por recombinación entre elementos *Alu* situados en *cis*, que pueden estar a más de 100Kb de distancia y abarcar más genes.
 9. Las mutaciones no truncadoras en el gen *FANCA* causan el mismo efecto sobre la funcionalidad de la proteína, independientemente del sitio de la mutación: no causan una desestabilización importante de la proteína, en ningún caso se ha detectado carácter hipomórfico respecto a la activación de la ruta FA/BRCA y no permiten la localización nuclear de FANCA.
 10. Los pacientes de los grupos de complementación FA-A y FA-D2 parecen ser menos sensibles a los ICLs que los pacientes FA-D1, FA-E, FA-G y FA-J. El tipo de mutación (truncadora/no truncadora) en *FANCA* no parece condicionar de forma importante esta sensibilidad.
 11. La incapacidad de reparar horquillas de replicación bloqueadas parece ser el causante directo de las malformaciones de los pacientes, mientras que no es así con la edad de aparición del fallo medular, indicando que otros factores independientes de la reparación tienen un efecto relevante en la evolución hematológica.
 12. En la determinación de correlaciones genotipo-fenotipo, el tipo de mutación en *FANCA* no explica de forma relevante el número de malformaciones o la edad de aparición de fallo medular de los pacientes.
 13. Las proteínas FA parecen estar implicadas en la respuesta a IFN- γ , metabolismo oxidativo, biología mitocondrial, transporte vesicular y procesamiento de ARNm. Variabilidad en genes implicados en estos procesos podría explicar la

variabilidad observada en los pacientes de AF y representar nuevas dianas terapéuticas.

VII. BIBLIOGRAFIA

- Adachi, D., T. Oda, H. Yagasaki, K. Nakasato, T. Taniguchi, A. D. D'Andrea, S. Asano y T. Yamashita (2002). "Heterogeneous activation of the Fanconi anemia pathway by patient-derived FANCA mutants." *Hum Mol Genet* **11**(25): 3125-34.
- Ali, A. M., T. R. Singh y A. R. Meetei (2009). "FANCM-FAAP24 and FANCI: FA proteins that metabolize DNA." *Mutat Res*.
- Ameziane, N., A. Errami, F. Leveille, C. Fontaine, Y. de Vries, R. M. van Spaendonk, J. P. de Winter, G. Pals y H. Joenje (2008). "Genetic subtyping of Fanconi anemia by comprehensive mutation screening." *Hum Mutat* **29**(1): 159-66.
- Auerbach, A. D. (1988). "A test for Fanconi's anemia." *Blood* **72**(1): 366-7.
- Auerbach, A. D. (1994). Diagnosis of Fanconi Anemia by Diepoxybutane Analysis. *Current Protocols in human genetics*, John Wiley & Sons, Inc.: Unit 8.7.1.
- Auerbach, A. D. (2009). "Fanconi anemia and its diagnosis." *Mutat Res* **668**(1-2): 4-10.
- Auerbach, A. D., J. Greenbaum, K. Pujara, S. D. Batish, M. A. Bitencourt, I. Kokemohr, H. Schneider, S. Lobitz, R. Pasquini, P. F. Giampietro, H. Hanenberg y O. Levran (2003). "Spectrum of sequence variation in the FANCG gene: an International Fanconi Anemia Registry (IFAR) study." *Hum Mutat* **21**(2): 158-68.
- Baer, R. y W. H. Lee (1998). "Functional domains of the BRCA1 and BRCA2 proteins." *J Mammary Gland Biol Neoplasia* **3**(4): 403-12.
- Bange, F. C., T. Flohr, U. Buwitt y E. C. Bottger (1992). "An interferon-induced protein with release factor activity is a tryptophanyl-tRNA synthetase." *FEBS Lett* **300**(2): 162-6.
- Bates, G. J., S. M. Nicol, B. J. Wilson, A. M. Jacobs, J. C. Bourdon, J. Wardrop, D. J. Gregory, D. P. Lane, N. D. Perkins y F. V. Fuller-Pace (2005). "The DEAD box protein p68: a novel transcriptional coactivator of the p53 tumour suppressor." *Embo J* **24**(3): 543-53.
- Berwick, M., J. M. Satagopan, L. Ben-Porat, A. Carlson, K. Mah, R. Henry, R. Diotti, K. Milton, K. Pujara, T. Landers, S. Dev Batish, J. Morales, D. Schindler, H. Hanenberg, R. Hromas, O. Levran y A. D. Auerbach (2007). "Genetic heterogeneity among Fanconi anemia heterozygotes and risk of cancer." *Cancer Res* **67**(19): 9591-6.
- Blom, E., H. J. van de Vrugt, Y. de Vries, J. P. de Winter, F. Arwert y H. Joenje (2004). "Multiple TPR motifs characterize the Fanconi anemia FANCG protein." *DNA Repair (Amst)* **3**(1): 77-84.
- Bogliolo, M., O. Cabre, E. Callen, V. Castillo, A. Creus, R. Marcos y J. Surralles (2002). "The Fanconi anaemia genome stability and tumour suppressor network." *Mutagenesis* **17**(6): 529-38.
- Bogliolo, M., A. Lyakhovich, E. Callen, M. Castella, E. Cappelli, M. J. Ramirez, A. Creus, R. Marcos, R. Kalb, K. Neveling, D. Schindler y J. Surralles (2007). "Histone H2AX and Fanconi anemia FANCD2 function in the same pathway to maintain chromosome stability." *Embo J* **26**(5): 1340-51.
- Bonfoco, E., E. Li, F. Kolbinger y N. R. Cooper (2001). "Characterization of a novel proapoptotic caspase-2- and caspase-9-binding protein." *J Biol Chem* **276**(31): 29242-50.
- Bouchlaka, C., S. Abdelhak, A. Amouri, H. Ben Abid, S. Hadiji, M. Frikha, T. Ben Othman, F. Amri, H. Ayadi, M. Hachicha, A. Rebai, A. Saad y K. Dellagi

- (2003). "Fanconi anemia in Tunisia: high prevalence of group A and identification of new FANCA mutations." *J Hum Genet* **48**(7): 352-61.
- Brocchieri, L., E. Conway de Macario y A. J. Macario (2008). "hsp70 genes in the human genome: Conservation and differentiation patterns predict a wide array of overlapping and specialized functions." *BMC Evol Biol* **8**: 19.
- Butturini, A., R. P. Gale, P. C. Verlander, B. Adler-Brecher, A. P. Gillio y A. D. Auerbach (1994). "Hematologic abnormalities in Fanconi anemia: an International Fanconi Anemia Registry study." *Blood* **84**(5): 1650-5.
- Byun, J. H., B. W. Park, J. R. Kim, G. W. Lee y J. H. Lee (2008). "Squamous cell carcinoma of the tongue after bone marrow transplant and graft-versus-host disease: a case report and review of the literature." *J Oral Maxillofac Surg* **66**(1): 144-7.
- Calado, R. T., W. T. Yewdell, K. L. Wilkerson, J. A. Regal, S. Kajigaya, C. A. Stratakis y N. S. Young (2009). "Sex hormones, acting on the TERT gene, increase telomerase activity in human primary hematopoietic cells." *Blood*.
- Callen, E., J. A. Casado, M. D. Tischkowitz, J. A. Bueren, A. Creus, R. Marcos, A. Dasi, J. M. Estella, A. Munoz, J. J. Ortega, J. de Winter, H. Joenje, D. Schindler, H. Hanenberg, S. V. Hodgson, C. G. Mathew y J. Surralles (2005). "A common founder mutation in FANCA underlies the world's highest prevalence of Fanconi anemia in Gypsy families from Spain." *Blood* **105**(5): 1946-9.
- Callen, E., E. Samper, M. J. Ramirez, A. Creus, R. Marcos, J. J. Ortega, T. Olive, I. Badell, M. A. Blasco y J. Surralles (2002). "Breaks at telomeres and TRF2-independent end fusions in Fanconi anemia." *Hum Mol Genet* **11**(4): 439-44.
- Callen, E., M. D. Tischkowitz, A. Creus, R. Marcos, J. A. Bueren, J. A. Casado, C. G. Mathew y J. Surralles (2004). "Quantitative PCR analysis reveals a high incidence of large intragenic deletions in the FANCA gene in Spanish Fanconi anemia patients." *Cytogenet Genome Res* **104**(1-4): 341-5.
- Camby, I., M. Le Mercier, F. Lefranc y R. Kiss (2006). "Galectin-1: a small protein with major functions." *Glycobiology* **16**(11): 137R-157R.
- Cantor, S., R. Drapkin, F. Zhang, Y. Lin, J. Han, S. Pamidi y D. M. Livingston (2004). "The BRCA1-associated protein BACH1 is a DNA helicase targeted by clinically relevant inactivating mutations." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(8): 2357-62.
- Cantor, S. B., D. W. Bell, S. Ganesan, E. M. Kass, R. Drapkin, S. Grossman, D. C. Wahrer, D. C. Sgroi, W. S. Lane, D. A. Haber y D. M. Livingston (2001). "BACH1, a novel helicase-like protein, interacts directly with BRCA1 and contributes to its DNA repair function." *Cell* **105**(1): 149-60.
- Casado, J., E. Callen, A. Jacome, P. Rio, M. Castella, S. Lobitz, T. Ferro, A. Munoz, J. Sevilla, A. Cantalejo, E. Cela, J. Cervera, J. Sanchez-Calero, I. Badell, J. Estella, A. Dasi, T. Olive, J. Jose Ortega, A. Rodriguez-Villa, M. Tapia, A. Molines, L. Madero, J. C. Segovia, K. Neveling, R. Kalb, D. Schindler, H. Hanenberg, J. Surralles y J. A. Bueren (2007). "A comprehensive strategy for the subtyping of patients with Fanconi anaemia: conclusions from the Spanish Fanconi Anemia Research Network." *J Med Genet* **44**(4): 241-9.
- Castillo, V., O. Cabre, R. Marcos y J. Surralles (2003). "Molecular cloning of the Drosophila Fanconi anaemia gene FANCD2 cDNA." *DNA Repair (Amst)* **2**(6): 751-8.
- Cavaloc, Y., M. Popielarz, J. P. Fuchs, R. Gattoni y J. Stevenin (1994). "Characterization and cloning of the human splicing factor 9G8: a novel 35 kDa factor of the serine/arginine protein family." *Embo J* **13**(11): 2639-49.

- Centra, M., E. Memeo, M. d'Apolito, M. Savino, L. Ianzano, A. Notarangelo, J. Liu, N. A. Doggett, L. Zelante y A. Savoia (1998). "Fine exon-intron structure of the Fanconi anemia group A (FAA) gene and characterization of two genomic deletions." *Genomics* **51**(3): 463-7.
- Chandra, S., O. Levrán, I. Jurickova, C. Maas, R. Kapur, D. Schindler, R. Henry, K. Milton, S. D. Batish, J. A. Cancelas, H. Hanenberg, A. D. Auerbach y D. A. Williams (2005). "A rapid method for retrovirus-mediated identification of complementation groups in Fanconi anemia patients." *Mol Ther* **12**(5): 976-84.
- Chaudhury, S., A. D. Auerbach, N. A. Kernan, T. N. Small, S. E. Prockop, A. Scaradavou, G. Heller, S. Wolden, R. J. O'Reilly y F. Boulad (2008). "Fludarabine-based cytoreductive regimen and T-cell-depleted grafts from alternative donors for the treatment of high-risk patients with Fanconi anaemia." *Br J Haematol* **140**(6): 644-55.
- Ciccia, A., C. Ling, R. Coulthard, Z. Yan, Y. Xue, A. R. Meetei, H. Laghmani el, H. Joenje, N. McDonald, J. P. de Winter, W. Wang y S. C. West (2007). "Identification of FAAP24, a Fanconi anemia core complex protein that interacts with FANCM." *Mol Cell* **25**(3): 331-43.
- Cohn, M. A., P. Kowal, K. Yang, W. Haas, T. T. Huang, S. P. Gygi y A. D. D'Andrea (2007). "A UAF1-containing multisubunit protein complex regulates the Fanconi anemia pathway." *Mol Cell* **28**(5): 786-97.
- Collins, N. B., J. B. Wilson, T. Bush, A. Thomashevski, K. J. Roberts, N. J. Jones y G. M. Kupfer (2009). "ATR-dependent phosphorylation of FANCA on serine 1449 after DNA damage is important for FA pathway function." *Blood* **113**(10): 2181-90.
- Crooks, S. W. y R. A. Stockley (1998). "Leukotriene B4." *Int J Biochem Cell Biol* **30**(2): 173-8.
- Cumming, R. C., J. Lightfoot, K. Beard, H. Youssoufian, P. J. O'Brien y M. Buchwald (2001). "Fanconi anemia group C protein prevents apoptosis in hematopoietic cells through redox regulation of GSTP1." *Nat Med* **7**(7): 814-20.
- Dallapiccola, B., B. Porfirio, V. Mokini, G. Alimena, G. Isacchi y E. Gandini (1985). "Effect of oxidants and antioxidants on chromosomal breakage in Fanconi anemia lymphocytes." *Hum Genet* **69**(1): 62-5.
- Dalle, J. H. (2008). "HSCT for Fanconi anemia in children: factors that influence early and late results." *Bone Marrow Transplant* **42 Suppl 2**: S51-3.
- Daub, H., J. V. Olsen, M. Bairlein, F. Gnad, F. S. Oppermann, R. Korner, Z. Greff, G. Keri, O. Stemmann y M. Mann (2008). "Kinase-selective enrichment enables quantitative phosphoproteomics of the kinome across the cell cycle." *Mol Cell* **31**(3): 438-48.
- Davies, S. M., G. A. Radloff, T. E. DeFor, O. Levrán, S. D. Batish, H. Hanenberg y A. D. Auerbach (2005). "GST genotype may modify clinical phenotype in patients with Fanconi anaemia." *Br J Haematol* **131**(1): 118-22.
- De Kerviler, E., A. Guerhazi, A. M. Zagdanski, E. Gluckman y J. Fria (2000). "The clinical and radiological features of Fanconi's anaemia." *Clin Radiol* **55**(5): 340-5.
- de Winter, J. P., F. Leveille, C. G. van Berkel, M. A. Rooimans, L. van Der Weel, J. Steltenpool, I. Demuth, N. V. Morgan, N. Alon, L. Bosnoyan-Collins, J. Lightfoot, P. A. Leegwater, Q. Waisfisz, K. Komatsu, F. Arwert, J. C. Pronk, C. G. Mathew, M. Digweed, M. Buchwald y H. Joenje (2000a). "Isolation of a cDNA representing the Fanconi anemia complementation group E gene." *Am J Hum Genet* **67**(5): 1306-8.

- de Winter, J. P., M. A. Rooimans, L. van Der Weel, C. G. van Berkel, N. Alon, L. Bosnoyan-Collins, J. de Groot, Y. Zhi, Q. Waisfisz, J. C. Pronk, F. Arwert, C. G. Mathew, R. J. Scheper, M. E. Hoatlin, M. Buchwald y H. Joenje (2000b). "The Fanconi anaemia gene FANCF encodes a novel protein with homology to ROM." *Nat Genet* **24**(1): 15-6.
- de Winter, J. P., L. van der Weel, J. de Groot, S. Stone, Q. Waisfisz, F. Arwert, R. J. Scheper, F. A. Kruyt, M. E. Hoatlin y H. Joenje (2000c). "The Fanconi anemia protein FANCF forms a nuclear complex with FANCA, FANCC and FANCG." *Hum Mol Genet* **9**(18): 2665-74.
- de Winter, J. P., Q. Waisfisz, M. A. Rooimans, C. G. van Berkel, L. Bosnoyan-Collins, N. Alon, M. Carreau, O. Bender, I. Demuth, D. Schindler, J. C. Pronk, F. Arwert, H. Hoehn, M. Digweed, M. Buchwald y H. Joenje (1998). "The Fanconi anaemia group G gene FANCG is identical with XRCC9." *Nat Genet* **20**(3): 281-3.
- Demuth, I., M. Wlodarski, A. J. Tipping, N. V. Morgan, J. P. de Winter, M. Thiel, S. Grasl, D. Schindler, A. D. D'Andrea, C. Altay, H. Kayserili, A. Zatterale, J. Kunze, W. Ebell, C. G. Mathew, H. Joenje, K. Sperling y M. Digweed (2000). "Spectrum of mutations in the Fanconi anaemia group G gene, FANCG/XRCC9." *Eur J Hum Genet* **8**(11): 861-8.
- Diamond, L. K. y N. T. Shahidi (1967). "Treatment of aplastic anemia in children." *Semin Hematol* **4**(3): 278-88.
- Dokal, I. (2000). "The genetics of Fanconi's anaemia." *Baillieres Best Pract Res Clin Haematol* **13**(3): 407-25.
- Dorsman, J. C., M. Levitus, D. Rockx, M. A. Rooimans, A. B. Oostra, A. Haitjema, S. T. Bakker, J. Steltenpool, D. Schuler, S. Mohan, D. Schindler, F. Arwert, G. Pals, C. G. Mathew, Q. Waisfisz, J. P. de Winter y H. Joenje (2007). "Identification of the Fanconi anemia complementation group I gene, FANCI." *Cell Oncol* **29**(3): 211-8.
- Dufour, C., A. Corcione, J. Svahn, R. Haupt, V. Poggi, A. N. Beka'ssy, R. Scime, A. Pistorio y V. Pistoia (2003). "TNF-alpha and IFN-gamma are overexpressed in the bone marrow of Fanconi anemia patients and TNF-alpha suppresses erythropoiesis in vitro." *Blood* **102**(6): 2053-9.
- Dufour, C. y J. Svahn (2008). "Fanconi anaemia: new strategies." *Bone Marrow Transplant* **41 Suppl 2**: S90-5.
- Dutrillaux, B., A. Aurias, A. M. Dutrillaux, D. Buriot y M. Prieur (1982). "The cell cycle of lymphocytes in Fanconi anemia." *Hum Genet* **62**(4): 327-32.
- Elder, G. H. y A. G. Roberts (1995). "Uroporphyrinogen decarboxylase." *J Bioenerg Biomembr* **27**(2): 207-14.
- Enders, G. H. (2008). "Expanded roles for Chk1 in genome maintenance." *J Biol Chem* **283**(26): 17749-52.
- Endoh, H., K. Maruyama, Y. Masuhiro, Y. Kobayashi, M. Goto, H. Tai, J. Yanagisawa, D. Metzger, S. Hashimoto y S. Kato (1999). "Purification and identification of p68 RNA helicase acting as a transcriptional coactivator specific for the activation function 1 of human estrogen receptor alpha." *Mol Cell Biol* **19**(8): 5363-72.
- FA/Breast Cancer consortium (1996). "Positional cloning of the Fanconi anaemia group A gene. The Fanconi anaemia/breast cancer consortium." *Nat Genet* **14**(3): 324-8.

- Fagerlie, S. R., T. Koretsky, B. Torok-Storb y G. C. Bagby (2004). "Impaired type I IFN-induced Jak/STAT signaling in FA-C cells and abnormal CD4⁺ Th cell subsets in Fancd-/- mice." *J Immunol* **173**(6): 3863-70.
- Faivre, L., P. Guardiola, C. Lewis, I. Dokal, W. Ebell, A. Zatterale, C. Altay, J. Poole, D. Stones, M. L. Kwee, M. van Weel-Sipman, C. Havenga, N. Morgan, J. de Winter, M. Digweed, A. Savoia, J. Pronk, T. de Ravel, S. Jansen, H. Joenje, E. Gluckman y C. G. Mathew (2000). "Association of complementation group and mutation type with clinical outcome in fanconi anemia. European Fanconi Anemia Research Group." *Blood* **96**(13): 4064-70.
- Fanconi, G. (1927). Familiäre infantile perniziosaartige Anämie (perniziöses Blutbild und Konstitution). *Jahrbuch für Kinderheilkunde und physische*. **117**: 257-280.
- Floyd, R. A. (1990). "The role of 8-hydroxyguanine in carcinogenesis." *Carcinogenesis* **11**(9): 1447-50.
- Foulon, T., S. Cadel y P. Cohen (1999). "Aminopeptidase B (EC 3.4.11.6)." *Int J Biochem Cell Biol* **31**(7): 747-50.
- Franco, S., H. J. van de Vrugt, P. Fernandez, M. Aracil, F. Arwert y M. A. Blasco (2004). "Telomere dynamics in Fancg-deficient mouse and human cells." *Blood* **104**(13): 3927-35.
- Frerman, F. E. (1988). "Acyl-CoA dehydrogenases, electron transfer flavoprotein and electron transfer flavoprotein dehydrogenase." *Biochem Soc Trans* **16**(3): 416-8.
- Fuller-Pace, F. V. y S. Ali (2008). "The DEAD box RNA helicases p68 (Ddx5) and p72 (Ddx17): novel transcriptional co-regulators." *Biochem Soc Trans* **36**(Pt 4): 609-12.
- Futaki, M., T. Igarashi, S. Watanabe, S. Kajigaya, A. Tatsuguchi, J. Wang y J. M. Liu (2002). "The FANCG Fanconi anemia protein interacts with CYP2E1: possible role in protection against oxidative DNA damage." *Carcinogenesis* **23**(1): 67-72.
- Futaki, M., T. Yamashita, H. Yagasaki, T. Toda, M. Yabe, S. Kato, S. Asano y T. Nakahata (2000). "The IVS4 + 4 A to T mutation of the fanconi anemia gene FANCC is not associated with a severe phenotype in Japanese patients." *Blood* **95**(4): 1493-8.
- Gabrilovac, J., B. Cupic, D. Breljak, M. Zekusic y M. Boranic (2004). "Expression of CD13/aminopeptidase N and CD10/neutral endopeptidase on cultured human keratinocytes." *Immunol Lett* **91**(1): 39-47.
- Garcia, M. J., V. Fernandez, A. Osorio, A. Barroso, F. Fernandez, M. Urioste y J. Benitez (2009a). "Mutational analysis of FANCL, FANCM and the recently identified FANCI suggests that among the 13 known Fanconi Anemia genes, only FANCD1/BRCA2 plays a major role in high-risk breast cancer predisposition." *Carcinogenesis*.
- Garcia, M. J., V. Fernandez, A. Osorio, A. Barroso, G. Llort, C. Lazaro, I. Blanco, T. Caldes, M. de la Hoya, Y. C. T. Ramon, C. Alonso, M. I. Tejada, C. San Roman, L. Robles-Diaz, M. Urioste y J. Benitez (2009b). "Analysis of FANCB and FANCN/PALB2 fanconi anemia genes in BRCA1/2-negative Spanish breast cancer families." *Breast Cancer Res Treat* **113**(3): 545-51.
- Garcia-Higuera, I., Y. Kuang, J. Denham y A. D. D'Andrea (2000). "The fanconi anemia proteins FANCA and FANCG stabilize each other and promote the nuclear accumulation of the Fanconi anemia complex." *Blood* **96**(9): 3224-30.
- Garcia-Higuera, I., T. Taniguchi, S. Ganesan, M. S. Meyn, C. Timmers, J. Hejna, M. Grompe y A. D. D'Andrea (2001). "Interaction of the Fanconi anemia proteins and BRCA1 in a common pathway." *Mol Cell* **7**(2): 249-62.

- Gari, K., C. Decaillet, A. Z. Stasiak, A. Stasiak y A. Constantinou (2008). "The Fanconi anemia protein FANCM can promote branch migration of Holliday junctions and replication forks." *Mol Cell* **29**(1): 141-8.
- Gillio, A. P., P. C. Verlander, S. D. Batish, P. F. Giampietro y A. D. Auerbach (1997). "Phenotypic consequences of mutations in the Fanconi anemia FAC gene: an International Fanconi Anemia Registry study." *Blood* **90**(1): 105-10.
- Giri, N., D. L. Batista, B. P. Alter y C. A. Stratakis (2007). "Endocrine abnormalities in patients with Fanconi anemia." *J Clin Endocrinol Metab* **92**(7): 2624-31.
- Gordon, S. M. y M. Buchwald (2003). "Fanconi anemia protein complex: mapping protein interactions in the yeast 2- and 3-hybrid systems." *Blood* **102**(1): 136-41.
- Grantham, J. J., D. R. Tucker, D. A. Diederich, F. Whittier y D. E. Cross (1974). "Nephrology. Pattern of consultation in a general hospital." *J Kans Med Soc* **75**(3): 95-7.
- Gross, M., H. Hanenberg, S. Lobitz, R. Friedl, S. Herterich, R. Dietrich, B. Gruhn, D. Schindler y H. Hoehn (2002). "Reverse mosaicism in Fanconi anemia: natural gene therapy via molecular self-correction." *Cytogenet Genome Res* **98**(2-3): 126-35.
- Grover, D., M. Mukerji, P. Bhatnagar, K. Kannan y S. K. Brahmachari (2004). "Alu repeat analysis in the complete human genome: trends and variations with respect to genomic composition." *Bioinformatics* **20**(6): 813-7.
- Gupta, R., S. Sharma, J. A. Sommers, Z. Jin, S. B. Cantor y R. M. Brosh, Jr. (2005). "Analysis of the DNA substrate specificity of the human BACH1 helicase associated with breast cancer." *J Biol Chem* **280**(27): 25450-60.
- Hales, B. F. (2005). "DNA repair disorders causing malformations." *Curr Opin Genet Dev* **15**(3): 234-40.
- Hanenberg, H., S. D. Batish, K. E. Pollok, L. Vieten, P. C. Verlander, C. Leurs, R. J. Cooper, K. Gottsche, L. Haneline, D. W. Clapp, S. Lobitz, D. A. Williams y A. D. Auerbach (2002). "Phenotypic correction of primary Fanconi anemia T cells with retroviral vectors as a diagnostic tool." *Exp Hematol* **30**(5): 410-20.
- He, J., C. C. Mao, A. Reyes, H. Sembongi, M. Di Re, C. Granycome, A. B. Clippingdale, I. M. Fearnley, M. Harbour, A. J. Robinson, S. Reichelt, J. N. Spelbrink, J. E. Walker y I. J. Holt (2007). "The AAA+ protein ATAD3 has displacement loop binding properties and is involved in mitochondrial nucleoid organization." *J Cell Biol* **176**(2): 141-6.
- Hennighausen, L. y G. W. Robinson (2008). "Interpretation of cytokine signaling through the transcription factors STAT5A and STAT5B." *Genes Dev* **22**(6): 711-21.
- Hirsch, B., A. Shimamura, L. Moreau, S. Baldinger, M. Hag-alshiekh, B. Bostrom, S. Sencer y A. D. D'Andrea (2004). "Association of biallelic BRCA2/FANCD1 mutations with spontaneous chromosomal instability and solid tumors of childhood." *Blood* **103**(7): 2554-9.
- Hirschhorn, R., D. R. Yang, J. M. Puck, M. L. Huie, C. K. Jiang y L. E. Kurlandsky (1996). "Spontaneous in vivo reversion to normal of an inherited mutation in a patient with adenosine deaminase deficiency." *Nat Genet* **13**(3): 290-5.
- Ho, G. P., S. Margossian, T. Taniguchi y A. D. D'Andrea (2006). "Phosphorylation of FANCD2 on two novel sites is required for mitomycin C resistance." *Mol Cell Biol* **26**(18): 7005-15.
- Holt, I. J., J. He, C. C. Mao, J. D. Boyd-Kirkup, P. Martinsson, H. Sembongi, A. Reyes y J. N. Spelbrink (2007). "Mammalian mitochondrial nucleoids: organizing an independently minded genome." *Mitochondrion* **7**(5): 311-21.

- Houghtaling, S., L. Granville, Y. Akkari, Y. Torimaru, S. Olson, M. Finegold y M. Grompe (2005). "Heterozygosity for p53 (Trp53+/-) accelerates epithelial tumor formation in fanconi anemia complementation group D2 (Fancd2) knockout mice." *Cancer Res* **65**(1): 85-91.
- Howlett, N. G., T. Taniguchi, S. G. Durkin, A. D. D'Andrea y T. W. Glover (2005). "The Fanconi anemia pathway is required for the DNA replication stress response and for the regulation of common fragile site stability." *Hum Mol Genet* **14**(5): 693-701.
- Howlett, N. G., T. Taniguchi, S. Olson, B. Cox, Q. Waisfisz, C. De Die-Smulders, N. Persky, M. Grompe, H. Joenje, G. Pals, H. Ikeda, E. A. Fox y A. D. D'Andrea (2002). "Biallelic inactivation of BRCA2 in Fanconi anemia." *Science* **297**(5581): 606-9.
- Hui, J., G. Reither y A. Bindereif (2003). "Novel functional role of CA repeats and hnRNP L in RNA stability." *Rna* **9**(8): 931-6.
- Hussain, S., J. B. Wilson, A. L. Medhurst, J. Hejna, E. Witt, S. Ananth, A. Davies, J. Y. Masson, R. Moses, S. C. West, J. P. de Winter, A. Ashworth, N. J. Jones y C. G. Mathew (2004). "Direct interaction of FANCD2 with BRCA2 in DNA damage response pathways." *Hum Mol Genet* **13**(12): 1241-8.
- Hussain, S., E. Witt, P. A. Huber, A. L. Medhurst, A. Ashworth y C. G. Mathew (2003). "Direct interaction of the Fanconi anaemia protein FANCG with BRCA2/FANCD1." *Hum Mol Genet* **12**(19): 2503-10.
- Ibanez, A., P. Rio, J. A. Casado, J. A. Bueren, J. L. Fernandez-Luna y C. Pipaon (2009). "Elevated levels of IL-1beta in Fanconi Anemia group A patients due to a constitutively active PI3K-AKT pathway are capable of promoting tumor cell proliferation." *Biochem J*.
- Jensen, R. A., M. E. Thompson, T. L. Jetton, C. I. Szabo, R. van der Meer, B. Helou, S. R. Tronick, D. L. Page, M. C. King y J. T. Holt (1996). "BRCA1 is secreted and exhibits properties of a granin." *Nat Genet* **12**(3): 303-8.
- Joenje, H., F. Arwert, A. W. Eriksson, H. de Koning y A. B. Oostra (1981). "Oxygen-dependence of chromosomal aberrations in Fanconi's anaemia." *Nature* **290**(5802): 142-3.
- Joenje, H. y K. J. Patel (2001). "The emerging genetic and molecular basis of Fanconi anaemia." *Nat Rev Genet* **2**(6): 446-57.
- Johnson, F. L., K. G. Lerner, M. Siegel, J. R. Feagler, P. W. Majerus, J. R. Hartmann y E. D. Thomas (1972). "Association of androgenic-anabolic steroid therapy with development of hepatocellular carcinoma." *Lancet* **2**(7790): 1273-6.
- Kalb, R., K. Neveling, H. Hoehn, H. Schneider, Y. Linka, S. D. Batish, C. Hunt, M. Berwick, E. Callen, J. Surralles, J. A. Casado, J. Bueren, A. Dasi, J. Soulier, E. Gluckman, C. M. Zwaan, R. van Spaendonk, G. Pals, J. P. de Winter, H. Joenje, M. Grompe, A. D. Auerbach, H. Hanenberg y D. Schindler (2007). "Hypomorphic mutations in the gene encoding a key Fanconi anemia protein, FANCD2, sustain a significant group of FA-D2 patients with severe phenotype." *Am J Hum Genet* **80**(5): 895-910.
- Kaminsky, L. S. y S. D. Spivack (1999). "Cytochromes P450 and cancer." *Mol Aspects Med* **20**(1-2): 70-84, 137.
- Kennedy, R. D. y A. D. D'Andrea (2005). "The Fanconi Anemia/BRCA pathway: new faces in the crowd." *Genes Dev* **19**(24): 2925-40.
- Kim, J. M., Y. Kee, A. Gurtan y A. D. D'Andrea (2008). "Cell cycle-dependent chromatin loading of the Fanconi anemia core complex by FANCM/FAAP24." *Blood* **111**(10): 5215-22.

- Kim, J. M., K. Parmar, M. Huang, D. M. Weinstock, C. A. Ruit, J. L. Kutok y A. D. D'Andrea (2009). "Inactivation of murine Usp1 results in genomic instability and a Fanconi anemia phenotype." *Dev Cell* **16**(2): 314-20.
- Kontou, M., C. Adelfalk, M. Hirsch-Kauffmann y M. Schweiger (2003). "Suboptimal action of NF-kappaB in Fanconi anemia cells results from low levels of thioredoxin." *Biol Chem* **384**(10-11): 1501-7.
- Kovacic, P. y J. D. Jacintho (2001). "Mechanisms of carcinogenesis: focus on oxidative stress and electron transfer." *Curr Med Chem* **8**(7): 773-96.
- Kruyt, F. A., T. Hoshino, J. M. Liu, P. Joseph, A. K. Jaiswal y H. Youssoufian (1998). "Abnormal microsomal detoxification implicated in Fanconi anemia group C by interaction of the FAC protein with NADPH cytochrome P450 reductase." *Blood* **92**(9): 3050-6.
- Kubbies, M., D. Schindler, H. Hoehn, A. Schinzel y P. S. Rabinovitch (1985). "Endogenous blockage and delay of the chromosome cycle despite normal recruitment and growth phase explain poor proliferation and frequent edomitosis in Fanconi anemia cells." *Am J Hum Genet* **37**(5): 1022-30.
- Kushner, J. P., A. J. Barbuto y G. R. Lee (1976). "An inherited enzymatic defect in porphyria cutanea tarda: decreased uroporphyrinogen decarboxylase activity." *J Clin Invest* **58**(5): 1089-97.
- Kutler, D. I., A. D. Auerbach, J. Satagopan, P. F. Giampietro, S. D. Batish, A. G. Huvos, A. Goberdhan, J. P. Shah y B. Singh (2003a). "High incidence of head and neck squamous cell carcinoma in patients with Fanconi anemia." *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* **129**(1): 106-12.
- Kutler, D. I., B. Singh, J. Satagopan, S. D. Batish, M. Berwick, P. F. Giampietro, H. Hanenberg y A. D. Auerbach (2003b). "A 20-year perspective on the International Fanconi Anemia Registry (IFAR)." *Blood* **101**(4): 1249-56.
- Kwee, M. L., E. H. Poll, J. J. van de Kamp, H. de Koning, A. W. Eriksson y H. Joenje (1983). "Unusual response to bifunctional alkylating agents in a case of Fanconi anaemia." *Hum Genet* **64**(4): 384-7.
- Lee, M. K., J. H. Kim, C. H. Lee, J. M. Kim, C. D. Kang, Y. D. Kim, K. U. Choi, H. W. Kim, J. Y. Kim, Y. Park do y M. Y. Sol (2006). "Clinicopathological significance of BGP expression in non-small-cell lung carcinoma: relationship with histological type, microvessel density and patients' survival." *Pathology* **38**(6): 555-60.
- Leteurtre, F., X. Li, P. Guardiola, G. Le Roux, J. C. Sergere, P. Richard, E. D. Carosella y E. Gluckman (1999). "Accelerated telomere shortening and telomerase activation in Fanconi's anaemia." *Br J Haematol* **105**(4): 883-93.
- Levitus, M., Q. Waisfisz, B. C. Godthelp, Y. de Vries, S. Hussain, W. W. Wiegant, E. Elghalbzouri-Maghrani, J. Steltenpool, M. A. Rooimans, G. Pals, F. Arwert, C. G. Mathew, M. Z. Zdzienicka, K. Hiom, J. P. De Winter y H. Joenje (2005). "The DNA helicase BRIP1 is defective in Fanconi anemia complementation group J." *Nat Genet* **37**(9): 934-5.
- Levran, O., R. Diotti, K. Pujara, S. D. Batish, H. Hanenberg y A. D. Auerbach (2005). "Spectrum of sequence variations in the FANCA gene: an International Fanconi Anemia Registry (IFAR) study." *Hum Mutat* **25**(2): 142-9.
- Levran, O., N. A. Doggett y A. D. Auerbach (1998). "Identification of Alu-mediated deletions in the Fanconi anemia gene FAA." *Hum Mutat* **12**(3): 145-52.
- Levran, O., T. Erlich, N. Magdalena, J. J. Gregory, S. D. Batish, P. C. Verlander y A. D. Auerbach (1997). "Sequence variation in the Fanconi anemia gene FAA." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(24): 13051-6.

- Li, K. y R. S. Williams (1997). "Tetramerization and single-stranded DNA binding properties of native and mutated forms of murine mitochondrial single-stranded DNA-binding proteins." *J Biol Chem* **272**(13): 8686-94.
- Li, Y. y H. Youssoufian (1997). "MxA overexpression reveals a common genetic link in four Fanconi anemia complementation groups." *J Clin Invest* **100**(11): 2873-80.
- Lightfoot, J., N. Alon, L. Bosnoyan-Collins y M. Buchwald (1999). "Characterization of regions functional in the nuclear localization of the Fanconi anemia group A protein." *Hum Mol Genet* **8**(6): 1007-15.
- Lindblad, B., S. Lindstedt y G. Steen (1977). "On the enzymic defects in hereditary tyrosinemia." *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**(10): 4641-5.
- Ling, C., M. Ishiai, A. M. Ali, A. L. Medhurst, K. Neveling, R. Kalb, Z. Yan, Y. Xue, A. B. Oostra, A. D. Auerbach, M. E. Hoatlin, D. Schindler, H. Joenje, J. P. de Winter, M. Takata, A. R. Meetei y W. Wang (2007). "FAAP100 is essential for activation of the Fanconi anemia-associated DNA damage response pathway." *Embo J* **26**(8): 2104-14.
- Litman, R., M. Peng, Z. Jin, F. Zhang, J. Zhang, S. Powell, P. R. Andreassen y S. B. Cantor (2005). "BACH1 is critical for homologous recombination and appears to be the Fanconi anemia gene product FANCI." *Cancer Cell* **8**(3): 255-65.
- Lo ten Foe, J. R., M. T. Barel, P. Thuss, M. Digweed, F. Arwert y H. Joenje (1996). "Sequence variations in the Fanconi anaemia gene, FAC: pathogenicity of 1806insA and R548X and recognition of D195V as a polymorphic variant." *Hum Genet* **98**(5): 522-3.
- Lo Ten Foe, J. R., M. L. Kwee, M. A. Rooimans, A. B. Oostra, A. J. Veerman, M. van Weel, R. M. Pauli, N. T. Shahidi, I. Dokal, I. Roberts, C. Altay, E. Gluckman, R. A. Gibson, C. G. Mathew, F. Arwert y H. Joenje (1997). "Somatic mosaicism in Fanconi anemia: molecular basis and clinical significance." *Eur J Hum Genet* **5**(3): 137-48.
- Lo Ten Foe, J. R., M. A. Rooimans, L. Bosnoyan-Collins, N. Alon, M. Wijker, L. Parker, J. Lightfoot, M. Carreau, D. F. Callen, A. Savoia, N. C. Cheng, C. G. van Berkel, M. H. Strunk, J. J. Gille, G. Pals, F. A. Kruyt, J. C. Pronk, F. Arwert, M. Buchwald y H. Joenje (1996). "Expression cloning of a cDNA for the major Fanconi anaemia gene, FAA." *Nat Genet* **14**(3): 320-3.
- Lyakhovich, A. y J. Surralles (2007). "New roads to FA/BRCA pathway: H2AX." *Cell Cycle* **6**(9): 1019-23.
- Lynch, H. T., E. Silva, C. Snyder y J. F. Lynch (2008). "Hereditary breast cancer: part I. Diagnosing hereditary breast cancer syndromes." *Breast J* **14**(1): 3-13.
- Machida, Y. J., Y. Machida, Y. Chen, A. M. Gurtan, G. M. Kupfer, A. D. D'Andrea y A. Dutta (2006). "UBE2T is the E2 in the Fanconi anemia pathway and undergoes negative autoregulation." *Mol Cell* **23**(4): 589-96.
- Magdalena, N., D. V. Pilonetto, M. A. Bitencourt, N. F. Pereira, R. C. Ribeiro, M. Jeng y R. Pasquini (2005). "Frequency of Fanconi anemia in Brazil and efficacy of screening for the FANCA 3788-3790del mutation." *Braz J Med Biol Res* **38**(5): 669-73.
- Marion, R. M., K. Strati, H. Li, M. Murga, R. Blanco, S. Ortega, O. Fernandez-Capetillo, M. Serrano y M. A. Blasco (2009). "A p53-mediated DNA damage response limits reprogramming to ensure iPS cell genomic integrity." *Nature* **460**(7259): 1149-53.
- Matsuoka, S., B. A. Ballif, A. Smogorzewska, E. R. McDonald, 3rd, K. E. Hurov, J. Luo, C. E. Bakalarski, Z. Zhao, N. Solimini, Y. Lerenthal, Y. Shiloh, S. P. Gygi

- y S. J. Elledge (2007). "ATM and ATR substrate analysis reveals extensive protein networks responsive to DNA damage." *Science* **316**(5828): 1160-6.
- Matsushita, K., C. N. Morrell, B. Cambien, S. X. Yang, M. Yamakuchi, C. Bao, M. R. Hara, R. A. Quick, W. Cao, B. O'Rourke, J. M. Lowenstein, J. Pevsner, D. D. Wagner y C. J. Lowenstein (2003). "Nitric oxide regulates exocytosis by S-nitrosylation of N-ethylmaleimide-sensitive factor." *Cell* **115**(2): 139-50.
- McAllister, K. A., L. M. Bennett, C. D. Houle, T. Ward, J. Malphurs, N. K. Collins, C. Cachafeiro, J. Haseman, E. H. Goulding, D. Bunch, E. M. Eddy, B. J. Davis y R. W. Wiseman (2002). "Cancer susceptibility of mice with a homozygous deletion in the COOH-terminal domain of the Brca2 gene." *Cancer Res* **62**(4): 990-4.
- Medhurst, A. L., H. Laghmani el, J. Steltenpool, M. Ferrer, C. Fontaine, J. de Groot, M. A. Roomans, R. J. Scheper, A. R. Meetei, W. Wang, H. Joenje y J. P. de Winter (2006). "Evidence for subcomplexes in the Fanconi anemia pathway." *Blood* **108**(6): 2072-80.
- Meetei, A. R., J. P. de Winter, A. L. Medhurst, M. Wallisch, Q. Waisfisz, H. J. van de Vrugt, A. B. Oostra, Z. Yan, C. Ling, C. E. Bishop, M. E. Hoatlin, H. Joenje y W. Wang (2003a). "A novel ubiquitin ligase is deficient in Fanconi anemia." *Nat Genet* **35**(2): 165-70.
- Meetei, A. R., M. Levitus, Y. Xue, A. L. Medhurst, M. Zwaan, C. Ling, M. A. Roomans, P. Bier, M. Hoatlin, G. Pals, J. P. de Winter, W. Wang y H. Joenje (2004a). "X-linked inheritance of Fanconi anemia complementation group B." *Nat Genet* **36**(11): 1219-24.
- Meetei, A. R., A. L. Medhurst, C. Ling, Y. Xue, T. R. Singh, P. Bier, J. Steltenpool, S. Stone, I. Dokal, C. G. Mathew, M. Hoatlin, H. Joenje, J. P. de Winter y W. Wang (2005). "A human ortholog of archaeal DNA repair protein Hef is defective in Fanconi anemia complementation group M." *Nat Genet* **37**(9): 958-63.
- Meetei, A. R., S. Sechi, M. Wallisch, D. Yang, M. K. Young, H. Joenje, M. E. Hoatlin y W. Wang (2003b). "A multiprotein nuclear complex connects Fanconi anemia and Bloom syndrome." *Mol Cell Biol* **23**(10): 3417-26.
- Meetei, A. R., Z. Yan y W. Wang (2004b). "FANCL replaces BRCA1 as the likely ubiquitin ligase responsible for FANCD2 monoubiquitination." *Cell Cycle* **3**(2): 179-81.
- Mendez, J. y B. Stillman (2000). "Chromatin association of human origin recognition complex, cdc6, and minichromosome maintenance proteins during the cell cycle: assembly of prereplication complexes in late mitosis." *Mol Cell Biol* **20**(22): 8602-12.
- Mi, J. y G. M. Kupfer (2005). "The Fanconi anemia core complex associates with chromatin during S phase." *Blood* **105**(2): 759-66.
- Milsom, M. D., B. Schiedlmeier, J. Bailey, M. O. Kim, D. Li, M. Jansen, A. M. Ali, M. Kirby, C. Baum, L. J. Fairbairn y D. A. Williams (2009). "Ectopic HOXB4 overcomes the inhibitory effect of tumor necrosis factor- α on Fanconi anemia hematopoietic stem and progenitor cells." *Blood* **113**(21): 5111-20.
- Morales, J. F., T. Song, A. D. Auerbach y K. M. Wittkowski (2008). "Phenotyping genetic diseases using an extension of mu-scores for multivariate data." *Stat Appl Genet Mol Biol* **7**(1): Article 19.
- Morgan, N. V., A. J. Tipping, H. Joenje y C. G. Mathew (1999). "High frequency of large intragenic deletions in the Fanconi anemia group A gene." *Am J Hum Genet* **65**(5): 1330-41.

- Nagasawa, H. y J. B. Little (1983). "Suppression of cytotoxic effect of mitomycin-C by superoxide dismutase in Fanconi's anemia and dyskeratosis congenita fibroblasts." *Carcinogenesis* **4**(7): 795-9.
- Nakanishi, K., T. Taniguchi, V. Ranganathan, H. V. New, L. A. Moreau, M. Stotsky, C. G. Mathew, M. B. Kastan, D. T. Weaver y A. D. D'Andrea (2002). "Interaction of FANCD2 and NBS1 in the DNA damage response." *Nat Cell Biol* **4**(12): 913-20.
- Navarro, S., N. W. Meza, O. Quintana-Bustamante, J. A. Casado, A. Jacome, K. McAllister, S. Puerto, J. Surralles, J. C. Segovia y J. A. Bueren (2006). "Hematopoietic dysfunction in a mouse model for Fanconi anemia group D1." *Mol Ther* **14**(4): 525-35.
- Neveling, K., D. Endt, H. Hoehn y D. Schindler (2009). "Genotype-phenotype correlations in Fanconi anemia." *Mutat Res* **668**(1-2): 73-91.
- Ng, P. C. y S. Henikoff (2003). "SIFT: Predicting amino acid changes that affect protein function." *Nucleic Acids Res* **31**(13): 3812-4.
- Niedernhofer, L. J., A. S. Lalai y J. H. Hoeijmakers (2005). "Fanconi anemia (cross)linked to DNA repair." *Cell* **123**(7): 1191-8.
- Niedernhofer, L. J., H. Odijk, M. Budzowska, E. van Drunen, A. Maas, A. F. Theil, J. de Wit, N. G. Jaspers, H. B. Beverloo, J. H. Hoeijmakers y R. Kanaar (2004). "The structure-specific endonuclease Ercc1-Xpf is required to resolve DNA interstrand cross-link-induced double-strand breaks." *Mol Cell Biol* **24**(13): 5776-87.
- Nijman, S. M., T. T. Huang, A. M. Dirac, T. R. Brummelkamp, R. M. Kerkhoven, A. D. D'Andrea y R. Bernards (2005). "The deubiquitinating enzyme USP1 regulates the Fanconi anemia pathway." *Mol Cell* **17**(3): 331-9.
- Nojima, K., H. Hohegger, A. Saberi, T. Fukushima, K. Kikuchi, M. Yoshimura, B. J. Orelli, D. K. Bishop, S. Hirano, M. Ohzeki, M. Ishiai, K. Yamamoto, M. Takata, H. Arakawa, J. M. Buerstedde, M. Yamazoe, T. Kawamoto, K. Araki, J. A. Takahashi, N. Hashimoto, S. Takeda y E. Sonoda (2005). "Multiple repair pathways mediate tolerance to chemotherapeutic cross-linking agents in vertebrate cells." *Cancer Res* **65**(24): 11704-11.
- Nordenson, I. (1977). "Effect of superoxide dismutase and catalase on spontaneously occurring chromosome breaks in patients with Fanconi's anemia." *Hereditas* **86**(2): 147-50.
- Nousiainen, M., H. H. Sillje, G. Sauer, E. A. Nigg y R. Korner (2006). "Phosphoproteome analysis of the human mitotic spindle." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(14): 5391-6.
- Oestergaard, V. H., F. Langevin, H. J. Kuiken, P. Pace, W. Niedzwiedz, L. J. Simpson, M. Ohzeki, M. Takata, J. E. Sale y K. J. Patel (2007). "Deubiquitination of FANCD2 is required for DNA crosslink repair." *Mol Cell* **28**(5): 798-809.
- Osborn, L., S. Kunkel y G. J. Nabel (1989). "Tumor necrosis factor alpha and interleukin 1 stimulate the human immunodeficiency virus enhancer by activation of the nuclear factor kappa B." *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**(7): 2336-40.
- Osman, F. y M. C. Whitby (2007). "Exploring the roles of Mus81-Eme1/Mms4 at perturbed replication forks." *DNA Repair (Amst)* **6**(7): 1004-17.
- Pace, P., M. Johnson, W. M. Tan, G. Mosedale, C. Sng, M. Hoatlin, J. de Winter, H. Joenje, F. Gergely y K. J. Patel (2002). "FANCE: the link between Fanconi anaemia complex assembly and activity." *Embo J* **21**(13): 3414-23.

- Pagano, G., P. Degan, M. d'Ischia, F. J. Kelly, B. Nobili, F. V. Pallardo, H. Youssoufian y A. Zatterale (2005). "Oxidative stress as a multiple effector in Fanconi anaemia clinical phenotype." *Eur J Haematol* **75**(2): 93-100.
- Pagano, G., P. Degan, M. d'Ischia, F. J. Kelly, F. V. Pallardo, A. Zatterale, S. S. Anak, E. E. Akisik, G. Beneduce, R. Calzone, E. De Nicola, C. Dunster, A. Lloret, P. Manini, B. Nobili, A. Saviano, E. Vuttariello y M. Warnau (2004). "Gender- and age-related distinctions for the in vivo prooxidant state in Fanconi anaemia patients." *Carcinogenesis* **25**(10): 1899-909.
- Pagano, G. y L. G. Korkina (2000). "Prospects for nutritional interventions in the clinical management of Fanconi anemia." *Cancer Causes Control* **11**(10): 881-9.
- Pang, Q., W. Keeble, T. A. Christianson, G. R. Faulkner y G. C. Bagby (2001). "FANCC interacts with Hsp70 to protect hematopoietic cells from IFN-gamma/TNF-alpha-mediated cytotoxicity." *Embo J* **20**(16): 4478-89.
- Parmar, K., A. D'Andrea y L. J. Niedernhofer (2009). "Mouse models of Fanconi anemia." *Mutat Res* **668**(1-2): 133-40.
- Peng, M., R. Litman, J. Xie, S. Sharma, R. M. Brosh, Jr. y S. B. Cantor (2007). "The FANCI/MutLalpha interaction is required for correction of the cross-link response in FA-J cells." *Embo J* **26**(13): 3238-49.
- Pichierri, P. y F. Rosselli (2004). "The DNA crosslink-induced S-phase checkpoint depends on ATR-CHK1 and ATR-NBS1-FANCD2 pathways." *Embo J* **23**(5): 1178-87.
- Pickart, C. M. (2001). "Mechanisms underlying ubiquitination." *Annu Rev Biochem* **70**: 503-33.
- Pilonetto, D. V., N. F. Pereira, M. A. Bitencourt, N. I. Magdalena, E. R. Vieira, L. B. Veiga, I. J. Cavalli, R. C. Ribeiro y R. Pasquini (2009). "FANCD2 Western blot as a diagnostic tool for Brazilian patients with Fanconi anemia." *Braz J Med Biol Res* **42**(3): 237-43.
- Poot, M., O. Gross, B. Epe, M. Pflaum y H. Hoehn (1996). "Cell cycle defect in connection with oxygen and iron sensitivity in Fanconi anemia lymphoblastoid cells." *Exp Cell Res* **222**(2): 262-8.
- Pritsos, C. A. y A. C. Sartorelli (1986). "Generation of reactive oxygen radicals through bioactivation of mitomycin antibiotics." *Cancer Res* **46**(7): 3528-32.
- Rahman, N., S. Seal, D. Thompson, P. Kelly, A. Renwick, A. Elliott, S. Reid, K. Spanova, R. Barfoot, T. Chagtai, H. Jayatilake, L. McGuffog, S. Hanks, D. G. Evans, D. Eccles, D. F. Easton y M. R. Stratton (2007). "PALB2, which encodes a BRCA2-interacting protein, is a breast cancer susceptibility gene." *Nat Genet* **39**(2): 165-7.
- Raya, A., I. Rodriguez-Piza, G. Guenechea, R. Vassena, S. Navarro, M. J. Barrero, A. Consiglio, M. Castella, P. Rio, E. Sleep, F. Gonzalez, G. Tiscornia, E. Garreta, T. Aasen, A. Veiga, I. M. Verma, J. Surralles, J. Bueren y J. C. Belmonte (2009). "Disease-corrected haematopoietic progenitors from Fanconi anaemia induced pluripotent stem cells." *Nature* **460**(7251): 53-9.
- Reid, S., D. Schindler, H. Hanenberg, K. Barker, S. Hanks, R. Kalb, K. Neveling, P. Kelly, S. Seal, M. Freund, M. Wurm, S. D. Batish, F. P. Lach, S. Yetgin, H. Neitzel, H. Ariffin, M. Tischkowitz, C. G. Mathew, A. D. Auerbach y N. Rahman (2007). "Biallelic mutations in PALB2 cause Fanconi anemia subtype FA-N and predispose to childhood cancer." *Nat Genet* **39**(2): 162-4.
- Reuter, T. Y., A. L. Medhurst, Q. Waisfisz, Y. Zhi, S. Herterich, H. Hoehn, H. J. Gross, H. Joenje, M. E. Hoatlin, C. G. Mathew y P. A. Huber (2003). "Yeast two-hybrid screens imply involvement of Fanconi anemia proteins in transcription

- regulation, cell signaling, oxidative metabolism, and cellular transport." *Exp Cell Res* **289**(2): 211-21.
- Rikova, K., A. Guo, Q. Zeng, A. Possemato, J. Yu, H. Haack, J. Nardone, K. Lee, C. Reeves, Y. Li, Y. Hu, Z. Tan, M. Stokes, L. Sullivan, J. Mitchell, R. Wetzel, J. Macneill, J. M. Ren, J. Yuan, C. E. Bakalarski, J. Villen, J. M. Kornhauser, B. Smith, D. Li, X. Zhou, S. P. Gygi, T. L. Gu, R. D. Polakiewicz, J. Rush y M. J. Comb (2007). "Global survey of phosphotyrosine signaling identifies oncogenic kinases in lung cancer." *Cell* **131**(6): 1190-203.
- Rio, P., N. W. Meza, A. Gonzalez-Murillo, S. Navarro, L. Alvarez, J. Surralles, M. Castella, G. Guenechea, J. C. Segovia, H. Hanenberg y J. A. Bueren (2008). "In vivo proliferation advantage of genetically corrected hematopoietic stem cells in a mouse model of Fanconi anemia FA-D1." *Blood* **112**(13): 4853-61.
- Rizzo, J. D., R. E. Curtis, G. Socie, K. A. Sobocinski, E. Gilbert, O. Landgren, L. B. Travis, W. D. Travis, M. E. Flowers, D. L. Friedman, M. M. Horowitz, J. R. Wingard y H. J. Deeg (2009). "Solid cancers after allogeneic hematopoietic cell transplantation." *Blood* **113**(5): 1175-83.
- Rosado, I. V., W. Niedzwiedz, A. F. Alpi y K. J. Patel (2009). "The Walker B motif in avian FANCM is required to limit sister chromatid exchanges but is dispensable for DNA crosslink repair." *Nucleic Acids Res* **37**(13): 4360-70.
- Rosenberg, P. S., G. Socie, B. P. Alter y E. Gluckman (2005). "Risk of head and neck squamous cell cancer and death in patients with Fanconi anemia who did and did not receive transplants." *Blood* **105**(1): 67-73.
- Rosselli, F., J. Sanceau, E. Gluckman, J. Wietzerbin y E. Moustacchi (1994). "Abnormal lymphokine production: a novel feature of the genetic disease Fanconi anemia. II. In vitro and in vivo spontaneous overproduction of tumor necrosis factor alpha." *Blood* **83**(5): 1216-25.
- Rosselli, F., J. Sanceau, J. Wietzerbin y E. Moustacchi (1992). "Abnormal lymphokine production: a novel feature of the genetic disease Fanconi anemia. I. Involvement of interleukin-6." *Hum Genet* **89**(1): 42-8.
- Rotem-Yehudar, R., E. Galperin y M. Horowitz (2001). "Association of insulin-like growth factor 1 receptor with EHD1 and SNAP29." *J Biol Chem* **276**(35): 33054-60.
- Rudd, M. F., R. D. Williams, E. L. Webb, S. Schmidt, G. S. Sellick y R. S. Houlston (2005). "The predicted impact of coding single nucleotide polymorphisms database." *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **14**(11 Pt 1): 2598-604.
- Ruppitsch, W., C. Meisslitzer, M. Hirsch-Kauffmann y M. Schweiger (1998). "Overexpression of thioredoxin in Fanconi anemia fibroblasts prevents the cytotoxic and DNA damaging effect of mitomycin C and diepoxybutane." *FEBS Lett* **422**(1): 99-102.
- Saadatzadeh, M. R., K. Bijangi-Vishehsaraei, P. Hong, H. Bergmann y L. S. Haneline (2004). "Oxidant hypersensitivity of Fanconi anemia type C-deficient cells is dependent on a redox-regulated apoptotic pathway." *J Biol Chem* **279**(16): 16805-12.
- Sarkar, S. A., R. Wong, S. I. Hackl, O. Moua, R. G. Gill, A. Wiseman, H. W. Davidson y J. C. Hutton (2007). "Induction of indoleamine 2,3-dioxygenase by interferon-gamma in human islets." *Diabetes* **56**(1): 72-9.
- Sasaki, M. S. (1975). "Is Fanconi's anaemia defective in a process essential to the repair of DNA cross links?" *Nature* **257**(5526): 501-3.
- Savino, M., A. Borriello, M. D'Apolito, M. Criscuolo, M. Del Vecchio, A. M. Bianco, M. Di Perna, R. Calzone, B. Nobili, A. Zatterale, L. Zelante, H. Joenje, F. Della

- Ragione y A. Savoia (2003). "Spectrum of FANCA mutations in Italian Fanconi anemia patients: identification of six novel alleles and phenotypic characterization of the S858R variant." Hum Mutat **22**(4): 338-9.
- Savino, M., L. Ianzano, P. Strippoli, U. Ramenghi, A. Arslanian, G. P. Bagnara, H. Joenje, L. Zelante y A. Savoia (1997). "Mutations of the Fanconi anemia group A gene (FAA) in Italian patients." Am J Hum Genet **61**(6): 1246-53.
- Savoia, A., A. Zatterale, D. Del Principe y H. Joenje (1996). "Fanconi anaemia in Italy: high prevalence of complementation group A in two geographic clusters." Hum Genet **97**(5): 599-603.
- Schauble, S., C. C. King, M. Darshi, A. Koller, K. Shah y S. S. Taylor (2007). "Identification of ChChd3 as a novel substrate of the cAMP-dependent protein kinase (PKA) using an analog-sensitive catalytic subunit." J Biol Chem **282**(20): 14952-9.
- Schenkman, J. B. y I. Jansson (2003). "The many roles of cytochrome b5." Pharmacol Ther **97**(2): 139-52.
- Schouten, J. P., C. J. McElgunn, R. Waaijer, D. Zwijnenburg, F. Diepvens y G. Pals (2002). "Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification." Nucleic Acids Res **30**(12): e57.
- Schroeder, T. M. (1966). "[Cytogenetic and cytologic findings in enzymopenic panmyelopathies and pancytopenias. Familial myelopathy of Fanconi, glutathione-reductase deficiency anemia and megaloblastic B12 deficiency anemia]." Humangenetik **2**(3): 287-316.
- Schuler, D., A. Kiss y F. Fabian (1969). "[Chromosome studies in Fanconi's anemia]." Orv Hetil **110**(13): 713-20 passim.
- Schwartz, G. F., K. S. Hughes, H. T. Lynch, C. J. Fabian, I. S. Fentiman, M. E. Robson, S. M. Domchek, L. C. Hartmann, R. Holland y D. J. Winchester (2008). "Proceedings of the international consensus conference on breast cancer risk, genetics, & risk management, April, 2007." Cancer **113**(10): 2627-37.
- Schwarz, K., A. Iolascon, F. Verissimo, N. S. Trede, W. Horsley, W. Chen, B. H. Paw, K. P. Hopfner, K. Holzmann, R. Russo, M. R. Esposito, D. Spano, L. De Falco, K. Heinrich, B. Joggerst, M. T. Rojewski, S. Perrotta, J. Denecke, U. Pannicke, J. Delaunay, R. Pepperkok y H. Heimpel (2009). "Mutations affecting the secretory COPII coat component SEC23B cause congenital dyserythropoietic anemia type II." Nat Genet **41**(8): 936-40.
- Seal, S., R. Barfoot, H. Jayatilake, P. Smith, A. Renwick, L. Bascombe, L. McGuffog, D. G. Evans, D. Eccles, D. F. Easton, M. R. Stratton y N. Rahman (2003). "Evaluation of Fanconi Anemia genes in familial breast cancer predisposition." Cancer Res **63**(24): 8596-9.
- Seal, S., D. Thompson, A. Renwick, A. Elliott, P. Kelly, R. Barfoot, T. Chagtai, H. Jayatilake, M. Ahmed, K. Spanova, B. North, L. McGuffog, D. G. Evans, D. Eccles, D. F. Easton, M. R. Stratton y N. Rahman (2006). "Truncating mutations in the Fanconi anemia J gene BRIP1 are low-penetrance breast cancer susceptibility alleles." Nat Genet **38**(11): 1239-41.
- Shahidi, N. T. y L. K. Diamond (1961). "Testosterone-induced remission in aplastic anemia of both acquired and congenital types. Further observations in 24 cases." N Engl J Med **264**: 953-67.
- Sharan, S. K., M. Morimatsu, U. Albrecht, D. S. Lim, E. Regel, C. Dinh, A. Sands, G. Eichele, P. Hasty y A. Bradley (1997). "Embryonic lethality and radiation hypersensitivity mediated by Rad51 in mice lacking Brca2." Nature **386**(6627): 804-10.

- Sheader, E. A., R. S. Benson y L. Best (2001). "Cytotoxic action of methylglyoxal on insulin-secreting cells." *Biochem Pharmacol* **61**(11): 1381-6.
- Shin, E. C., U. Seifert, S. Urban, K. T. Truong, S. M. Feinstone, C. M. Rice, P. M. Kloetzel y B. Rehmann (2007). "Proteasome activator and antigen-processing aminopeptidases are regulated by virus-induced type I interferon in the hepatitis C virus-infected liver." *J Interferon Cytokine Res* **27**(12): 985-90.
- Shiozaki, E. N., L. Gu, N. Yan y Y. Shi (2004). "Structure of the BRCT repeats of BRCA1 bound to a BACH1 phosphopeptide: implications for signaling." *Mol Cell* **14**(3): 405-12.
- Shivji, M. K. y A. R. Venkitaraman (2004). "DNA recombination, chromosomal stability and carcinogenesis: insights into the role of BRCA2." *DNA Repair (Amst)* **3**(8-9): 835-43.
- Shriver, M. D., L. Jin, R. Chakraborty y E. Boerwinkle (1993). "VNTR allele frequency distributions under the stepwise mutation model: a computer simulation approach." *Genetics* **134**(3): 983-93.
- Sims, A. E., E. Spiteri, R. J. Sims, 3rd, A. G. Arita, F. P. Lach, T. Landers, M. Wurm, M. Freund, K. Neveling, H. Hanenberg, A. D. Auerbach y T. T. Huang (2007). "FANCI is a second monoubiquitinated member of the Fanconi anemia pathway." *Nat Struct Mol Biol* **14**(6): 564-7.
- Singh, T. R., S. T. Bakker, S. Agarwal, M. Jansen, E. Grassman, B. C. Godthelp, A. M. Ali, C. H. Du, M. A. Rooimans, Q. Fan, K. Wahengbam, J. Steltenpool, P. R. Andreassen, D. A. Williams, H. Joenje, J. P. de Winter y A. R. Meetei (2009). "Impaired FANCD2 monoubiquitination and hypersensitivity to camptothecin uniquely characterize Fanconi anemia complementation group M." *Blood*.
- Smith, M. T. (1996). "Overview of benzene-induced aplastic anaemia." *Eur J Haematol Suppl* **60**: 107-10.
- Smogorzewska, A., S. Matsuoka, P. Vinciguerra, E. R. McDonald, 3rd, K. E. Hurov, J. Luo, B. A. Ballif, S. P. Gygi, K. Hofmann, A. D. D'Andrea y S. J. Elledge (2007). "Identification of the FANCI protein, a monoubiquitinated FANCD2 paralog required for DNA repair." *Cell* **129**(2): 289-301.
- Soulier, J., T. Leblanc, J. Larghero, H. Dastot, A. Shimamura, P. Guardiola, H. Esperou, C. Ferry, C. Jubert, J. P. Feugeas, A. Henri, A. Toubert, G. Socie, A. Baruchel, F. Sigaux, A. D. D'Andrea y E. Gluckman (2005). "Detection of somatic mosaicism and classification of Fanconi anemia patients by analysis of the FA/BRCA pathway." *Blood* **105**(3): 1329-36.
- Strathdee, C. A., H. Gavish, W. R. Shannon y M. Buchwald (1992a). "Cloning of cDNAs for Fanconi's anaemia by functional complementation." *Nature* **356**(6372): 763-7.
- Strathdee, C. A., H. Gavish, W. R. Shannon y M. Buchwald (1992b). "Cloning of cDNAs for Fanconi's anaemia by functional complementation." *Nature* **358**(6385): 434.
- Sullivan, D. C., L. Huminiecki, J. W. Moore, J. J. Boyle, R. Poulosom, D. Creamer, J. Barker y R. Bicknell (2003). "EndoPDI, a novel protein-disulfide isomerase-like protein that is preferentially expressed in endothelial cells acts as a stress survival factor." *J Biol Chem* **278**(47): 47079-88.
- Surrallés, J., S. P. Jackson, M. Jasin, M. B. Kastan, S. C. West y H. Joenje (2004). "Molecular cross-talk among chromosome fragility syndromes." *Genes Dev* **18**(12): 1359-70.

- Sy, S. M., M. S. Huen y J. Chen (2009). "PALB2 is an integral component of the BRCA complex required for homologous recombination repair." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(17): 7155-60.
- Tang, B. L., J. Kausalya, D. Y. Low, M. L. Lock y W. Hong (1999). "A family of mammalian proteins homologous to yeast Sec24p." Biochem Biophys Res Commun **258**(3): 679-84.
- Taniguchi, T., I. Garcia-Higuera, P. R. Andreassen, R. C. Gregory, M. Grompe y A. D. D'Andrea (2002a). "S-phase-specific interaction of the Fanconi anemia protein, FANCD2, with BRCA1 and RAD51." Blood **100**(7): 2414-20.
- Taniguchi, T., I. Garcia-Higuera, B. Xu, P. R. Andreassen, R. C. Gregory, S. T. Kim, W. S. Lane, M. B. Kastan y A. D. D'Andrea (2002b). "Convergence of the fanconi anemia and ataxia telangiectasia signaling pathways." Cell **109**(4): 459-72.
- Timmers, C., T. Taniguchi, J. Hejna, C. Reifsteck, L. Lucas, D. Bruun, M. Thayer, B. Cox, S. Olson, A. D. D'Andrea, R. Moses y M. Grompe (2001). "Positional cloning of a novel Fanconi anemia gene, FANCD2." Mol Cell **7**(2): 241-8.
- Tipping, A. J., T. Pearson, N. V. Morgan, R. A. Gibson, L. P. Kuyt, C. Havenga, E. Gluckman, H. Joenje, T. de Ravel, S. Jansen y C. G. Mathew (2001). "Molecular and genealogical evidence for a founder effect in Fanconi anemia families of the Afrikaner population of South Africa." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(10): 5734-9.
- Tischkowitz, M., B. Xia, N. Sabbaghian, J. S. Reis-Filho, N. Hamel, G. Li, E. H. van Beers, L. Li, T. Khalil, L. A. Quenneville, A. Omeroglu, A. Poll, P. Lepage, N. Wong, P. M. Nederlof, A. Ashworth, P. N. Tonin, S. A. Narod, D. M. Livingston y W. D. Foulkes (2007). "Analysis of PALB2/FANCD2-associated breast cancer families." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(16): 6788-93.
- Tonnies, H., S. Huber, J. S. Kuhl, A. Gerlach, W. Ebell y H. Neitzel (2003). "Clonal chromosomal aberrations in bone marrow cells of Fanconi anemia patients: gains of the chromosomal segment 3q26q29 as an adverse risk factor." Blood **101**(10): 3872-4.
- Tremblay, C. S., F. F. Huang, O. Habi, C. C. Huard, C. Godin, G. Levesque y M. Carreau (2008). "HES1 is a novel interactor of the Fanconi anemia core complex." Blood **112**(5): 2062-70.
- Trotta, R., D. Ciarlariello, J. Dal Col, J. Allard, 2nd, P. Neviani, R. Santhanam, H. Mao, B. Becknell, J. Yu, A. K. Ferketich, B. Thomas, A. Modi, B. W. Blaser, D. Perrotti y M. A. Caligiuri (2007). "The PP2A inhibitor SET regulates natural killer cell IFN-gamma production." J Exp Med **204**(10): 2397-405.
- Umegaki, K., A. Sugisawa, S. J. Shin, K. Yamada y M. Sano (2001). "Different onsets of oxidative damage to DNA and lipids in bone marrow and liver in rats given total body irradiation." Free Radic Biol Med **31**(9): 1066-74.
- Unlu, M., M. E. Morgan y J. S. Minden (1997). "Difference gel electrophoresis: a single gel method for detecting changes in protein extracts." Electrophoresis **18**(11): 2071-7.
- Uziel, O., H. Reshef, A. Ravid, I. Fabian, D. Halperin, R. Ram, M. Bakhanashvili, J. Nordenberg y M. Lahav (2008). "Oxidative stress causes telomere damage in Fanconi anaemia cells - a possible predisposition for malignant transformation." Br J Haematol **142**(1): 82-93.
- van Zeeburg, H. J., P. J. Snijders, T. Wu, E. Gluckman, J. Soulier, J. Surralles, M. Castella, J. E. van der Wal, J. Wennerberg, J. Califano, E. Velleuer, R. Dietrich, W. Ebell, E. Bloemena, H. Joenje, C. R. Leemans y R. H. Brakenhoff (2008).

- "Clinical and molecular characteristics of squamous cell carcinomas from Fanconi anemia patients." *J Natl Cancer Inst* **100**(22): 1649-53.
- Vas, V., R. Fajka-Boja, G. Ion, V. Dudics, E. Monostori y F. Uher (2005). "Biphasic effect of recombinant galectin-1 on the growth and death of early hematopoietic cells." *Stem Cells* **23**(2): 279-87.
- Vidarsson, H., E. K. Mikalsdottir, T. Rafnar, D. Bertwistle, A. Ashworth, J. E. Eyfjord y S. Valgeirsdottir (2002). "BRCA1 and BRCA2 bind Stat5a and suppress its transcriptional activity." *FEBS Lett* **532**(1-2): 247-52.
- Vives-Corrons, J. L., H. Rubinson-Skala, M. Mateo, J. Estella, E. Feliu y J. C. Dreyfus (1978). "Triosephosphate isomerase deficiency with hemolytic anemia and severe neuromuscular disease: familial and biochemical studies of a case found in Spain." *Hum Genet* **42**(2): 171-80.
- Vlassara, H. y M. R. Palace (2002). "Diabetes and advanced glycation endproducts." *J Intern Med* **251**(2): 87-101.
- Von Eggeling, F., A. Gawriljuk, W. Fiedler, G. Ernst, U. Claussen, J. Klose y I. Romer (2001). "Fluorescent dual colour 2D-protein gel electrophoresis for rapid detection of differences in protein pattern with standard image analysis software." *Int J Mol Med* **8**(4): 373-7.
- von Zglinicki, T. (2002). "Oxidative stress shortens telomeres." *Trends Biochem Sci* **27**(7): 339-44.
- Wagner, J. E., J. Tolar, O. Levrán, T. Scholl, A. Deffenbaugh, J. Satagopan, L. Ben-Porat, K. Mah, S. D. Batish, D. I. Kutler, M. L. MacMillan, H. Hanenberg y A. D. Auerbach (2004). "Germline mutations in BRCA2: shared genetic susceptibility to breast cancer, early onset leukemia, and Fanconi anemia." *Blood* **103**(8): 3226-9.
- Wajant, H., K. Pfizenmaier y P. Scheurich (2003). "Tumor necrosis factor signaling." *Cell Death Differ* **10**(1): 45-65.
- Wajnrajch, M. P., J. M. Gertner, Z. Huma, J. Popovic, K. Lin, P. C. Verlander, S. D. Batish, P. F. Giampietro, J. G. Davis, M. I. New y A. D. Auerbach (2001). "Evaluation of growth and hormonal status in patients referred to the International Fanconi Anemia Registry." *Pediatrics* **107**(4): 744-54.
- Walsh, T. y M. C. King (2007). "Ten genes for inherited breast cancer." *Cancer Cell* **11**(2): 103-5.
- Wang, X., P. R. Andreassen y A. D. D'Andrea (2004). "Functional interaction of monoubiquitinated FANCD2 and BRCA2/FANCD1 in chromatin." *Mol Cell Biol* **24**(13): 5850-62.
- Wang, X., R. D. Kennedy, K. Ray, P. Stuckert, T. Ellenberger y A. D. D'Andrea (2007). "Chk1-mediated phosphorylation of FANCE is required for the Fanconi anemia/BRCA pathway." *Mol Cell Biol* **27**(8): 3098-108.
- Whitmore, S. A., J. Crawford, S. Apostolou, H. Eyre, E. Baker, K. M. Lower, C. Settasatian, S. Goldup, R. Seshadri, R. A. Gibson, C. G. Mathew, A. M. Cleton-Jansen, A. Savoia, J. C. Pronk, A. D. Auerbach, N. A. Doggett, G. R. Sutherland y D. F. Callen (1998). "Construction of a high-resolution physical and transcription map of chromosome 16q24.3: a region of frequent loss of heterozygosity in sporadic breast cancer." *Genomics* **50**(1): 1-8.
- Whitney, M. A., H. Saito, P. M. Jakobs, R. A. Gibson, R. E. Moses y M. Grompe (1993). "A common mutation in the FACC gene causes Fanconi anaemia in Ashkenazi Jews." *Nat Genet* **4**(2): 202-5.
- Wijker, M., N. V. Morgan, S. Herterich, C. G. van Berkel, A. J. Tipping, H. J. Gross, J. J. Gille, G. Pals, M. Savino, C. Altay, S. Mohan, I. Dokal, J. Cavenagh, J.

- Marsh, M. van Weel, J. J. Ortega, D. Schuler, E. Samochatova, M. Karwacki, A. N. Bekassy, M. Abecasis, W. Ebell, M. L. Kwee, T. de Ravel, C. G. Mathew y et al. (1999). "Heterogeneous spectrum of mutations in the Fanconi anaemia group A gene." *Eur J Hum Genet* **7**(1): 52-9.
- Williams, A. J. y L. S. Kaguni (1995). "Stimulation of Drosophila mitochondrial DNA polymerase by single-stranded DNA-binding protein." *J Biol Chem* **270**(2): 860-5.
- Wilson, J. B., K. Yamamoto, A. S. Marriott, S. Hussain, P. Sung, M. E. Hoatlin, C. G. Mathew, M. Takata, L. H. Thompson, G. M. Kupfer y N. J. Jones (2008). "FANCG promotes formation of a newly identified protein complex containing BRCA2, FANCD2 and XRCC3." *Oncogene* **27**(26): 3641-52.
- Xia, B., J. C. Dorsman, N. Ameziane, Y. de Vries, M. A. Rooimans, Q. Sheng, G. Pals, A. Errami, E. Gluckman, J. Llera, W. Wang, D. M. Livingston, H. Joenje y J. P. de Winter (2007). "Fanconi anemia is associated with a defect in the BRCA2 partner PALB2." *Nat Genet* **39**(2): 159-61.
- Xia, B., Q. Sheng, K. Nakanishi, A. Ohashi, J. Wu, N. Christ, X. Liu, M. Jasin, F. J. Couch y D. M. Livingston (2006). "Control of BRCA2 cellular and clinical functions by a nuclear partner, PALB2." *Mol Cell* **22**(6): 719-29.
- Yagasaki, H., S. Hamanoue, T. Oda, T. Nakahata, S. Asano y T. Yamashita (2004). "Identification and characterization of novel mutations of the major Fanconi anemia gene FANCA in the Japanese population." *Hum Mutat* **24**(6): 481-90.
- Yamashita, T., N. Wu, G. Kupfer, C. Corless, H. Joenje, M. Grompe y A. D. D'Andrea (1996). "Clinical variability of Fanconi anemia (type C) results from expression of an amino terminal truncated Fanconi anemia complementation group C polypeptide with partial activity." *Blood* **87**(10): 4424-32.
- Youssofian, H. (1994). "Localization of Fanconi anemia C protein to the cytoplasm of mammalian cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(17): 7975-9.
- Youssofian, H. (1996). "Natural gene therapy and the Darwinian legacy." *Nat Genet* **13**(3): 255-6.
- Yu, B., N. A. Sawyer, C. Chiu, P. J. Oefner y P. A. Underhill (2006). "DNA mutation detection using denaturing high-performance liquid chromatography (DHPLC)." *Curr Protoc Hum Genet* **Chapter 7**: Unit7 10.
- Zhang, M. Q. (1998). "Statistical features of human exons and their flanking regions." *Hum Mol Genet* **7**(5): 919-32.
- Zhang, Q. S., L. Eaton, E. R. Snyder, S. Houghtaling, J. B. Mitchell, M. Finegold, C. Van Waes y M. Grompe (2008). "Tempol protects against oxidative damage and delays epithelial tumor onset in Fanconi anemia mice." *Cancer Res* **68**(5): 1601-8.
- Zou, L. y S. J. Elledge (2003). "Sensing DNA damage through ATRIP recognition of RPA-ssDNA complexes." *Science* **300**(5625): 1542-8.

VIII. ANEXOS

Anexo 1:

“Clinical and molecular characteristics of squamous cell carcinomas from Fanconi anemia patients”.

J Natl Cancer Inst. 2008 Nov 19;100(22):1649-53.

Clinical and Molecular Characteristics of Squamous Cell Carcinomas From Fanconi Anemia Patients

Hester J. T. van Zeeburg, Peter J. F. Snijders, Thijs Wu, Eliane Gluckman, Jean Soulier, Jordi Surrallés, Maria Castella, Jacqueline E. van der Wal, Johan Wennerberg, Joseph Califano, Eunike Velleuer, Ralf Dietrich, Wolfram Ebell, Elisabeth Bloemena, Hans Joenje, C. René Leemans, Ruud H. Brakenhoff

Fanconi anemia is a recessively inherited disease that is characterized by congenital abnormalities, bone marrow failure, and a predisposition to develop cancer, particularly squamous cell carcinomas (SCCs) in the head and neck and anogenital regions. Previous studies of Fanconi anemia SCCs, mainly from US patients, revealed the presence of high-risk human papillomavirus (HPV) DNA in 21 (84%) of 25 tumors analyzed. We examined a panel of 21 SCCs mainly from European Fanconi anemia patients (n = 19 FA patients; 16 head and neck squamous cell carcinomas [HNSCCs], 2 esophageal SCCs, and 3 anogenital SCCs) for their clinical and molecular characteristics, including patterns of allelic loss, *TP53* mutations, and the presence of HPV DNA by GP5+/6+ polymerase chain reaction. HPV DNA was detected in only two (10%) of 21 tumors (both anogenital SCCs) but in none of the 16 HNSCCs. Of the 18 tumors analyzed, 10 contained a *TP53* mutation. The patterns of allelic loss were comparable to those generally found in sporadic SCCs. Our data show that HPV does not play a major role in squamous cell carcinogenesis in this cohort of Fanconi anemia patients and that the Fanconi anemia SCCs are genetically similar to sporadic SCCs despite having a different etiology.

J Natl Cancer Inst 2008;100:1649–1653

Fanconi anemia is a recessively inherited disease that is characterized by congenital abnormalities, aplastic anemia, and a predisposition for the development of cancer. The disease is caused by defects in the Fanconi anemia–BRCA pathway, a response network involved in DNA damage repair (1). Cells from Fanconi anemia patients are hypersensitive to DNA cross-linking agents, such as cisplatin and mitomycin C, and display chromosome instability (2,3). The major life-threatening symptoms of Fanconi anemia—aplastic anemia and the development of acute myeloid leukemia—can be managed by treatments that include bone marrow transplantation. However, Fanconi anemia patients also have a 500- to 1000-fold increased risk of developing squamous cell carcinoma (SCC) (4), particularly squamous cell carcinoma of the mucosal linings of the head and neck region (HNSCC), which is now rapidly becoming a major cause of mortality in these patients. Bone marrow transplantation and graft vs host disease further increase the risk of developing SCC in Fanconi anemia patients (5).

The reason for the extremely high frequency of SCC in Fanconi anemia patients is unclear. In the general population, the most common risk factors for the development of SCC, particularly HNSCC, are tobacco smoking and alcohol consumption. However, in recent years, it has become clear that infection with high-risk human papillomaviruses (HPVs), which are known to cause cervical cancer, is also associated with a proportion of HNSCCs. For example, in the Netherlands, HPV is involved in approximately 10% of sporadic SCCs in the oral cavity and oropharynx (6). HPV involvement is usually assessed by a polymerase chain reaction (PCR) assay to detect the viral DNA in the tumor. However, because this method can lead to false-positive results, measurement of the actual transcriptional activity of the viral oncogenes by reverse transcription–polymerase chain reaction (RT-PCR) is currently considered the most reliable test for HPV involvement in HNSCC. However, RT-PCR can only be used to amplify RNA of frozen specimens, whereas in many studies,

only formalin-fixed paraffin-embedded specimens are available. As an alternative, surrogate markers that can be analyzed on formalin-fixed paraffin-embedded specimens could be used, in addition to HPV DNA PCR, to detect HPV infection more reliably. For example, the genetic profiles of HNSCCs with transcriptionally active HPV differ from those of HNSCC without HPV and could be used to confirm HPV infection in a tumor (6). Absence of mutations in the *TP53* gene could also be used as a surrogate marker for HPV infection: Because the HPV E6 oncoprotein inactivates p53, mutations in the *TP53* gene are usually not observed in HPV-infected tumors, but are found in 50% of HNSCCs without HPV (6,7). Overexpression of *CDKN2A*, the gene that encodes p16^{Ink4}, has also been used as a surrogate marker for HPV infection. In particular, p16^{Ink4} immunostaining followed by HPV DNA PCR on the p16^{Ink4}-positive cases has been shown to be a highly sensitive and specific assay system to assess the presence of transcriptionally active HPV in tumors, including formalin-fixed paraffin-embedded specimens (8).

Affiliations of authors: Department of Otolaryngology/Head and Neck Surgery, Section Tumor Biology (HJTvZ, TW, CRL, RHB), Department of Pathology (PJFS, EB), Department of Clinical Genetics (HJ), VU University Medical Center, Amsterdam, the Netherlands; Department of Hematology, Saint Louis Hospital, Paris, France (EG, J. Soulier); Department of Genetics and Microbiology, Autonomous University of Barcelona and Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras, ISCIII, Bellaterra, Spain (J. Surrallés, MC); Department of Pathology, University Medical Center, Groningen, the Netherlands (JEvdW); Department of Otorhinolaryngology/Head-Neck Surgery, University Hospital, Lund, Sweden (JW); Department of Otolaryngology/Head-Neck Surgery, Johns Hopkins Medical Institute, Baltimore, MD (JC); Children's Clinic, Heinrich-Heine University, Düsseldorf, Germany (EV); Fanconi-Anämie Hilfe e.V., Unna-Siddinghausen, Germany (RD); Department of Pediatrics, Charité-CVK, University of Medicine, Berlin, Germany (WE).

Correspondence to: Ruud H. Brakenhoff, PhD, Department of Otolaryngology/Head-Neck Surgery, Section Tumor Biology, VU University Medical Center, PO Box 7057, 1007 MB Amsterdam, the Netherlands (e-mail: rh.brakenhoff@vumc.nl).

See "Funding" and "Notes" following "References."

DOI: 10.1093/jnci/djn366

© The Author 2008. Published by Oxford University Press. All rights reserved. For Permissions, please e-mail: journals.permissions@oxfordjournals.org.

CONTEXT AND CAVEATS

Prior knowledge

Fanconi anemia is a rare recessively inherited disease that is characterized by congenital abnormalities, bone marrow failure, and a predisposition to develop cancer, particularly squamous cell carcinomas (SCCs) in the head and neck (HNSCCs) and anogenital regions. In previous studies of mostly US Fanconi anemia patients, high-risk human papillomavirus (HPV) DNA was detected in the majority of the SCCs analyzed.

Study design

An examination of the clinical and molecular characteristics of 21 SCCs (16 HNSCCs, 2 esophageal SCCs, and 3 anogenital SCCs) from 19 mostly European Fanconi anemia patients, including the presence of HPV DNA, allelic loss patterns, and *TP53* mutations.

Contribution

HPV DNA was detected in only two of 21 tumors (both anogenital SCCs) but in none of the 16 HNSCCs. Ten of 18 SCCs analyzed contained a *TP53* mutation. The patterns of allelic loss for the Fanconi anemia SCCs were similar to those found in sporadic SCCs, despite the differing etiologies of these tumors.

Implications

The role of HPV infection in squamous cell carcinogenesis may differ among cohorts of Fanconi anemia patients.

Limitations

The number of tumor samples analyzed was small.

From the Editors

Kutler et al. (9) reported that 21 (84%) of 25 SCCs from US Fanconi anemia patients had detectable levels of HPV DNA. However, in a pilot study, we failed to detect HPV DNA in four Fanconi anemia SCC cell lines or the corresponding primary tumors from which they were derived (10,11). Here, we examined the clinical and molecular characteristics of SCCs from a larger cohort of mostly European Fanconi anemia patients.

Via a network of mostly European head and neck surgeons and Fanconi anemia patient support groups, we obtained clinical information and resected specimens of 21 SCCs from 19 Fanconi anemia patients. Tumors were staged according to International Union Against Cancer guidelines

(12). This study was approved by the Institutional Review Board of the Vrije Universiteit Medical Center and carried out according to Dutch guidelines for the analysis of human samples. Relevant clinical data are listed in Supplementary Table 1 (available online). Of the 21 specimens that we received, 19 were formalin fixed and paraffin embedded and 2 were frozen. In one case, we received only a few sections of formalin-fixed paraffin-embedded tumor tissue. In all cases except the latter, 5- μ m thick sections were stained with hematoxylin-eosin and evaluated by an experienced pathologist (E. Bloemena) for histological examination and to delineate areas of neoplastic and normal tissue for microdissection, as previously described (13). Before we cut sections of each specimen, we cleaned the microtome and changed the knife to avoid cross contamination between samples. DNA was isolated from microdissected normal and tumor tissue using proteinase K treatment, phenol-chloroform extraction, and ethanol precipitation and used for genetic analysis and HPV DNA detection. The allelic loss profiles were determined using 23 microsatellite markers at chromosomes 3p, 8p, 9p, 13q, 17q, and 18q, as previously described (10). Immunostaining for p53 and *TP53* mutation analysis was performed as previously described (14,15). For *TP53* mutation analysis, we analyzed exons 5–9 because the large majority of mutations occur there. For p16 immunohistochemistry, we used a CINtec p16^{ink4a} histology kit (DakoCytomation BV, Heverlee, Belgium). Both positive and negative control specimens were included in every immunostaining run. Immunostaining was evaluated by the study pathologist (E. Bloemena). Immunostaining in more than 50% of the tumor cells was considered positive (8). HPV DNA detection was performed by using a GP5+/6+ PCR enzyme immunoassay that included an oligoprobe cocktail for 14 high-risk HPV types (HPV16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, and 68), as previously described (16). Samples were considered HPV DNA positive in the GP5+/6+ PCR enzyme assay when the optical density value was at least three times the value of the blanks without DNA template measured in triplicate. PCR amplification of the β -globin (*HBB*) gene was carried out in a separate assay to control for the integrity of the template DNA.

Negative controls (solvent instead of DNA) and positive controls (serial dilution of DNA isolated from SiHa, a cervical carcinoma cell line that contains 1–2 copies of HPV16 DNA) were run in parallel in each assay. GP5+/6+ PCR enzyme immunoassay-positive cases were subsequently typed for HPV by reverse line blot genotyping and subjected to viral load analysis, as previously described (16).

Our panel of tumors consisted of 16 HNSCCs, 2 esophageal SCCs, and 3 anogenital SCCs. Of the 19 Fanconi anemia patients in this study, 10 had received a bone marrow transplant; these patients were approximately 6 years younger at SCC diagnosis than those who had not received a bone marrow transplant (median age at SCC diagnosis, bone marrow transplant vs no bone marrow transplant: 24.9 vs 30.7 years, log-rank $P = .009$; Supplementary Figure 1, available online). All 21 SCCs were tested for the presence of HPV DNA by GP5+/6+ PCR, and only two—both anogenital SCCs—were positive; one HPV DNA-positive tumor had HPV16 (237 copies per cell) and the other had HPV33 (22 copies per cell). In parallel, we subjected 18 SCCs with sufficient material for analysis to p16 and p53 immunostaining and *TP53* mutation analysis. Of the 18 SCCs tested, five were positive for p16 immunostaining, including the two that were HPV DNA positive, and eight were positive for p53 immunostaining. The two HPV DNA-positive SCCs were negative for p53 immunostaining. *TP53* mutations were detected in 10 of 18 SCCs. As expected, both of the HPV DNA-positive SCCs had wild-type *TP53* (Table 1 and Supplementary Table 2, available online).

As an additional surrogate marker for HPV infection and to compare the genetic profiles of SCCs in Fanconi anemia patients with those of sporadic tumors in the general population, we further analyzed allelic loss profiles using microsatellite markers located at chromosome arms that frequently display allelic losses in HPV DNA-negative sporadic HNSCCs (ie, chromosome arms 3p, 8p, 9p, 13q, 17q, and 18q) (15,17). We were also able to assess allelic loss patterns for three SCCs from patients who had received a bone marrow transplant (Fa3, Fa8, and Fa17). SCCs from the other seven patients who

Table 1. Human papillomavirus (HPV) DNA status, p16 and p53 immunohistochemistry (IHC), and *TP53* mutation status of Fanconi anemia squamous cell carcinomas by anatomical region

Anatomical region	n	No. HPV DNA–positive/ No. tested	No. p16 IHC–positive/ No. tested	No. p53 IHC–positive/ No. tested	No. with <i>TP53</i> mutation/No. tested
Head and neck	16	0/16	2/13	6/13	8/13
Esophagus	2	0/2	0/2	1/2	1/2
Anogenital	3	2/3	3/3	1/3	1/3
Total	21	2/21	5/18	8/18	10/18

had undergone bone marrow transplantation could not be analyzed due to the presence of donor-derived tumor-infiltrating lymphocytes that caused mixed allelic loss patterns (Supplementary Figure 2, available online). All of the HPV DNA–negative SCCs except one (Fa18) showed many allelic losses (more than 50% of the informative markers; Figure 1), which is a pattern that is typical for HPV DNA–negative sporadic SCC. By contrast, the two HPV DNA–positive tumors—Fa5 and Fa13—showed fewer allelic losses (fewer than

20% of the informative markers in each), which is characteristic of sporadic HPV-infected tumors in the general population (6,7). The HPV DNA–negative SCC Fa18 also showed relatively few allelic losses, which might suggest that the HPV DNA PCR result for this sample was a false negative. However, the negative HPV DNA status of SCC Fa18 was confirmed by its lack of p16 immunostaining (Supplementary Table 2, available online). Such genetically normal tumors also occur in sporadic SCC (18). Hence, all immunostaining and

genetic data support our conclusion that the large majority of SCCs in this panel of Fanconi anemia patients were not induced by HPV.

Several lines of evidence suggest that donor stem cells in patients who received bone marrow or stem cell transplants as part of the treatment for leukemia or other clinical indications might differentiate and become part of the squamous tissues of the transplanted patient (19). There has also been an indication that such donor cells could develop into skin

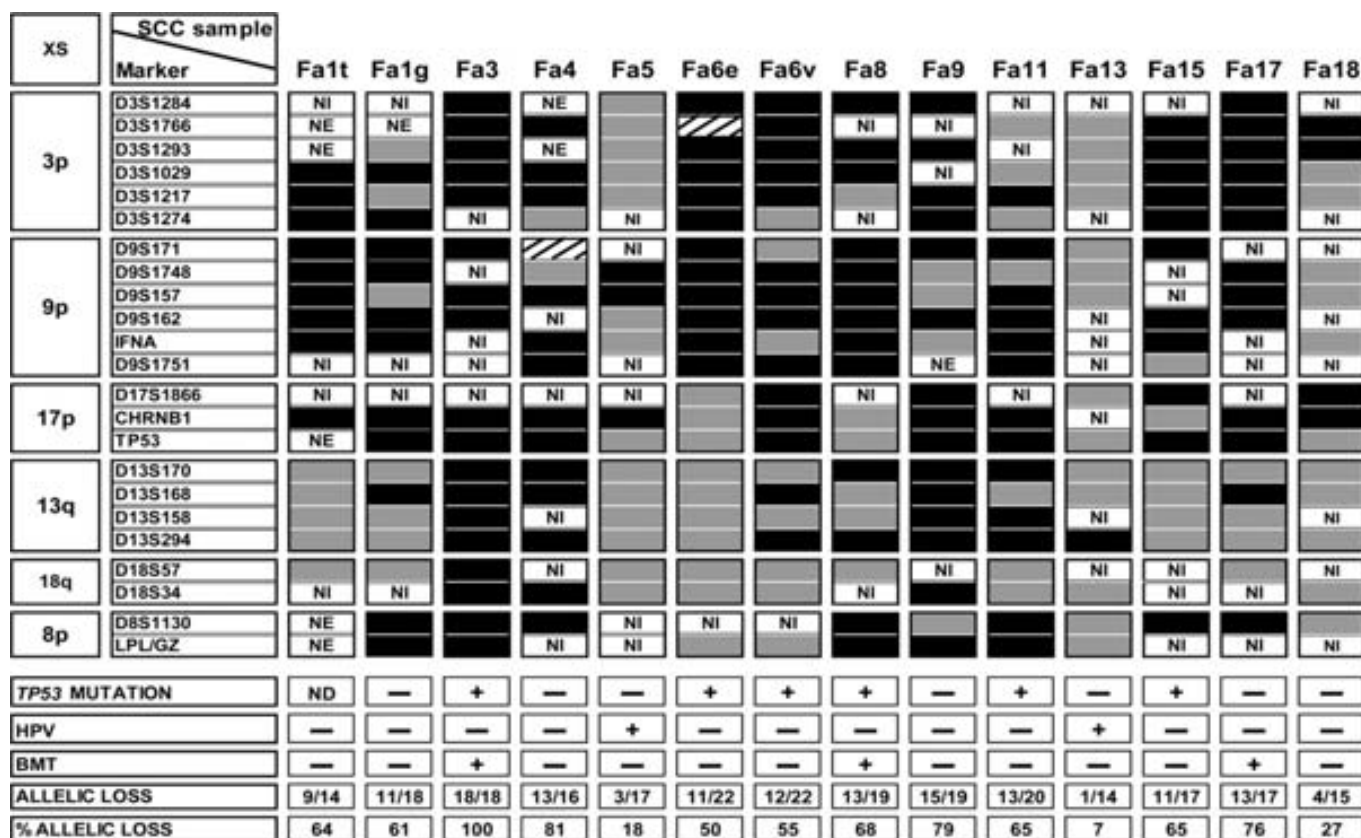


Figure 1. Patterns of allelic loss in Fanconi anemia squamous cell carcinomas. All tumors that could be analyzed for allelic imbalances are depicted, including tumors from patients who underwent bone marrow transplantation that could be microdissected without contamination by donor cells (Fa3, Fa8, and Fa17). Also indicated are *TP53* mutations, presence of HPV DNA, bone marrow transplantation status, and

allelic loss frequency (%: number of markers with allelic loss divided by the total number of informative markers). **Black boxes** indicate allelic loss (a change in the microsatellite allele ratios of more than 50% in the tumor DNA compared with genetically normal DNA isolated from the stroma), **gray boxes** indicate no allelic loss, and **boxes with diagonal lines** indicate microsatellite instability. Presence and absence

of a *TP53* mutation or HPV DNA in the tumor genome or of receipt of bone marrow transplantation are indicated with + and –, respectively. The specific *TP53* mutations are listed in Supplementary Table 2 (available online). XS = chromosome; SCC = squamous cell carcinoma; NI = not informative; NE = not evaluable; ND = not determined; HPV = human papillomavirus; BMT = bone marrow transplant.

cancer in transplanted patients (20). We therefore used DNA fingerprinting to examine whether SCCs that had developed in the Fanconi anemia patients who had undergone bone marrow transplantation were derived from the donor's or the patient's cells. Each of the seven tumors that could be analyzed (Fa3, Fa8, Fa10, Fa16, Fa17, Fa19, and Fa21) was clearly derived from patient's cells (an example of this analysis is shown in Supplementary Table 2, available online).

The most prominent finding in this study is that HPV DNA was detected in only two (10%) of 21 Fanconi anemia SCCs. This finding was based on HPV DNA detection and supported by assessment of surrogate markers of HPV infection, such as p16 immunostaining, p53 immunostaining, *TP53* mutation analysis, and allelic loss profiling of the tumors (6,7). This observation is in distinct contrast to a previous report, in which 21 (84%) of 25 Fanconi anemia SCCs were positive for HPV DNA (9). Further comparison of the data from this study and the previous report (9) revealed similar proportions of HPV DNA-positive anogenital SCCs (two of three anogenital SCCs in this study were HPV DNA positive vs six of seven in the previous study) (9). However, there was a clear and statistically significant difference between these studies in the proportion of HPV DNA-positive HNSCCs: 0 (0%) of 16 in our series vs 15 (83%) of 18 in the previous series ($P < .001$) (9). How can we explain this striking difference? Similar methods for HPV DNA detection were used in the two studies. It is noteworthy that some of the laser-dissected specimens in the previous report had a relatively low viral load (range = 0.16–249.3 copies per cell) (9), suggesting that in at least some cases, the HPV infections might not have been clinically relevant. Results of a previous study in microdissected HNSCCs suggested that viral loads of at least 0.5–1 HPV genome per cell should be expected to represent a biologically relevant infection of transcriptionally active HPV (8). However, it is unlikely that the difference in HPV prevalence between our series and the previous series can be explained completely by a few cases with low viral load in the earlier study (9). The high HPV prevalence in the earlier report was supported by the absence

of *TP53* mutations in the Fanconi anemia SCCs (9). It is therefore likely that the difference between the two studies may also be explained, at least in part, by geographic differences in the prevalence of HPV infection (21). For example, in a case-control study in Baltimore, D'Souza et al. (22) reported that 72% of a cohort of sporadic oropharyngeal tumors were HPV infected; by contrast, only 16% of oropharyngeal SCCs from patients in the Amsterdam region were HPV infected, a puzzling observation (6). The previously reported series (9) included tumors that were mainly from US Fanconi anemia patients, whereas most of the SCCs in our series (89%) were from European Fanconi anemia patients.

Our observation that HPV does not seem to play a role in head and neck SCCs in Fanconi anemia patients, at least in Europe, might have important clinical consequences. Vaccination against some HPV subtypes has been shown to prevent HPV-associated anogenital diseases (23). Our data indicate that HPV vaccination of Fanconi anemia patients might prevent only a proportion of anogenital SCCs, and no HNSCCs, at least among European patients. Frequent surveillance of the mucosal linings, particularly in the head and neck region, therefore remains indicated for Fanconi anemia patients in all countries. Dutch pediatric oncology guidelines recommend that all Fanconi anemia patients undergo inspection of the head and neck region every 3 months beginning at 10 years of age, as well as a yearly anogenital inspection for female patients beginning at the age of menarche. Screening and monitoring of precancerous lesions remain the most important approach to detect SCCs at the earliest possible stage regardless of HPV vaccination, particularly because the treatment options for SCCs in Fanconi anemia patients are limited.

The patterns of allelic loss we found suggest that the chromosomes involved in Fanconi anemia SCCs are similar to those involved in sporadic SCCs. Although the etiology of Fanconi anemia HNSCCs (a DNA repair deficiency causing genetic alterations) differs from that of most sporadic SCCs (tobacco smoking and alcohol consumption), the same cancer genes and chromosomal locations seem to be targeted in both types of SCCs. Our finding

that SCCs of Fanconi anemia patients and SCCs in the general patient population have identical patterns of allelic loss might be exploited for the early diagnosis of cancer and precancerous lesions in Fanconi anemia patients. Analysis of the allelic loss pattern of biopsy specimens facilitates accurate diagnosis and assessment of the risk of malignant transformation of visible oral lesions in the general population, and the same approach could be followed for Fanconi anemia patients to improve the clinical management of such lesions (24). Unfortunately, most preneoplastic changes in the oral mucosa are not visible by eye, which limits early detection of mucosal regions that are at increased risk of malignant transformation. Noninvasive genetic screening to detect these mucosal regions might therefore be of value to improve the early detection of cancer and precancerous lesions in Fanconi anemia patients (25).

A limitation of this work is our small sample size of 21 tumors from only 19 patients. A larger cohort of samples might substantiate the data. However, Fanconi anemia is a relatively rare disease, and it takes a major effort to collect samples and clinical information for these patients. In future studies, it will be important to exchange samples between studies to formally and definitively rule out that minor differences in methodologies might influence the findings.

References

1. Wang W. Emergence of a DNA-damage response network consisting of Fanconi anaemia and BRCA proteins. *Nat Rev Genet.* 2007; 8(10):735–748.
2. Mathew CG. Fanconi anaemia genes and susceptibility to cancer. *Oncogene.* 2006;25(43): 5875–5884.
3. Levitus M, Joenje H, de Winter JP. The Fanconi anemia pathway of genomic maintenance. *Cell Oncol.* 2006;28(1–2):3–29.
4. Kutler DI, Auerbach AD, Satagopan J, et al. High incidence of head and neck squamous cell carcinoma in patients with Fanconi anemia. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 2003; 129(1):106–112.
5. Rosenberg PS, Socie G, Alter BP, Gluckman E. Risk of head and neck squamous cell cancer and death in patients with Fanconi anemia who did and did not receive transplants. *Blood.* 2005;105(1):67–73.
6. Braakhuis BJM, Snijders PJF, Keune W-JH, et al. Genetic patterns in head and neck cancers that contain or lack transcriptionally

- active human papillomavirus. *J Natl Cancer Inst.* 2004;96(13):998–1006.
7. Smeets SJ, Braakhuis BJM, Abbas S, et al. Genome-wide DNA copy number alterations in head and neck squamous cell carcinomas with or without oncogene-expressing human papillomavirus. *Oncogene.* 2006;25(17):2558–2564.
 8. Smeets SJ, Hesselink AT, Speel E-JM, et al. A novel algorithm for reliable detection of human papillomavirus in paraffin embedded head and neck cancer specimen. *Int J Cancer.* 2007;121(11):2465–2472.
 9. Kutler DI, Wreesmann VB, Goberdhan A, et al. Human papillomavirus DNA and p53 polymorphisms in squamous cell carcinomas from Fanconi anemia patients. *J Natl Cancer Inst.* 2003;95(22):1718–1721.
 10. van Zeeburg HJT, Snijders PJF, Pals G, et al. Generation and molecular characterization of head and neck squamous cell lines of Fanconi anemia patients. *Cancer Res.* 2005;65(4):1271–1276.
 11. van Zeeburg HJT, Snijders PJF, Joenje H, Brakenhoff RH. Re: Human papillomavirus DNA and p53 polymorphisms in squamous cell carcinomas from Fanconi anemia patients. *J Natl Cancer Inst.* 2004;96(12):968.
 12. Sobin LH, Wittekind C, eds. *TNM Classification of Malignant Tumors.* 6th ed. New York, NY: Wiley-Liss; 2002.
 13. Tabor MP, Brakenhoff RH, van Houten VM, et al. Persistence of genetically altered fields in head and neck cancer patients: biological and clinical implications. *Clin Cancer Res.* 2001;7(6):1523–1532.
 14. Cruz IB, Snijders PJF, Meijer CJ, et al. P53 expression above the basal cell layer in oral mucosa is an early event of malignant transformation and has predictive value for developing oral squamous cell carcinoma. *J Pathol.* 1998;184(4):360–368.
 15. Tabor MP, Van Houten VMM, Kummer JA, et al. Discordance of genetic alterations between primary head and neck tumors and corresponding metastases associated with mutational status of the *TP53* gene. *Genes Chromosomes Cancer.* 2002;33(2):168–177.
 16. Bulkman NW, Rozendaal L, Snijders PJ, et al. POBASCAM, a population-based randomized controlled trial for implementation of high-risk HPV testing in cervical screening: design, methods and baseline data of 44,102 women. *Int J Cancer.* 2004;110(1):94–101.
 17. Califano J, van der Riet P, Westra W, et al. Genetic progression model for head and neck cancer: implications for field cancerization. *Cancer Res.* 1996;56(11):2488–2492.
 18. Perrone F, Suardi S, Pastore E, et al. Molecular and cytogenetic subgroups of oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2006;12(22):6643–6651.
 19. Tran SD, Pillemer SR, Dutra A, et al. Differentiation of human bone marrow-derived cells into buccal epithelial cells in vivo: a molecular analytical study. *Lancet.* 2003;361(9363):1084–1088.
 20. Aractingi S, Kanitakis J, Euvrard S, et al. Skin carcinoma arising from donor cells in a kidney transplant recipient. *Cancer Res.* 2005;65(5):1755–1760.
 21. de Sanjose S, Diaz M, Castellsague X, et al. Worldwide prevalence and genotype distribution of cervical human papillomavirus DNA in women with normal cytology: a meta-analysis. *Lancet Infect Dis.* 2007;7(7):453–459.
 22. D'Souza G, Kreimer AR, Viscidi R, et al. Case-control study of human papillomavirus and oropharyngeal cancer. *N Engl J Med.* 2007;356(19):1944–1956.
 23. Garland SM, Hernandez-Avila M, Wheeler CM, et al. Quadrivalent vaccine against human papillomavirus to prevent anogenital diseases. *N Engl J Med.* 2007;356(19):1928–1943.
 24. Rosin MP, Cheng X, Poh C, et al. Use of allelic loss to predict malignant risk for low-grade oral epithelial dysplasia. *Clin Cancer Res.* 2000;6(2):357–362.
 25. Bremmer JF, Braakhuis BJM, Ruijter-Schippers HJ, et al. A noninvasive genetic screening test to detect oral preneoplastic lesions. *Lab Invest.* 2005;85(12):1481–1488.

Funding

This work was supported by the Fanconi Anemia Research Fund Inc (Eugene, OR) and the Fanconi-Anämie Hilfe e.V. (Unna-Siddinghausen, Germany).

Notes

The authors thank the following investigators for providing tumor material and clinical information for Fanconi anemia patients: Harald Reinhard (Pediatric Oncology and Hematology Clinic, University Hospital Homburg, Germany); Frank Autsbach and Jorgen Wacker (Institute of Pathology/Department of Dermatology, University of Heidelberg, Germany); Johannes Rischewski (Department of Pediatric Hematology/Oncology, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, Germany); Malcolm Little (Department of Pediatrics, University College Galway, Ireland); Beatriz Arribalaga (Hematology Service, Hospital de Cruces, Vizcaya, Spain); Maria Angeles Dasí (Pediatric Hematology Unit, Hospital La Fé, Valencia, Spain); Teresa Olivé (Unit of Pediatric Hemato-Oncology, Hospital Vall d'Hebrón, Barcelona, Spain); Pedro Gómez (Hematology Service, Hospital de Córdoba, Córdoba, Spain); and María Tapia (Hematology Service, Hospital General La Palma, Santa Cruz de la Palma, Spain). The authors also thank Bart Hesselink (Department of Pathology) and Hinke Dekter (Department of Otolaryngology/Head-Neck Surgery) VU University Medical Center for their contributions to the molecular analyses. The sponsors helped to collect the samples and clinical information, but had no role in the design, analysis, or interpretation of the data.

Manuscript received April 8, 2008; revised August 26, 2008; accepted September 12, 2008.

Anexo 2:

“In vivo proliferation advantage of genetically corrected hematopoietic stem cells in a mouse model of Fanconi anemia FA-D1”

Blood. 2008 Dec 15;112(13):4853-61

In vivo proliferation advantage of genetically corrected hematopoietic stem cells in a mouse model of Fanconi anemia FA-D1

Paula Río,¹ Néstor W. Meza,^{1,2} África González-Murillo,¹ Susana Navarro,¹ Lara Álvarez,¹ Jordi Surrallés,³ Maria Castella,³ Guillermo Guenechea,¹ José C. Segovia,¹ Helmut Hanenberg,^{4,5} and Juan A. Bueren¹

¹Hematopoiesis and Gene Therapy Division, Centro de Investigaciones Energéticas, Medioambientales y Tecnológicas and Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras, Madrid, Spain; ²Laboratorio Integrado de la Escuela de Medicina en el Táchira (LABIEMET), School of Medicine of Táchira, Universidad de los Andes, San Cristóbal, Venezuela; ³Department of Genetics and Microbiology, Universitat Autònoma de Barcelona and Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras, Bellaterra, Barcelona, Spain; ⁴Department of Pediatric Oncology, Hematology and Immunology, Children's Hospital, Dusseldorf, Germany; and ⁵Department of Pediatrics, Wells Center for Pediatric Research, Riley Hospital for Children, Indianapolis, IN

Fanconi anemia (FA) is an inherited recessive DNA repair disorder mainly characterized by bone marrow failure and cancer predisposition. Studies in mosaic FA patients have shown that reversion of one inherited germ-line mutation resulting in a functional allele in one or a few hematopoietic stem cells (HSCs) can lead to the proliferation advantage of corrected cells, thus over time normalizing the hematologic status of the patient. In contrast to these observations, it is still unclear

whether ex vivo genetic correction of FA HSCs also provides a similar proliferation advantage to FA HSCs. Using an FA mouse model with a marked hematopoietic phenotype, the FA-D1 (*Brca2*^{Δ27/Δ27}) mice, we demonstrate that the lentivirus-mediated gene therapy of FA HSCs results in the progressive expansion of genetically corrected clones in mild-conditioned FA-D1 recipients. Consistent with these data, hematopoietic progenitors from FA recipients progressively be-

came mitomycin C resistant and their chromosomal instability was reverted. No evidence of myelodysplasia, leukemias, or abnormal clonal repopulation was observed at multiple time points in primary or secondary recipients. Our results demonstrate that ectopic expression of BRCA2 confers a beneficial in vivo proliferation advantage to FA-D1 HSCs that enables the full hematopoietic repopulation of FA recipients with genetically corrected cells. (Blood. 2008;112:4853-4861)

Introduction

Fanconi anemia (FA) is a rare inherited disease characterized by congenital abnormalities, progressive bone marrow failure, and cancer susceptibility.¹ So far, 13 complementation groups, associated with mutations in the corresponding FA genes, have been described.²

The demonstration of somatic mosaicism in FA patients evidenced the natural proliferation advantage of hematopoietic stem cells (HSCs) that have reverted a pathogenic mutation in one of the affected alleles.³⁻⁵ Somatic mosaicism in FA, acting as a natural gene therapy (GT), constitutes the principal basis suggesting that the transplantation of a limited number of genetically corrected HSCs in either unconditioned or moderately conditioned recipients will progressively repopulate and thus normalize the hematopoiesis of FA patients.

Although the GT of CD34⁺ bone marrow (BM) cells in severe combined immunodeficiency (SCID) patients with defects in the interleukin-2 (IL-2) receptor common γ -chain (X1) or in the adenosine deaminase gene led to a strong proliferation advantage of genetically corrected T cells,⁶⁻⁸ a similar response has not been observed in FA patients undergoing analogous GT clinical trials.⁹⁻¹¹ In addition, whereas the transduction of mouse FA-HSCs with therapeutic vectors enhances the repopulating ability of these cells in vivo,^{12,13} an external selective pressure was required to promote a proliferation advantage of genetically corrected FA-HSCs in transplanted recipients.¹⁴⁻¹⁶ Although this may be the result of the

relatively mild phenotype of FA mouse models used in these studies (FA-A and FA-C), the question as to whether HSCs subjected to ex vivo GT actually acquire a proliferation advantage, similar to what has been observed in mosaic patients,³⁻⁵ remains unanswered.

In contrast to previous studies showing that cytotoxic treatments were required to facilitate the engraftment and/or selection of wild-type (WT) HSCs in FA-A, FA-C, and FA-G recipients,¹⁷⁻¹⁹ we have recently shown the natural proliferation advantage of WT HSCs transplanted in unconditioned FA-D1 recipients (with a hypomorphic mutation in the *Brca2* gene; *Brca2*^{Δ27/Δ27} mice).²⁰ Interestingly, long-term analyses in these mice revealed an almost complete repopulation of their hematopoiesis by WT cells, provided that sufficient numbers of WT BM cells were transplanted.²⁰

The marked hematopoietic defects of FA-D1 mice,²⁰ together with the increased propensity of these animals to develop cancer,²¹ demonstrate the more severe phenotype of these animals compared with other FA mouse models.²²⁻²⁷ Based on these observations, we aimed to investigate whether the gene therapy of FA-D1 HSCs was sufficient to confer proliferation advantage after transplantation in FA-D1 recipients. To achieve this goal, a self-inactivating lentiviral vector (LV) expressing the human *BRCA2* cDNA gene was generated and used to genetically modify BM grafts from FA-D1 mice. In addition to the improved safety properties of these vectors,²⁸ recent studies have shown that LVs enable the rapid

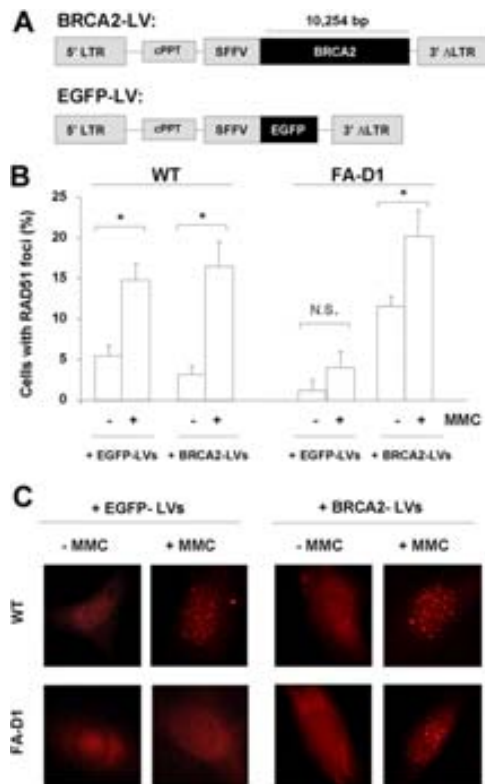


Figure 1. Restored formation of nuclear Rad51 foci in FA-D1 mouse fibroblasts transduced with LVs expressing *hBRCA2*. (A) Description of the LVs harboring the *hBRCA2* (BRCA2-LV) and *EGFP* cDNA (EGFP-LV) used throughout. (B) Percentages of mouse FA-D1 fibroblasts with Rad51 foci after 20 hours of incubation in the presence or absence of 30 nM MMC. Data are mean plus or minus SEM of 3 independent experiments. A total of 200 cells were scored in each condition. (C) Representative immunofluorescence pictures corresponding to analysis shown in panel B. *Significant difference ($P < .05$). N.S. indicates not significant

transduction of *Fanca*^{-/-} HSCs, preserving the engraftment potential of these cells.²⁹ Data presented in this study demonstrate, for the first time, that ex vivo GT confers a proliferation advantage of transduced FA HSCs versus untransduced donor and host FA HSCs in a submyeloablative-conditioning FA mouse model.

Methods

Animals

BALB/c mice with a homozygous deletion in exon 27 of the *Fancl1/Brca2* gene (FA-D1 or *Brca2*^{Δ27Δ27} mice) were used throughout.²¹ As controls, WT littermates were used in all the experiments. All experimental procedures were carried out according to Spanish and European regulations (Spanish RD 223/88 and OM 13-10-89 of the Ministry of Agriculture, Food and Fisheries; and European convention ETS-123, for the use and protection of vertebrate mammals used in experimentation and other scientific purposes).

LV production

LVs carrying either the *hBRCA2* or the *EGFP* genes, under the control of the spleen focus-forming virus (SFFV) promoter, were generated as shown in Figure 1A. 293T and HT1080 cells (CRL-12103; ATCC, Manassas, VA) used to produce and titrate the LVs grown in Dulbecco modified medium (DMEM; Invitrogen, Carlsbad, CA) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS; Sigma-Aldrich, St Louis, MO), 2 mM L-glutamine (Cell Culture Systems; Invitrogen), 50 U/mL penicillin-streptomycin (Invitrogen). For the production of LVs, 293T cells were transfected with 5 μg of pCDNL-BH, 3 μg of vesicular stomatitis virus G, and 20 μg of SFFV-194

hBRCA2 or SFFV-enhanced green fluorescence protein (EGFP) as previously described.^{30,31} Supernatants were harvested 48 hours after transfection, filtered through a 0.45-μm filter, and concentrated by ultracentrifugation. Functional titers of infective LVs were determined in HT1080 cells, plated at 3.5×10^4 cells per well in 24-well plates, and infected overnight with different dilutions of either LV. Cells were washed and incubated for 5 days with fresh medium. Cells were recovered using lysis buffer from QIAGEN (Valencia, CA) and analyzed by quantitative polymerase chain reaction (qPCR) for the presence of the LV provirus in cellular DNA. Because of the large size of the *BRCA2* cDNA, low titers of BRCA2-LVs were routinely obtained (10^5 - 10^6 transduction units/mL, after concentration). Titers corresponding to EGFP-LVs were, however, approximately 10^9 transduction units/mL. To avoid differences in the efficiency of gene transfer, transductions with both vectors were always conducted at equivalent multiplicities of infection.

Phenotypic correction of FA-D1 fibroblasts with BRCA2-LVs

Ear fibroblasts from WT and FA-D1 mice were obtained by the desegregation of ear fragments with collagenase (0.25%) in DMEM supplemented with 10% FBS, 2 mM L-glutamine (Invitrogen), and 50 U/mL penicillin-streptomycin (Invitrogen) incubated for 8 hours at 37°C. Explants were washed and incubated overnight in DMEM supplemented with 10% FBS, 2 mM L-glutamine (Invitrogen), and 50 U/mL penicillin-streptomycin (Invitrogen). WT and FA-D1 mouse fibroblasts were transduced either with BRCA2-LVs or EGFP-LVs and seeded in plates with cover slides at a cell density of 7.5×10^4 cells per well, either with or without 30 nM of the interstrand cross-linker drug, mitomycin C (MMC; Sigma-Aldrich). Sixteen hours later, cells were fixed with 3.7% paraformaldehyde in phosphate-buffered saline (PBS) for 15 minutes, and permeabilized with 0.5% Triton X-100 in PBS for 5 minutes. After blocking for 30 minutes in the blocking buffer (10% FBS, 0.1% Nonidet P-40 [NP-40] in PBS), cells were marked with an anti-Rad51 mouse monoclonal antibody (Abcam, Cambridge, United Kingdom). Cells were subsequently washed and incubated with antimouse Texas Red-conjugated antibody (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Cambridgeshire, United Kingdom) in combination with 4,6-diamidino-2-phenylindole. Forty-five minutes afterward, cells were washed 3 times with Tris-buffered saline, and the slides were mounted in Moviol. Slides were analyzed with a fluorescence microscope Axioplan2 (Carl Zeiss, Göttingen, Germany) using a 100×/1.45 oil working distance 0.17-mm objective. The number of cells with foci was scored after analyzing 200 cells per slide. Immunofluorescent images were acquired with an AxioCam MRm (Carl Zeiss) and were processed with AxioVision version 4.6.3 (Carl Zeiss) and Corel Photo-Paint 11 (Corel, Ottawa, ON).

Phenotypic correction of FA-D1 BM progenitors transduced with BRCA2-LVs

BM cells from FA-D1 mice were transduced as previously described.³¹ Briefly, cells were maintained overnight in Iscove modified Dulbecco medium (Invitrogen) supplemented with 20% FBS, 2 mM L-glutamine (Invitrogen), 50 U/mL penicillin-streptomycin (Invitrogen), human recombinant (hr) IL-11(100 ng/mL), and murine stem cell factor (mSCF; 100 ng/mL; both from Chemicon International, Temecula, CA) at a concentration of 10^5 cells/mL, and transduced with either BRCA2-LVs or EGFP-LVs for 16 hours. In some experiments (Figure 2), aliquots consisting of 5×10^4 mononuclear cells were maintained in liquid cultures with mSCF and hIL-11 and assessed for colony-forming cells (CFCs) in semisolid MethoCult GF M3534 culture medium (StemCell Technologies, Vancouver, BC). To determine whether the genetic treatment reverted the hypersensitivity of FA-D1 CFCs, BM cultures were conducted with and without 10 nM MMC.

Analysis of the in vivo-repopulating properties of FA-D1 hematopoietic stem cells transduced with BRCA2-LVs

BM samples from male FA-D1 donors were enriched in precursor cells negative for lineage differentiation markers (Lin⁻) using the Lineage

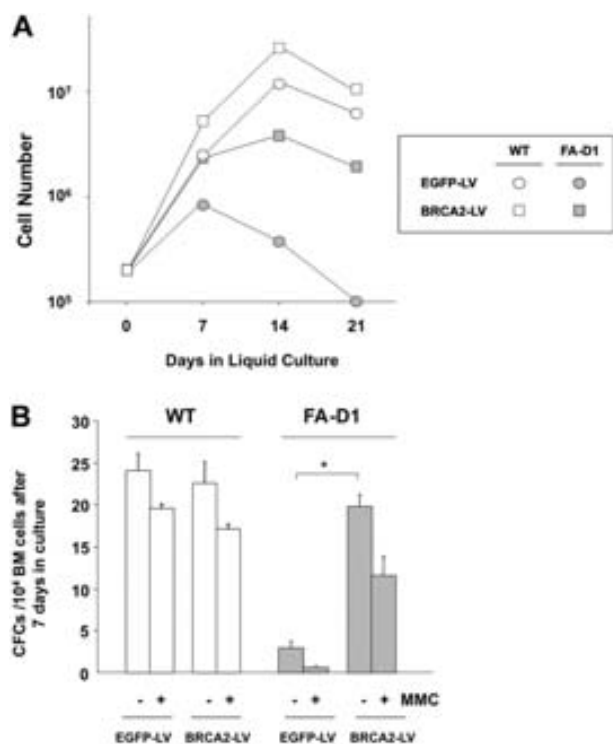


Figure 2. Correction of the in vitro proliferation defects and MMC hypersensitivity of FA-D1 BM progenitors transduced with LVs that express hBRCA2. (A) Kinetics of ex vivo expansion of WT (○, □) and FA-D1 (●, ■) BM cells previously transduced with EGFP-LVs or BRCA2-LVs (circles and squares, respectively). Data from a representative experiment are shown. (B) Content in CFUs of cultures corresponding to panel A after 7 days of ex vivo expansion in the absence or presence of 10 nM MMC. Data are mean plus or minus SEM of data obtained from 5 plates per point. *Significant difference between cells transduced with EGFP and BRCA2-LVs ($P < .0^*$).

Depletion Kit from Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Germany) following the manufacturer's instructions. Lin⁻ cells were then transduced as indicated in the previous section with BRCA2- and EGFP-LVs. Sixteen hours after transduction, cells were washed and aliquots of 5×10^5 cells were transplanted into FA-D1 female mice previously irradiated with 3 Gy (x-rays from a MG-325 equipment set at 300 kV, 12.8 mA; Philips, Hamburg, Germany).²⁰ Monthly after transplantation, peripheral blood (PB) samples were obtained from FA-D1 female recipients, and the level of donor chimerism was analyzed by qPCR using primers for the male-specific SRY sequence and mouse β -actin in a Rotor Gene RG-3000 (Corbett Research Products, Foxboro, MA).²⁰ Similar studies were conducted in hematopoietic colonies generated by BM cells obtained from femoral aspirates periodically obtained after transplantation. In these studies, individual colonies were picked and analyzed by a real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction (qRT-PCR).³² The presence of LV proviruses in these colonies was also determined using primers specific for the Rev-responsive element (RRE) present in the lentiviral backbone: lenti-RRE-F: 5'-ATCTCTAGCAGTGGCGCCC-3' and lenti-RRE-R: 5'-CTGCGTTCGAGAGAGCTCTC-3' and detected with the TaqMan probe lenti-RRE-P: 5'-FAM-CAGGGACTTGAAAGCGAAAGG-GAAACC-BHQ1-3'. In some experiments, BM was harvested from primary recipients (6 months after transplantation) and retransplanted into secondary recipients (10^7 cells/mouse) previously irradiated with 3 Gy. Samples from these animals were studied as in primary recipients.

Analysis of hBRCA2 expression in BM from recipient FA-D1 mice

The expression of human mRNA in the BM of recipients of BRCA2-transduced cells was analyzed by qRT-PCR on cDNA obtained from total RNA. Samples from one mouse that received EGFP-transduced cells were

used as a negative control. The relative transgene expression of hBRCA2 was determined by the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ as previously described (where Ct is the cycle threshold).³³ Primers used for hBRCA2 expression analyses were as follows: BRCA2-F: 5'-CTTATGTTGCACAATGAGAAAAGAAATTAG-3'; and BRCA2-R: 5'-CGGAATCGGGCAAACG-3', as a probe BRCA2-P: 5'-FAM-ATTTACCTCAGCGTTTGTGTATCGGGCAA-BHQ1-3'. For housekeeping control expression, murine glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (mGAPDH) was used: mGAPDH-F: 5'-TCCAAGGAGTAAGAAACCCTGGA-3' and mGAPDH-R: 5'-GAAATTGTGAGGGAGATGCTCAG-3' and mGAPDH-P: 5'-TR-TGAGCAAGAGAGAGGCCCTATCCAACCTC-BHQ2-3' probe.

Structural chromosomal abnormalities

Liquid cultures of BM cells were left untreated or were treated with 30 nM MMC for a 48-hour period. To obtain metaphases, colcemid (0.1 μ g/mL; Invitrogen, Paisley, United Kingdom) was added 2 hours before harvesting, and the cells were processed following standard cytogenetic procedures. Briefly, cells were dropped onto clean slides and air-dried overnight. Slides were stained with 10% Giemsa in phosphate buffer, pH 6.8. Ten metaphases per sample were analyzed for chromosome aberrations, including gaps, chromosome and chromatid breaks, acentric fragments, and chromosome and chromatid-type exchanges.

Linear amplification-mediated PCR analyses

For the detection of the lentiviral integration sites, BM-DNA from primary and secondary recipients was extracted and preamplified by repeated primer extension using vector-specific 5'-biotinylated primers, SK-LTR1 (5'-GAGCTCTCTGGCTAACTAGG-3') and SK-LTR2 (5'-GAACCCACT-GCTTAAGCCTCA-3') from 100 ng of each sample DNA. Selection of biotinylated extension products was performed with 200 μ g of magnetic beads according to the manufacturer's instructions (DynaL Biotech, Oslo, Norway). The samples were incubated with Klenow polymerase (2 U; Roche Applied Science, Penzberg, Germany), deoxynucleoside triphosphates (250 μ M), and a random hexanucleotide mixture (Roche Applied Science) in a volume of 20 μ L for 1 hour at 37°C. Samples were washed on the magnetic particle concentrator (DynaL Biotech) and incubated with Tsp509I endonuclease (4 U in 20 μ L; New England Biolabs, Beverly, MA) for 1 hour at 65°C. After an additional wash step, 100 pmol of a double-stranded asymmetric linker cassette and Fast Link Ligation Kit (2 U; Epicenter Technologies, Madison, WI) were incubated with the beads in a volume of 10 μ L at room temperature for 5 minutes. Denaturing was performed with 5 μ L 0.1 N NaOH for 10 minutes at room temperature. Each ligation product was amplified with AmpliTaq gold polymerase (5 U; Applied Biosystems, Foster City, CA), vector-specific primer SK-LTR3 (5'-AGCTTGCCTTGAGTGCTTCA-3') (0.5 μ M), and linker cassette primer LCP1 (5'-GACCCGGGAGATCTGAATTC-3') (0.5 μ M).²⁸ Of each PCR product, 0.2% served as a template for a second, nested PCR with internal primers SK-LTR4 (5'-AGTAGTGTGTGCCGCTGTGT-3') and LCP2 (5'-GATCTGAATTCAGTGGCACAG-3') at identical conditions. Of this final product, one-fifth was separated on a Spreadex high-resolution gel, EL800 and EL400 (Elchrom Scientific, Cham, Switzerland).

Results

The LV-mediated expression of human BRCA2 corrects the cellular phenotype of mouse FA-D1 fibroblasts and BM progenitors in vitro

Because mutations in *FANCD1/BRCA2* result in a defective induction of nuclear Rad51 foci after DNA damage,³⁴ we investigated whether the transduction of mouse FA-D1 fibroblasts with BRCA2-LVs restored the formation of Rad51 foci after treatment with MMC. As expected, the proportion of WT cells with Rad51 foci increased markedly after an MMC exposure. Consistent with our previous findings,²⁰ a defective generation of Rad51 foci after

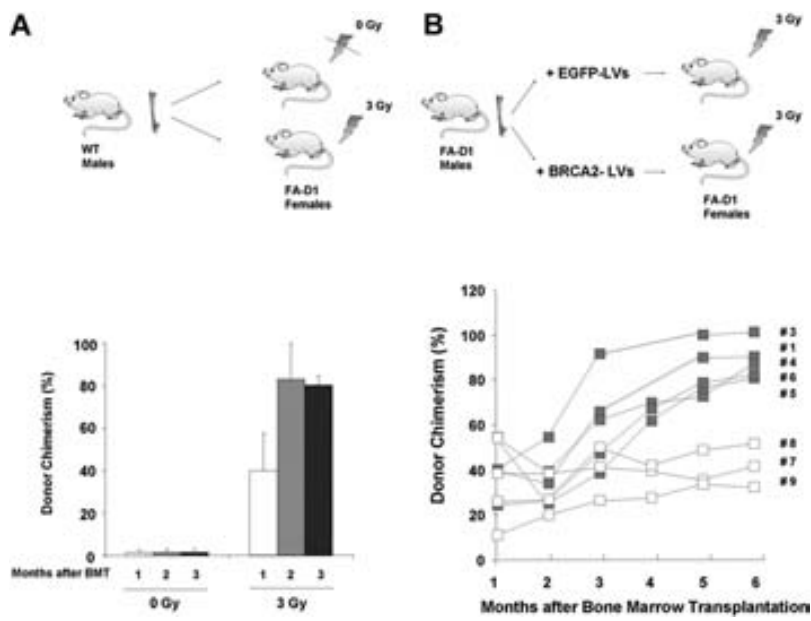


Figure 3. In vivo repopulation advantage of FA-D1 BM cells transduced with BRCA2-LVs in the PB of FA-D1 recipients conditioned with mild irradiation. (A) Influence of a mild conditioning of 3 Gy to facilitate the engraftment of FA-D1 recipients with moderate numbers (500 000 Lin⁻ cells) of fresh BM cells from WT mice. Follow-up of donor engraftments obtained between 1 and 3 months after transplantation. □ and ■ represent unirradiated recipients and recipients irradiated with 3 Gy before the BM transplantation, respectively. (B) Kinetics of donor hematopoietic repopulation in FA-D1 recipients conditioned with 3 Gy and transplanted with 500 000 FA-D1 Lin⁻ BM cells that were transduced with BRCA2- or EGFP-LVs. Donor repopulation data were obtained by qPCR analyses of SRY sequences (Y-chromosome specific) in PB samples from recipient mice. Mice 1 to 6 were transplanted with BRCA2-transduced cells. Mice 7 to 9 were transplanted with EGFP-trans^{*}

MMC treatment was observed in mouse FA-D1 fibroblasts transduced with EGFP-LVs. Significantly, the transduction of these cells with BRCA2-LVs restored the generation of Rad51 foci after MMC treatment, confirming the capacity of BRCA2-LVs to restore the homologous recombination pathway in mouse FA-D1 cells (Figure 1B,C).

Because defects in *Fancd1/Brca2* also impair the proliferation capacity of BM progenitors and hypersensitize these cells to MMC, in the next set of experiments BM cells from WT and FA-D1 mice were transduced with EGFP- and BRCA2-LVs and then maintained in liquid cultures for 3 weeks. During this period, the cellularity of the cultures was periodically analyzed. In addition, total numbers of CFCs and numbers of MMC-resistant CFCs were determined 1 week after seeding. As shown in a representative experiment illustrated in Figure 2A, the growth of cultures established with EGFP-LV-transduced FA-D1 cells was very poor, whereas the transduction of FA-D1 cells with BRCA2-LVs markedly improved their proliferation potential. Compared with CFC numbers generated by WT BM cells, transduced either with EGFP- or BRCA2-LVs, EGFP-LV-transduced samples from FA-D1 mice contained very low numbers of CFCs (~ 10% of normal values). In addition, these CFCs were highly sensitive to MMC. Transduction of FA-D1 BM samples with BRCA2-LVs significantly increased both the numbers and the MMC resistance of FA-D1 CFCs (Figure 2B).

The LV-mediated expression of hBRCA2 promotes an in vivo repopulation advantage of FA-D1 HSCs in FA-D1 recipients

To investigate whether BRCA2-LVs restored the in vivo-repopulating properties of FA-D1 HSCs, BM transplantation studies were conducted. In recent studies, we showed that BM cells from WT mice were capable of progressively repopulating the hematopoiesis of nonconditioned FA-D1 recipients up to 100%, provided that relatively high numbers of BM cells (approximately one femoral BM per recipient) were infused.²⁰ To engraft FA-D1 mice with BM cells numbers similar to what would be required in human GT studies, we first evaluated the impact of conditioning these animals with a mild irradiation of 3 Gy, before the infusion of 500 000 Lin⁻ WT BM cells (equivalent to one-fourth BM from a femur). Consistent with our previous observations,²⁰ this number of

BM cells did not engraft in unconditioned FA-D1 recipients. A mild conditioning with only 3 Gy facilitated, however, a predominant WT exogenous repopulation in 2 to 3 months after transplantation (Figure 3A). These data strongly suggested that a reduced conditioning regimen might be sufficient to facilitate the engraftment of FA-D1 recipients with low numbers of genetically corrected HSCs.

Two independent GT experiments were then conducted with Lin⁻ BM cells from FA-D1 male mice either transduced with EGFP- or BRCA2-LVs. Cells doses of 500 000 transduced cells were transplanted into female FA-D1 recipients previously irradiated with 3 Gy (Figure 3B). As expected, moderate levels of donor repopulation were observed in recipients transplanted with EGFP-LV-transduced samples (Figure 3B). These levels remained stable over time, therefore suggesting that after the initial engraftment these cells did not have any proliferation advantage in vivo against the endogenous FA-D1 hematopoietic cells. Strikingly, FA-D1 grafts transduced with BRCA2-LVs mediated a progressive increase of donor repopulation in all FA-D1 recipients, reaching values of 80% to 100% in the PB at the end of the observation period (6 months after transplantation; Figure 3B). As expected, additional control experiments showed that transduction of WT BM cells with BRCA2-LVs did not promote any proliferation advantage in samples that already express *Brca2* (data not shown).

To determine the contribution of donor cells in the BM and to analyze whether the in vivo proliferation advantage of FA-D1 repopulating cells harboring the *hBRCA2* was the result of the presence of the transgene, BM aspirates from transplanted recipients were obtained at 2 and 6 months after transplantation and plated in standard progenitor assays. Hematopoietic colonies were individually picked and subjected to qPCR analyses to determine the proportion of CFCs of donor origin (SRY⁺ colonies) and positive for the LV provirus. In parallel, similar analyses were conducted on EGFP-LV-transduced samples. As shown in Figure 4A, the proportion of donor CFCs markedly increased from 2 to 6 months after transplantation in 5 of the 6 recipients that were transplanted with BRCA2-transduced FA-D1 cells. In the sixth recipient, the engraftment was already very high 2 months after transplantation. Significantly, 6 months after transplantation, more

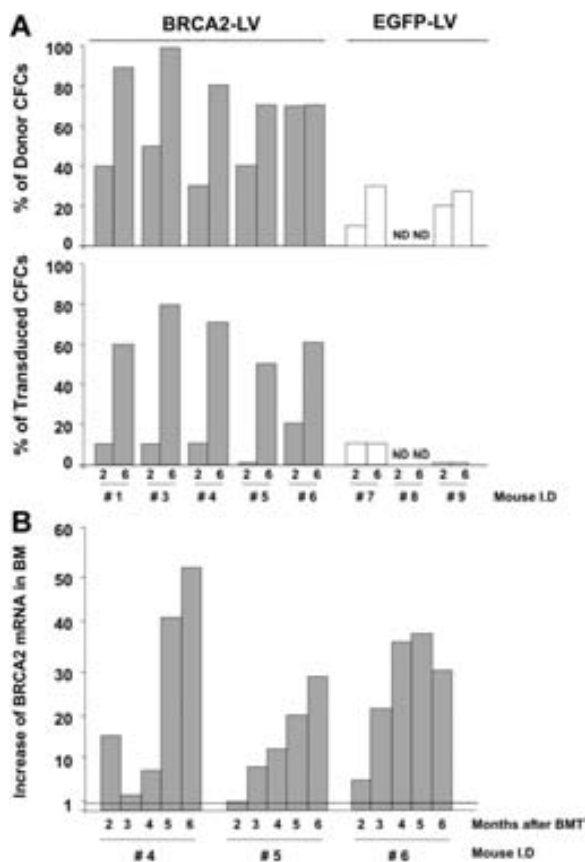


Figure 4. Characterization of the hematopoietic progenitors repopulating the BM of FA-D1 recipients after transplantation with EGFP- or hBRCA2-transduced FA-D1 cells. (A) Quantification of the proportion of CFCs present in the BM of FA-D1 recipients of donor origin (top panel) harboring BRCA2-LV or EGFP-LV proviruses (bottom panel). qPCR analyses of SRY sequences and of BRCA2 and EGFP-LV proviruses were determined in individually picked colonies generated by BM samples obtained 2 and 6 months after transplantation. (B) Kinetics of hBRCA2 mRNA expression in BM samples from 3 FA-D1 recipients transplanted with BRCA2-transduced cells. BM samples were periodically aspirated from the femora of recipient mice and analyzed by RT-PCR. Data show the increase in hBRCA2 expression compared with a mouse transplanted with EGFP-transduced cells (mouse 9).

than 70% of CFCs in the BM of mice that had received BRCA2-LV-transduced cells were of donor origin, in good consistency with engraftments determined in the PB of these animals (Figure 4A).

The marked proliferation advantage of BRCA2-LV-transduced HSCs and progenitor cells was confirmed when the proportion of CFCs harboring the BRCA2-LV provirus was investigated (Figure 4A). Whereas 5% to 20% of the CFCs obtained at 2 months after transplantation carried the BRCA2-LV provirus, 60% to 80% of progenitors were positive for the BRCA2-LV provirus at 6 months after transplantation, indicating that most of the donor CFCs in recipients' BM harbored the therapeutic hBRCA2 LV. As expected, in the case of samples transduced with EGFP-LVs, only a reduced proportion of CFCs harbored the proviral LV at 2 and 6 months after transplantation.

Because the repopulation advantage of BRCA2-LV-transduced FA-D1 BM should be a consequence of the ectopic expression of the transgene, we sought to prove that the level of *hBRCA2* mRNA would continuously increase over time in the BM of mice. To this end, BM samples were aspirated periodically from the femora of 3 FA-D1 recipients (mice 4-6), and the level of *hBRCA2* mRNA was determined by qRT-PCR. Data were normalized using BM cells from one FA-D1 recipient that was transplanted with EGFP-

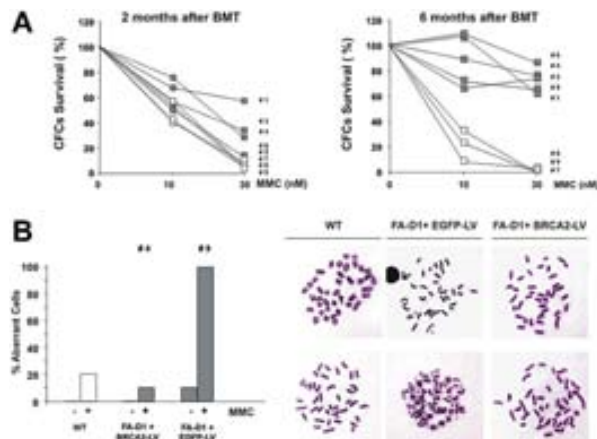


Figure 5. Reversion of the phenotype of BM cells from FA-D1 mice after transplantation with genetically corrected BM cells. (A) Reversion of the MMC sensitivity of hematopoietic progenitors present in the BM of recipient mice transplanted with BRCA2-transduced FA-D1 BM cells. The figure shows the increased resistance to MMC in samples obtained 6 months after BMT, compared with samples obtained 2 months after BMT. (B) Reversion of the chromosomal instability of BM cells from mice transplanted with BRCA2-LVs. The figure represents the chromosomal instability, spontaneous and MMC-induced, in BM cells from one recipient mouse corresponding to the therapeutic and control groups (mouse 4 and mouse 9, respectively).

transduced BM cells (mouse 9). As shown in Figure 4B, a progressive increase in the level of *hBRCA2* mRNA was observed in these BM samples along the posttransplantation period, further supporting the relevance of the expression of the *hBRCA2* transgene in the proliferation advantage of FA-D1 HSCs.

To further confirm that BRCA2-LVs restored the cellular phenotype of mouse FA-D1 BM cells in vivo, the characteristic hypersensitivity of FA CFCs to MMC in BM cells from FA-D1 recipients was assessed at 2 and 6 months after transplantation. Whereas only a modest correction of the MMC hypersensitivity of FA-D1 CFCs was observed 2 months after transplantation of BRCA2-LV-transduced cells, a marked reversion of the MMC hypersensitivity was observed when analyses were conducted 6 months after transplantation (Figure 5A). At this time point, more than 90% of the colonies that survived to 30 nM MMC were positive for the BRCA2-LV provirus (data not shown).

Because FA-D1 BM cells are characterized by their chromosomal instability,²⁰ we also investigated whether our GT approach reverted this phenotype in BM cells of one FA-D1 recipient transplanted with BRCA2-LV-transduced cells (no. 4), compared with a control FA-D1 recipient transplanted with EGFP-LV-transduced cells (no. 9). As seen in the cytogenetic analyses shown in Figure 5B, the genetic correction of FA-D1 BM cells completely reverted the chromosomal instability characteristic of FA-D1 cells, providing an additional proof for the efficacy of the GT approach for restoring the functionality of FA-D1 precursor cells capable of repopulating mildly conditioned recipients.

To finally demonstrate that the correction of transduced FA-D1 cells occurred in true HSCs, BM samples from 2 primary recipients transplanted with BRCA2-transduced BM (no. 1 and no. 3) were retransplanted into 1 or 2 secondary FA-D1 recipients (10^7 BM cells/secondary recipient) also preconditioned with 3 Gy. As a control, BM cells from one recipient transplanted with EGFP-transduced cells were also retransplanted into one secondary 3 Gy-conditioned recipient. Nine months after transplantation, secondary recipients were killed to determine the level of donor cell engraftment and also the percentage of genetically modified cells (Figure 6A). As deduced from the analysis of PB samples, the

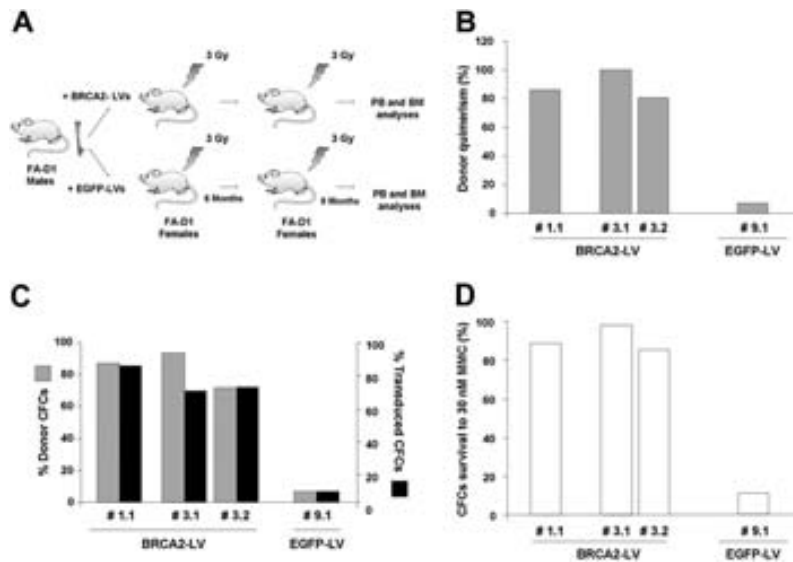


Figure 6. Long-term repopulation ability of FA-D1 HSCs genetically corrected with BRCA2-LVs. (A) Schematic representation of the experimental protocol used to assess the long-term repopulating capacity of FA-D1 BM grafts transduced with BRCA2-LVs. Six months after the infusion of EGFP- or BRCA2-transduced FA-D1 BM cells, recipients were killed and BM cells from 2 recipients corresponding to the therapeutic group (recipients 1 and 3) and from one recipient of the control group (recipient 9) were transplanted (10^7 BM cells per mouse) into 4 secondary FA-D1 recipients (recipients 1.1, 3.1, 3.2, and 9.1) previously irradiated with 3 Gy. (B) Analysis of the proportion of donor repopulation (cells positive for SRY sequences) in the PB of secondary recipients 9 months after BMT. (C) Proportion of donor-derived CFCs (SRY⁺; □) and the proportion of transduced CFCs (*hBRCA2*⁺ or *EGFP*⁺; ■) as deduced from qPCR analyses conducted with individually picked colonies. (D) Percentage of CFCs obtained from the BM of secondary recipients (9 months after BMT) that survived to 30 nM MMC added to the clonogenic cultures.

engraftment of secondary FA-D1 recipients by the original donor BM cells (male origin) reached values of 80% to 100% when samples were transduced with the therapeutic BRCA2-LV, but not with the control vector (Figure 6B). The very high repopulating ability of BRCA2-transduced FA-D1 HSCs was confirmed when BM CFCs from secondary recipients were analyzed. As happened in primary recipients, most of the CFCs from these animals were of donor origin and harbored the therapeutic BRCA2-LV (Figure 6C). Consistent with these data, most of the progenitors corresponding to the BRCA2 group survived to MMC doses that were highly toxic for CFCs from the control group (30 nM MMC; Figure 6D). Taken together, these data clearly demonstrate the reverted phenotype, including a long-term proliferation advantage, of genetically corrected FA-D1 HSCs.

The proliferation advantage of genetically corrected FA-D1 BM grafts is not the result of a monoclonal expansion of transduced HSCs caused by insertional mutagenesis

Although no evidence of leukemias or myelodysplastic syndromes was deduced from PB cell counts and histologic examination of recipient mice (data not shown), we investigated whether BRCA2-LV-transduced cells exhibited an altered clonal repopulation

pattern, which could account for the repopulation advantage observed in recipient FA-D1 mice. To rule out this possibility, we determined the clonal repertoire present in the BM from primary and secondary FA-D1 recipients by linear amplification-mediated PCR (LAM-PCR). As shown in Figure 7, a similar pattern of oligoclonal repopulation was observed in mice transplanted with either BRCA2- or EGFP-LV-transduced grafts. This observation, and the absence of a monoclonal repopulation in any of the animals transplanted with the therapeutic vector, indicated that the proliferation advantage of genetically corrected FA-D1 HSCs was not the result of dysregulated proliferation of these cells. These data are consistent with our results in Figures 3 and 4, showing, for the first time, that the restored function of BRCA2 confers a proliferation advantage in FA-D1 HSCs transplanted into mild-conditioned FA-D1 recipients.

Discussion

The acquisition of an *in vivo* proliferation advantage in HSCs subjected to *ex vivo* GT constitutes a critical aspect for the therapy of patients with autologous genetically corrected HSCs. In this

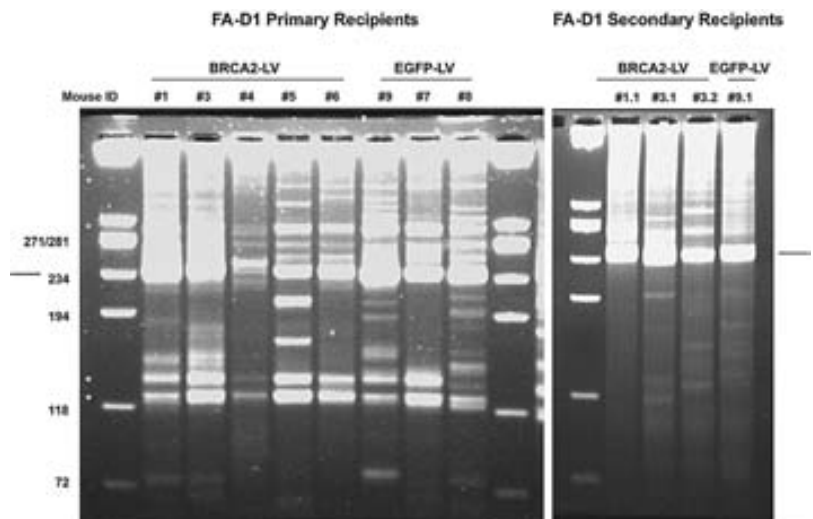


Figure 7. LAM-PCR analysis of the clonal repertoire repopulating the BM of primary and secondary FA-D1 recipients transplanted with genetically corrected FA-D1 grafts. The figure represents the clonal repertoire detected in the BM of primary (6 months after BMT) and secondary recipients (9 months after secondary BMT) originally transplanted with BRCA2- and EGFP-transduced FA-D1 BM cells (see protocol in Figure 6A). Arrows indicate the position of the internal band. * indicates nonspecific bands that were amplified in different LAM-PCR analyse*
198

situation, the question of whether transduced HSCs and their progeny acquire *in vivo* proliferation advantage over uncorrected cells is of fundamental importance to define whether any conditioning strategy of FA patients before reinfusion of cells will be necessary. Successful genetic therapies in patients without an *in vivo* selection advantage for the transduced cells, such as in chronic granulomatous disease, required the conditioning of the patients with myelosuppressive protocols.³⁵ In patients with SCIDs, adenosine deaminase-SCID patients could be successfully engrafted after nonmyeloablative conditioning,⁷ whereas SCID-X1 patients were successfully engrafted without any conditioning.^{6,8}

In FA, normalized values of all lineages in PB can be observed in some patients with somatic mosaicism,³⁻⁵ demonstrating that the natural self-correction in one allele of the affected FA gene can confer spontaneous *in vivo* repopulation advantage of reverted FA HSCs and their progeny. Although these observations strongly suggested that the progeny of FA HSCs subjected to *ex vivo* GT will acquire proliferation advantage over untransduced cells *in vivo*, no evidence for this phenomenon has been found so far in recipients of FA HSCs that were transduced with therapeutic vectors. In the murine system, a number of studies have already shown the efficacy of gammaretroviral,^{12,14} lentiviral,¹⁶ and foamy-viral¹³ vectors for restoring the functionality of FA-HSCs. However, the *in vivo* proliferation advantage of corrected HSCs and their progeny was only detected when animals that received transplants were later exposed to genotoxic treatments.¹⁴⁻¹⁶ In 3 clinical trials with gammaretroviral vectors where FA patients received corrected autologous CD34⁺ cells without any conditioning, neither long-term persistence of genetically marked hematopoietic cells nor any clinical improvement was observed.⁹⁻¹¹ These results raise the concern that, in contrast to observations made in FA mosaic patients, *ex vivo* genetic correction may not be sufficient to confer proliferation advantage to HSCs after reinfusion.

To investigate whether a lentiviral GT approach may result in a proliferation advantage of corrected FA HSCs *in vivo*, we took advantage of mice with a hypomorphic mutation on both alleles of the *Brca2* gene.²¹ In this FA-D1 model, we have recently reported the progressive repopulation of the entire hematopoietic system in these animals with WT HSCs in the absence of any preparative treatment either before or after transplantation.²⁰ FA-D1 mice therefore appear to be an ideal model system to investigate whether GT confers an *in vivo* growth advantage to corrected autologous FA HSCs and their progeny over the unmodified endogenous cells.

To this end, an LV expressing the 10.3-kb cDNA of the human BRCA2 was constructed. Because human and mouse FA-D1 cells are characterized by a deficient induction of nuclear Rad51 foci after DNA damage,^{20,34} we initially demonstrated the functionality of our BRCA2-LV by the restoration of Rad51 foci formation in mouse FA-D1 fibroblasts exposed to MMC (Figure 1). We also demonstrated normal proliferation capacity and resistance to MMC in FA-D1 cells transduced with the BRCA2-LV. Strikingly, without MMC, the proportion of cells with RAD51 foci was higher in BRCA2-LV-transduced FA-D1 cells than in WT cells, either transduced with EGFP- or BRCA2-LVs. This observation could be explained by increased levels of spontaneous DNA damage that had been accumulated in FA-D1 cells before restoration of the deficient FA/BRCA pathway with the therapeutic vector. Important additional evidence for the ability of the hBRCA2-LV to correct the phenotype of mouse FA-D1 cells is the correction of the *ex vivo* expansion capacity and MMC hypersensitivity of FA-D1 BM progenitors.

Based on our previous data showing that the engraftment of nonconditioned FA-D1 mice requires infusion of high numbers of WT BM cells,²⁰ and considering the low numbers of HSCs that can be obtained from FA patients,¹¹ we decided to prepare our FA-D1 recipients with a mild irradiation of 3 Gy before the transplantation with transduced BM cells. As deduced from the analysis of PB of recipients early after transplantation, this preparative regimen facilitated the initial engraftment of FA-D1 mice with genetically corrected FA-D1 HSCs, similar to that seen with BM cells from WT mice. In addition, our experiments showed that the transduction of FA-D1 BM cells with the BRCA2-LV mediated a progressive increase in the proportion of genetically corrected donor CFCs during the posttransplantation time, as demonstrated by the increased resistance to MMC. These observations and the fact that the expression of the *hBRCA2* transgene progressively increased after transplantation clearly indicate that the expression of the therapeutic *hBRCA2* transgene continues to confer a proliferation advantage of FA-D1 HSCs in FA-D1 recipients months after the mild conditioning. Cytogenetic analyses conducted in the BM of these animals also revealed the reversion of the chromosomal instability in corrected FA-D1 BM cells. Finally, the results obtained after the transplantation of FA-D1 recipient BM into secondary recipients provide final proof that the correction of the hematopoietic phenotype was the result of genetic modification of FA-D1 HSCs with the BRCA2-LV.

Because previous clinical^{35,36} and experimental studies³⁷ have shown that proviral integrations in the vicinity of specific genes can mediate clonal dominance in transplanted recipients, we wanted to exclude that this mechanism accounted for the repopulation advantage that we had observed in animals receiving BRCA2-transduced FA-D1 HSCs. Therefore, LAM-PCR analyses were conducted on BM cells from primary and secondary recipient mice. Our data in Figure 7 confirmed that several transduced clones were present in each mouse as a consequence of the repopulation of the animals with either BRCA2- or EGFP-transduced grafts. These findings are in good consistency with our results showing that, although both viruses had integrated into repopulating cells, the proliferation advantage of genetically modified FA-D1 HSCs was only associated with the re-expression of the *hBRCA2* gene in FA-D1 BM cells.

Although none of our animals showed any symptom of malignancy, safety issues suggest that the use of strong promoters, such as the SFFV used in this study, should be limited to diseases in which a high expression of the therapeutic transgene is required for the therapeutic effect or the size of the cDNA might be a critical factor in achieving sufficient protein levels.^{38,39} Therefore, further studies should be conducted in the different subtypes of FA to investigate whether a weak expression system of the corresponding gene can be curative.³¹

The role that cytokines released by the mild conditioning of recipients had on the engraftment and *in vivo* proliferation of genetically corrected FA-D1 HSCs is open to discussion. On the one hand, it is possible that, at least initially after transplantation, cytokines such as tumor necrosis factor- α or interferon- γ might have promoted a preferential growth of genetically corrected over uncorrected FA-D1 precursors, as already shown in FA-A, FA-C, and FA-G mice that had received continuous infusions with these cytokines.^{18,19} On the other hand, the short *in vivo* half-life of these effects/cytokines and our data showing proliferation advantage of WT HSCs in nonconditioned FA-D1 suggest that the release of cytokines may not be the critical factor here. It appears also highly improbable that the mild irradiation might be the main re-

the continuous expansion of the pool of genetically corrected cells over months. Therefore, we postulate that the more severe hematopoietic phenotype of FA-D1 mice, especially compared with other FA mouse models, and the re-expression of BRCA2 are the critical factors that can readily explain the proliferation advantage in FA-D1 HSCs, leading to progressive *in vivo* expansion of corrected cells over months.

In conclusion, it is important to take into account that, although the cellular phenotype of FA-D1 mice is most severe among all the FA mouse models, the hematopoietic defects in these FA-D1 mice²⁰ are still milder than those observed in the majority of FA patients. The data presented here therefore suggest that the transduction of human FA-HSCs with therapeutic LVs will promote the repopulation advantage of genetically corrected cells after transplantation in FA patients. The FA-D1 mouse model might therefore be an important tool to develop novel strategies to improve both engraftment and *in vivo* expansion of autologous cells, genetically modified by integrating vector systems introducing the therapeutic gene.

Acknowledgments

The authors thank M. Garín for the careful reading of the manuscript and helpful suggestions; Sergio García, Jesús Martínez, and Elena López for excellent technical work; and Roser Pujol for cytogenetic analysis.

This work was supported by grants from the European Program “Life Sciences, Genomics and Biotechnology for

Health” (Concerted Safety and Efficiency Evaluation of Retroviral Transgenesis [CONCERT]; Ref 005242), Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología (SAF2005-00058 and SAF-2006-03440), Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER), and Genoma España. Centro de Investigaciones Energéticas, Medioambientales y Tecnológicas (CIEMAT) also received support from the Marcelino Botín Foundation for Translational Research on Biomedicine. This work was also supported by a grant from Consejo de Desarrollo Científico Humanístico y Tecnológico–Universidad de Los Andes (CDCHT-ULA; M-941-08-07-A) (N.W.M.) and Deutsche Forschungsgemeinschaft (H2322/1, SPP1230) (H.H.).

Authorship

Contribution: P.R., N.W.M., A.G.-M., S.N., L.A., J.S., M.C., and G.G. performed the experiments; and J.A.B., P.R., J.C.S., and H.H. designed the experiments and wrote the paper.

Conflict-of-interest disclosure: H.H. may receive royalties based on a license agreement between Indiana University and Takara Shuzo, Ltd, resulting from the sale of the fibronectin fragment CH296 (Retronectin). The remaining authors declare no competing financial interests.

Correspondence: Juan A. Bueren, Hematopoiesis and Gene Therapy Division, Centro de Investigaciones Energéticas, Medioambientales y Tecnológicas, Avda Complutense, No. 22, 28040 Madrid, Spain; e-mail: juan.bueren@ciemat.es.

References

- Kutler DI, Singh B, Satagopan J, et al. A 20-year perspective on the International Fanconi Anemia Registry (IFAR). *Blood*. 2003;101:1249-1256.
- Wang W. Emergence of a DNA-damage response network consisting of Fanconi anaemia and BRCA proteins. *Nat Rev Genet*. 2007;8:735-748.
- Waisfisz Q, Morgan NV, Savino M, et al. Spontaneous functional correction of homozygous fanconi anaemia alleles reveals novel mechanistic basis for reverse mosaicism. *Nat Genet*. 1999;22:379-383.
- Gregory JJ Jr, Wagner JE, Verlander PC, et al. Somatic mosaicism in Fanconi anemia: evidence of genotypic reversion in lymphohematopoietic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98:2532-2537.
- Gross M, Hanenberg H, Lobitz S, et al. Reverse mosaicism in Fanconi anemia: natural gene therapy via molecular self-correction. *Cytogenet Genome Res*. 2002;98:126-135.
- Cavazzana-Calvo M, Hacein-Bey S, de Saint Basile G, et al. Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. *Science*. 2000;288:669-672.
- Aiuti A, Slavin S, Aker M, et al. Correction of ADA-SCID by stem cell gene therapy combined with nonmyeloablative conditioning. *Science*. 2002;296:2410-2413.
- Gaspar HB, Parsley KL, Howe S, et al. Gene therapy of X-linked severe combined immunodeficiency by use of a pseudotyped gammaretroviral vector. *Lancet*. 2004;364:2181-2187.
- Liu JM, Kim S, Read EJ, et al. Engraftment of hematopoietic progenitor cells transduced with the Fanconi anemia group C gene (FANCC). *Hum Gene Ther*. 1999;10:2337-2346.
- Walsh CE, Fu K, Brecher M, Kirby S, Jacobs P, Yamada K. Retroviral-mediated gene transfer for Fanconi anemia group A patients: a clinical trial. *Blood*. 2001;98:718a.
- Kelly PF, Radtke S, Kalle C, et al. Stem cell collection and gene transfer in fanconi anemia. *Mol Ther*. 2007;15:211-219.
- Haneline LS, Li X, Ciccone SL, et al. Retroviral-mediated expression of recombinant FancC enhances the repopulating ability of FancC^{-/-} hematopoietic stem cells and decreases the risk of clonal evolution. *Blood*. 2003;101:1299-1307.
- Si Y, Pulliam AC, Linka Y, et al. Overnight transduction with foamyviral vectors restores the long-term repopulating activity of FancC^{-/-} stem cells. *Blood*. 2008;112:4458-4465.
- Gush KA, Fu KL, Grompe M, Walsh CE. Phenotypic correction of Fanconi anemia group C knockout mice. *Blood*. 2000;95:700-704.
- Noll M, Bateman RL, D'Andrea AD, Grompe M. Preclinical protocol for *in vivo* selection of hematopoietic stem cells corrected by gene therapy in Fanconi anemia group C. *Mol Ther*. 2001;3:14-23.
- Galimi F, Noll M, Kanazawa Y, et al. Gene therapy of Fanconi anemia: preclinical efficacy using lentiviral vectors. *Blood*. 2002;100:2732-2736.
- Battaille KP, Bateman RL, Mortimer D, et al. *In vivo* selection of wild-type hematopoietic stem cells in a murine model of Fanconi anemia. *Blood*. 1999;94:2151-2158.
- Li X, Yang Y, Yuan J, et al. Continuous *in vivo* infusion of interferon-gamma (IFN-gamma) preferentially reduces myeloid progenitor numbers and enhances engraftment of syngeneic wild-type cells in FancC^{-/-} mice. *Blood*. 2004;104:1204-1209.
- Si Y, Ciccone S, Yang FC, et al. Continuous *in vivo* infusion of interferon-gamma (IFN-gamma) enhances engraftment of syngeneic wild-type cells in FancC^{-/-} and Fancg^{-/-} mice. *Blood*. 2006;108:4283-4287.
- Navarro S, Meza NW, Quintana-Bustamante O, et al. Hematopoietic dysfunction in a mouse model for Fanconi anemia group D1. *Mol Ther*. 2006;14:525-535.
- McAllister KA, Bennett LM, Houle CD, et al. Cancer susceptibility of mice with a homozygous deletion in the COOH-terminal domain of the Brca2 gene. *Cancer Res*. 2002;62:990-994.
- Chen M, Tomkins DJ, Auerbach W, et al. Inactivation of Fac in mice produces inducible chromosomal instability and reduced fertility reminiscent of Fanconi anaemia. *Nat Genet*. 1996;12:448-451.
- Cheng NC, van de Vrugt HJ, van der Valk MA, et al. Mice with a targeted disruption of the Fanconi anemia homolog FancA. *Hum Mol Genet*. 2000;9:1805-1811.
- Yang Y, Kuang Y, De Oca RM, et al. Targeted disruption of the murine Fanconi anemia gene, Fancg/Xrcc9. *Blood*. 2001;98:3435-3440.
- Koomen M, Cheng NC, van De Vrugt HJ, et al. Reduced fertility and hypersensitivity to mitomycin C characterize Fancg/Xrcc9 null mice. *Hum Mol Genet*. 2002;11:273-281.
- Rio P, Segovia JC, Hanenberg H, et al. *In vitro* phenotypic correction of hematopoietic progenitors from Fanconi anemia group A knockout mice. *Blood*. 2002;100:2032-2039.
- Houghtaling S, Timmers C, Noll M, et al. Epithelial cancer in Fanconi anemia complementation group D2 (Fancd2) knockout mice. *Genes Dev*. 2003;17:2021-2035.
- Montini E, Cesana D, Schmidt M, et al. Hematopoietic stem cell gene transfer in a tumor-prone mouse model uncovers low genotoxicity of lentiviral vector integration. *Nat Biotechnol*. 2006;24:*

29. Muller LU, Milsom MD, Kim MO, Schambach A, Schuesler T, Williams DA. Rapid lentiviral transduction preserves the engraftment potential of Fanca(-/-) hematopoietic stem cells. *Mol Ther.* 2008;16:1154-1160.
30. Dull T, Zufferey R, Kelly M, et al. A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system. *J Virol.* 1998;72:8463-8471.
31. Almarza E, Rio P, Meza NW, et al. Characteristics of lentiviral vectors harboring the proximal promoter of the *vav* proto-oncogene: a weak and efficient promoter for gene therapy. *Mol Ther.* 2007;15:1487-1494.
32. Villella ADYJ, Getty RR, Juliar BE, et al. Real-time PCR: an effective tool for measuring transduction efficiency in human hematopoietic progenitor cells. *Mol Ther.* 2005;11:483-491.
33. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. *Methods.* 2001;25:402-408.
34. Godthelp BC, Wiegant WW, Waisfisz Q, et al. Inducibility of nuclear Rad51 foci after DNA damage distinguishes all Fanconi anemia complementation groups from D1/BRCA2. *Mutat Res.* 2006;594:39-48.
35. Ott MG, Schmidt M, Schwarzwaelder K, et al. Correction of X-linked chronic granulomatous disease by gene therapy, augmented by insertional activation of MDS1-EVI1, PRDM16 or SETBP1. *Nat Med.* 2006;12:401-409.
36. Hacein-Bey-Abina S, Von Kalle C, Schmidt M, et al. LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. *Science.* 2003;302:415-419.
37. Kustikova O, Fehse B, Modlich U, et al. Clonal dominance of hematopoietic stem cells triggered by retroviral gene marking. *Science.* 2005;308:1171-1174.
38. Baum C, von Kalle C, Staal FJ, et al. Chance or necessity: insertional mutagenesis in gene therapy and its consequences. *Mol Ther.* 2004;9:5-13.
39. Baum C, Kustikova O, Modlich U, Li Z, Fehse B. Mutagenesis and oncogenesis by chromosomal insertion of gene transfer vectors. *Hum Gene Ther.* 2006;17:253-263.*

Anexo 3:

**“Disease-corrected haematopoietic progenitors
from Fanconi anaemia induced pluripotent stem
cells”**

Nature. 2009 Jul 2;460(7251):53-9

Disease-corrected haematopoietic progenitors from Fanconi anaemia induced pluripotent stem cells

Ángel Raya^{1,2,3}, Ignasi Rodríguez-Pizà¹, Guillermo Guenechea^{4,5}, Rita Vassena¹, Susana Navarro^{4,5}, María José Barrero¹, Antonella Consiglio^{1,6}, Maria Castellà^{5,7}, Paula Río^{4,5}, Eduard Sleep^{1,3}, Federico González¹, Gustavo Tiscornia¹, Elena Garreta^{1,3}, Trond Aasen^{1,3}, Anna Veiga¹, Inder M. Verma⁸, Jordi Surrallés^{5,7}, Juan Bueren^{4,5} & Juan Carlos Izpisua Belmonte^{1,9}

The generation of induced pluripotent stem (iPS) cells has enabled the derivation of patient-specific pluripotent cells and provided valuable experimental platforms to model human disease. Patient-specific iPS cells are also thought to hold great therapeutic potential, although direct evidence for this is still lacking. Here we show that, on correction of the genetic defect, somatic cells from Fanconi anaemia patients can be reprogrammed to pluripotency to generate patient-specific iPS cells. These cell lines appear indistinguishable from human embryonic stem cells and iPS cells from healthy individuals. Most importantly, we show that corrected Fanconi-anaemia-specific iPS cells can give rise to haematopoietic progenitors of the myeloid and erythroid lineages that are phenotypically normal, that is, disease-free. These data offer proof-of-concept that iPS cell technology can be used for the generation of disease-corrected, patient-specific cells with potential value for cell therapy applications.

The possibility of reprogramming mature somatic cells to generate iPS cells^{1–5} has enabled the derivation of disease-specific pluripotent cells, thus providing unprecedented experimental platforms to model human disease^{6–9}. In addition, the generation of patient-specific iPS cells may have a wide range of applications in cell and gene therapy, and could be particularly relevant for the treatment of inherited bone marrow failure (BMF) syndromes, where the progressive decline in haematopoietic stem cell (HSC) numbers limits the production of peripheral blood cells.

Among the different inherited BMF syndromes, Fanconi anaemia (FA) is the most common¹⁰. FA is a rare recessive, autosomal or X-linked, chromosomal instability disorder caused by mutations in any of the 13 genes so far identified in the FA pathway¹¹. Cells from these patients display typical chromosomal instability and hypersensitivity to DNA crosslinking agents, characteristics that are used to make the diagnosis of FA¹². Most FA patients develop BMF, which typically appears during the first decade of life, and some patients show increased predisposition to develop malignancies (cumulative incidence of ~30% by 40 years of age)¹³. Currently, the therapy of choice for BMF in FA patients is the transplantation of haematopoietic grafts from HLA-identical siblings, whereas the output of transplants from non-related donors is more limited^{14,15}. Somatic mosaicism, acting as a natural gene therapy in FA patients, showed that genetic correction confers a selective growth advantage to HSCs from FA patients, a process that can ultimately restore the haematopoietic system of the patient with phenotypically normal cells^{16–18}. A selective proliferation advantage has also been observed in FA mouse models after *ex vivo* genetic correction of their HSCs with lentiviral vectors¹⁹. In spite of

these observations, gene therapy trials conducted so far in FA patients have not been clinically successful^{20,21}, owing to the paucity and poor quality of HSCs in the bone marrow of FA patients^{20–23}.

As a consequence of the genetic instability of FA cells, genetic defects eventually produced before gene therapy correction would not be repaired. Nevertheless, the generation of genetically corrected FA-specific iPS cells by the reprogramming of non-haematopoietic somatic cells would result in the production of large numbers of autologous, genetically stable HSCs that may be used to treat BMF in FA patients.

Generation of patient-specific iPS cells

We obtained samples from six FA patients, four from the FA-A complementation group (patients FA5, FA90, FA153 and FA404) and two from the FA-D2 complementation group (FA430 and FA431). Samples from patients FA5, FA90, FA153, FA430 and FA431 were cryopreserved primary dermal fibroblasts that had undergone an undetermined number of passages. From patient FA404 we obtained a skin biopsy, from which we established primary cultures of dermal fibroblasts and epidermal keratinocytes. We first attempted to optimize the reprogramming protocol using primary dermal fibroblasts from a foreskin biopsy of a healthy donor (see Supplementary Information and Supplementary Fig. 1). Our improved reprogramming protocol consisted of two rounds of infection with mouse-stem-cell-virus-based retroviruses encoding amino-terminal Flag-tagged versions of OCT4 (also known as POU5F1), SOX2, KLF4 and c-MYC (also known as MYC), performed 6 days apart. Transduced fibroblasts were passaged after 5 days onto a feeder layer

¹Center for Regenerative Medicine in Barcelona, Dr. Aiguader 88, 08003 Barcelona, Spain. ²Institució Catalana de Recerca i Estudis Avançats (ICREA), ³Networking Center of Biomedical Research in Bioengineering, Biomaterials and Nanomedicine (CIBER-BBN), ⁴Hematopoiesis and Gene Therapy Division, Centro de Investigaciones Energéticas, Medioambientales y Tecnológicas (CIEMAT), Av. Complutense 22, 28040 Madrid, Spain. ⁵Networking Center of Biomedical Research in Rare Diseases (CIBERER), ⁶Department of Biomedical Science and Biotechnology, University of Brescia, Viale Europa 11, 25123 Brescia, Italy. ⁷Department of Genetics and Microbiology, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Spain. ⁸Laboratory of Genetics, ⁹Gene Expression Laboratory, Salk Institute for Biological Studies, 10010 North Torrey Pines Road, La Jolla, California 92037, USA.

of primary human fibroblasts and switched to human embryonic stem (ES) cell medium the next day. We also included a selection step based on the combined inhibition of MAP2K1 and GSK3B with inhibitors PD0325901 and CT99021 (a combination termed 2i that enhances derivation and growth of mouse ES cells²⁴) for 1 week, starting 1 week after plating onto feeders.

Because of the genetic instability and apoptotic predisposition of FA cells²⁵, somatic cells were reprogrammed either directly or after genetic correction with lentiviral vectors encoding FANCA or FANCD2, respectively. We have previously shown that genetic complementation of human and mouse FA cells with these vectors efficiently corrects the FA phenotype^{19,23,26}. We were not successful at obtaining iPS-like colonies from fibroblasts of patients FA5, FA153 or FA430, either unmodified or corrected, after at least five reprogramming attempts, probably owing to the cells having accumulated too many passages and/or karyotypic abnormalities (Supplementary Table 1). However, from patient FA90 we readily obtained iPS-like colonies when using genetically corrected fibroblasts (Fig. 1a). Overall, we obtained 10–15 iPS-like colonies in each of 3 independent experiments. Of these, we randomly picked ten colonies, all of which could successfully be expanded and grew as colonies morphologically indistinguishable from human ES cells (Fig. 1b) that stained strongly positive for alkaline phosphatase activity (Fig. 1c). Five of these lines (cFA90-44-1, -11, -14, -20 and -21) were selected for further characterization. All of them displayed a normal karyotype (46 XX) at passages 12–16 and could be maintained in culture for, at least, 20 passages. At the time of the writing, cFA90-44-14 had undergone 43 passages without signs of replicative crisis, while maintaining a normal karyotype (Supplementary Fig. 2). Immunofluorescence analyses of the five lines revealed expression of transcription factors (OCT4, SOX2, NANOG) and surface markers (SSEA3, SSEA4, TRA1-60, TRA1-81) characteristic of pluripotent cells (Fig. 1d–f and Supplementary Fig. 3).

With somatic cells from another FA-A patient, patient FA404, we obtained similar results. Fibroblasts that had been transduced with lentiviruses encoding FANCA (Fig. 1g) were readily reprogrammed to generate iPS-like cells (Fig. 1h). We established two cell lines

(cFA404-FiPS4F1 and cFA404-FiPS4F2), which displayed typical human ES-like morphology and growth characteristics, stained positive for alkaline phosphatase activity and expressed all the pluripotency-associated markers tested (Fig. 1i–l and Supplementary Fig. 4). From patient FA404 we also derived primary epidermal keratinocytes, which we reprogrammed using a protocol recently set up in our laboratory²⁷. We generated three iPS cell lines (cFA404-KiPS4F1, -KiPS4F3 and -KiPS4F6) from genetically corrected keratinocytes, which displayed all the main characteristics of bona fide iPS cells and human ES cells (Supplementary Fig. 4) and a normal 46 XY karyotype (Supplementary Fig. 2).

We were also successful at reprogramming fibroblasts from patient FA431 (Supplementary Fig. 5a), a FA-D2 patient. In this case, iPS-like colonies appeared in roughly equal numbers from either unmodified or genetically corrected fibroblasts (Supplementary Table 1). We picked two iPS-like colonies from either condition, which grew after passaging and stained positive for alkaline phosphatase activity (Supplementary Fig. 5c, g). However, whereas those derived from corrected fibroblasts (cFA431-44-1 and cFA431-44-2) could be maintained in culture for extended periods of time (18 passages at the time of writing) and showed expression of pluripotency-associated transcription factors and surface markers (Supplementary Fig. 5d–f and data not shown), those derived from unmodified fibroblasts experienced a progressive growth delay and could not be maintained over the third passage (Supplementary Fig. 5g). The observation that uncorrected FA-D2 fibroblasts from patient FA431 could be reprogrammed, while we only obtained iPS cells from FANCA-complemented fibroblasts from patients FA90 or FA404, could be explained by the fact that FA-D2 patients, in particular FA431, carry hypomorphic mutations compatible with the expression of residual FANCD2 protein²⁸. Therefore, it appears that restoration of the FA pathway is a pre-requisite for iPS cell generation from somatic cells of FA patients (in total, 12 out of 28 independent reprogramming attempts were successful when using genetically corrected cells—also including the patients for which reprogramming was never successful—versus 0 out of 28 successful attempts when uncorrected cells were used; $\chi^2 [1] = 15.27, P = 9.3 \times 10^{-5}$).

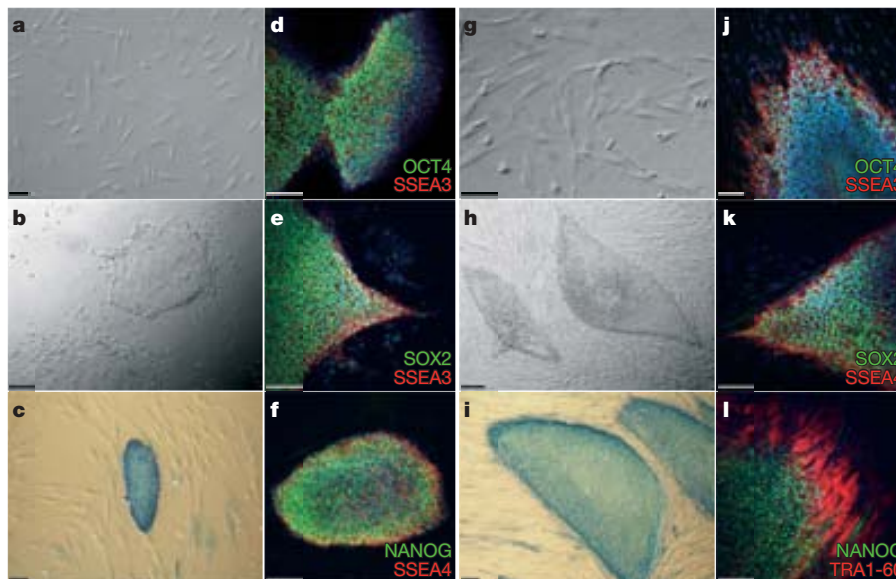


Figure 1 | Derivation of patient-specific induced pluripotent stem cells from Fanconi anaemia patients. a–f, Successful reprogramming of genetically corrected primary dermal fibroblasts (a) derived from patient FA90. b, Colony of iPS cells from the cFA90-44-14 line grown on Matrigel-coated plates showing human-ES-cell-like morphology. c–f, The same iPS cell line shows strong alkaline phosphatase staining (c) and expression of the transcription factors OCT4 (d), SOX2 (e) and NANOG (f) and the surface markers SSEA3 (d, e) and SSEA4 (f). g, Genetically corrected fibroblasts

from patient FA404. h, Colony of iPS cells from the cFA404-FiPS4F1 line grown on feeder cells displaying typical human ES cell morphology. i–l, The same iPS cell line shows strong alkaline phosphatase staining (i) and expression of the pluripotency-associated transcription factors OCT4 (j), SOX2 (k) and NANOG (l) and surface markers SSEA3 (j), SSEA4 (k) and TRA1-80 (l). Cell nuclei were counterstained with 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) in d–f and j–l. Scale bars, 100 μ m (a, c–g, i–l) and 250 μ m (b, h).

Characterization of iPS cells

Out of the 19 FA-iPS cell lines generated in these studies, we selected 10 for more thorough characterization (Supplementary Table 1). We confirmed the presence of the reprogramming transgenes integrated in their genome by polymerase chain reaction (PCR) of genomic DNA (Fig. 2a and Supplementary Fig. 6), as well as the origin of the iPS cell lines by comparing their HLA type and DNA fingerprint with those of patients' somatic cells (Supplementary Table 2). In all lines tested, transgenic expression of the four reprogramming factors was reduced to low or undetectable levels, compared to an iPS cell line (KiPS4F3) previously shown not to have silenced the retroviral expression of *OCT4* and *c-MYC*²⁷ (Fig. 2b). Furthermore, all the FA-iPS cell lines tested showed re-activation of endogenous *OCT4* and *SOX2* expression, as well as of other pluripotency-associated transcription factors such as *NANOG*, *REX-1* (also known as *ZFP42*) and *CRIPTO* (also known as *TDGF1*; Fig. 2c). Taking advantage of the fact that our retroviral transgenes were Flag-tagged, we confirmed by immunofluorescence that iPS cells displayed negligible anti-Flag immunoreactivity (Fig. 2d–g). Finally, the promoters of the pluripotency-associated transcription factors *OCT4* and *NANOG*, heavily methylated in patients' fibroblasts, were demethylated in FA-iPS cells (Fig. 2h), indicating epigenetic reprogramming to pluripotency.

We next analysed the differentiation ability of FA-iPS cells. *In vitro*, iPS-derived embryoid bodies readily differentiated into endoderm, ectoderm and mesoderm derivatives as judged by cell morphology and specific immunostaining with antibodies against α -fetoprotein/FOXA2, TuJ1/GFAP and α -actinin, respectively (Fig. 3a–c, and Supplementary Fig. 7). Following specific *in vitro* differentiation protocols, iPS cells gave rise to specialized mesoderm-derived cell types such as rhythmically beating cardiomyocytes (Supplementary Movie

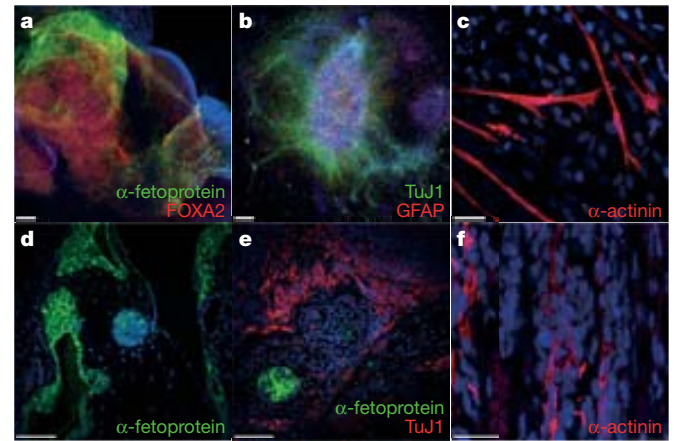


Figure 3 | Pluripotency of FA-iPS cells. a–c, *In vitro* differentiation experiments of cFA404-FiPS4F2 iPS cells reveal their potential to generate cell derivatives of all three primary germ cell layers. Immunofluorescence analyses show expression of markers of a, endoderm (α -fetoprotein, green; FOXA2, red), b, neuroectoderm (TuJ1, green; GFAP, red), and, c, mesoderm (α -actinin, red). d–f, Injection of cFA90-44-14 iPS cells into the testes of immunocompromised mice results in the formation of teratomas containing structures that represent the three main embryonic germ layers. Endoderm derivatives (d, e) include glandular structures that stain positive for endoderm markers (α -fetoprotein, green); ectoderm derivatives (e) include structures that stain positive for neuroectoderm markers (TuJ1, red); mesoderm derivatives (f) include structures that stain positive for muscle markers (α -actinin, red). All images are from the same tumour. Scale bars, 100 μ m (a, b, d, e) and 25 μ m (c, f).

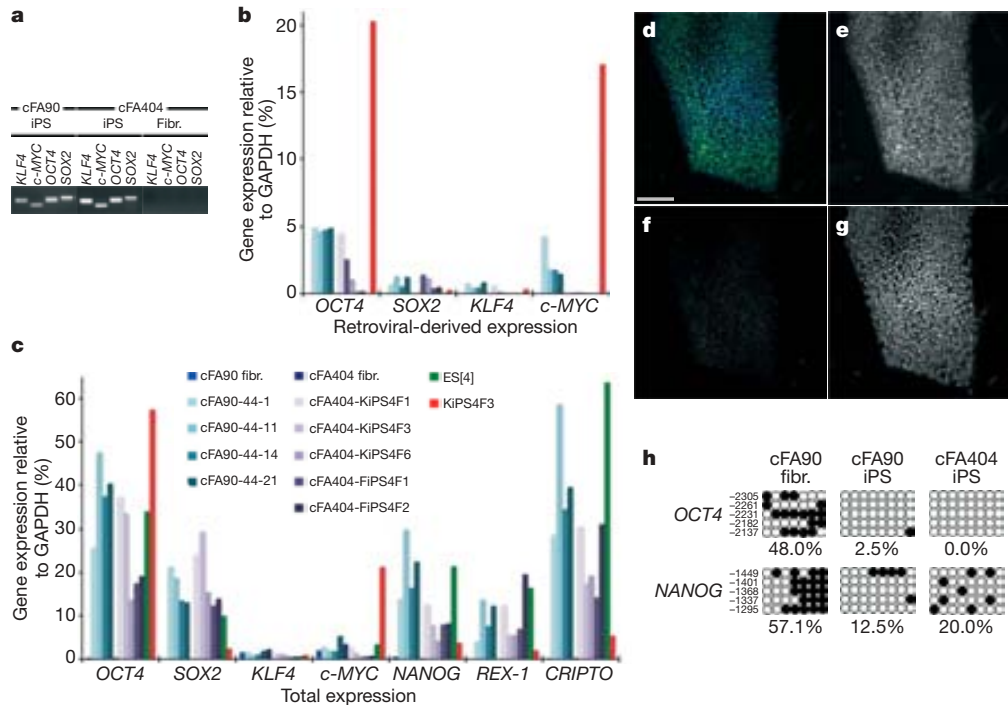


Figure 2 | Molecular characterization of FA-iPS cell lines. a, PCR of genomic DNA to detect integration of the indicated retroviral transgenes in FA-iPS cell lines cFA90-44-14 (cFA90) and cFA404-FiPS4F1 (cFA404). Genetically corrected fibroblasts (Fibr.) from patient FA404 before reprogramming were used as negative control. b, c, Quantitative PCR with reverse transcription (RT-PCR) analyses of the expression levels of retroviral-derived reprogramming factors (b) and of total expression levels of reprogramming factors and pluripotency-associated transcription factors (c) in the indicated patients' fibroblasts (fibr.) and FA-iPS cell lines. Human ES cells (ES[4]) and partially silenced iPS cells (KiPS4F3) are included as

controls. Transcript expression levels are plotted relative to GAPDH expression. d–g, Colony of cFA90-44-14 iPS cells showing high levels of endogenous NANOG expression (e, green channel in d) and absence of Flag immunoreactivity (f, red channel in d). Cell nuclei were counterstained with DAPI (g, blue channel in d). h, Bisulphite genomic sequencing of the *OCT4* and *NANOG* promoters showing demethylation in FA-iPS cell lines cFA90-44-14 and cFA404-KiPS4F3, compared to patient's fibroblasts. Open and closed circles represent unmethylated and methylated CpGs, respectively, at the indicated promoter positions. Scale bar, 100 μ m.

1) and haematopoietic progenitor cells (see below). We also subjected our FA-iPS cells to the most stringent test available to assess pluripotency of human cells, the formation of bona fide teratomas²⁹. For this purpose, we injected cells from eight different lines into the testes of immunocompromised mice. In all cases, teratomas could be recovered after 8–10 weeks that were composed of complex structures representing the three main embryonic germ layers, including glandular formations that stained positive for definitive endoderm markers, neural structures that expressed neuroectodermal markers, and mesoderm derivatives such as muscle and cartilage (Fig. 3d–f, Supplementary Fig. 8 and data not shown). Using comparable assays, we have recently characterized the *in vitro* differentiation and teratoma induction abilities of a variety of normal human pluripotent stem cell lines, including human ES cells³⁰ and iPS cells generated from healthy donors²⁷. Overall, we did not detect conspicuous differences in the differentiation ability of FA-iPS cell lines compared to that of either human ES cells or normal iPS cells.

FA-specific iPS cells are disease-free

Consistent with the previous genetic correction of somatic cells used for reprogramming, we could detect the presence of integrated copies of the gene therapy vectors by quantitative PCR of genomic DNA in all FA-iPS cell lines tested (Supplementary Fig. 9a). A concern with gene therapy strategies is the silencing of the correcting transgene. For this reason, we chose lentiviruses as gene therapy vectors, because lentiviral transgenes are particularly resistant to silencing in human ES cells³¹. However, this resistance appears to be promoter-dependent³² and nearly complete silencing of lentiviral transgenes has been recently

observed in the context of induced reprogramming^{3,8}. In our experiments, the *FANCA* lentivirus was partially silenced in FA-iPS cells, as evidenced by the loss of *IRES-GFP* (internal ribosome entry site-green fluorescent protein) fluorescence (data not shown), which was detectable in transduced fibroblasts (Supplementary Fig. 9b). However, transgene silencing was not complete, as we could detect *FANCA* expression in all the FA-iPS cell lines analysed, but not in the patients' fibroblasts (Fig. 4a). To test the functionality of the FA pathway in FA-iPS cells, we induced subnuclear accumulation of stalled replication forks by high-energy local ultraviolet irradiation across a filter with 5 µm pores and checked whether FANCD2 relocated to the locally damaged subnuclear areas³³. In those experiments, fibroblast-like cells derived from FA-iPS cells showed normal relocation of FANCD2 (Fig. 4b). In addition, we induced replication fork collapse by treating FA-iPS-derived cells with the DNA replication inhibitor hydroxyurea. Also, in this case, FA-iPS-derived cells displayed normal relocation of FANCD2 (Supplementary Fig. 10). These results, together with the persistent *FANCA* expression in FA-iPS cells, clearly show that iPS cells generated from genetically corrected FA somatic cells maintain a fully functional FA pathway and are, thus, phenotypically disease free.

Our findings that successful reprogramming of FA cells only occurred in those that had been transduced with *FANCA*-expressing lentiviruses (in spite of only 35–50% of cells being actually transduced with the correcting lentiviruses; see Supplementary Fig. 9b), and that lentiviral transgenes were not completely silenced in FA-iPS cells, indicate that a functional FA pathway confers a strong selection advantage for iPS cell generation and/or maintenance. To address

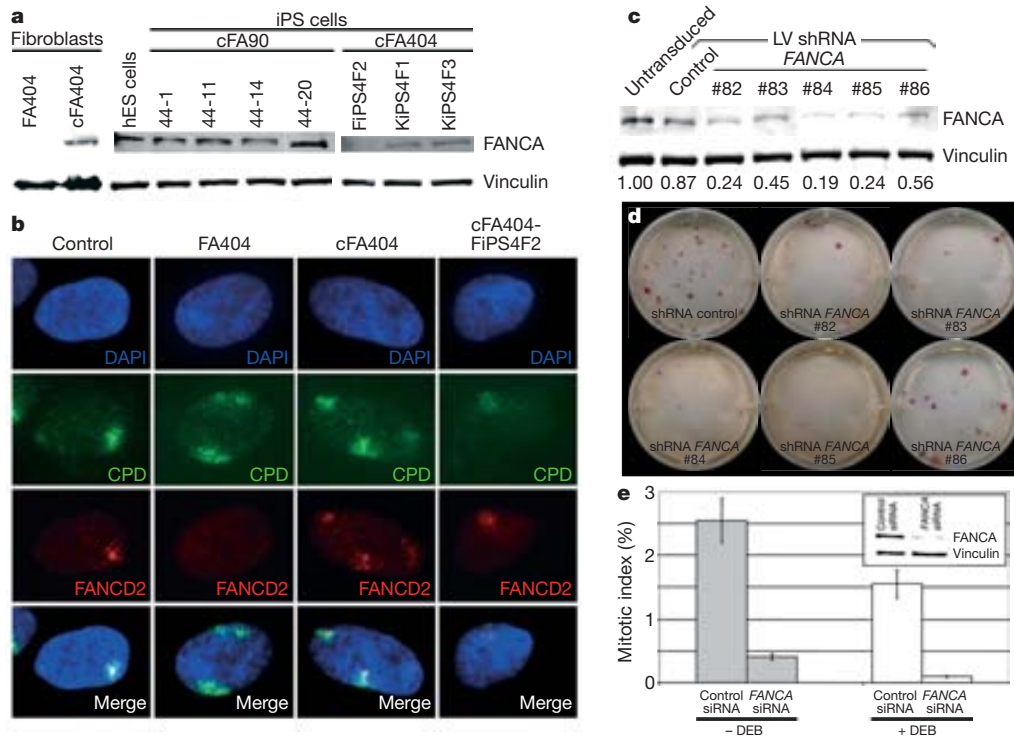


Figure 4 | Functional FA pathway in FA-iPS cells. a, Western blot analysis of *FANCA* in protein extracts from the indicated cell lines, showing expression of *FANCA* in FA-iPS cells. The expression of vinculin was used as a loading control. hES, human ES. **b**, *FANCD2* (red channel) fails to relocate to UVC-radiation-induced stalled replication forks, visualized by immunofluorescence with antibodies against cyclobutane pyrimidine dimers (CPD, green channel), in fibroblasts from patient FA404, whereas it shows normal accumulation to damaged sites in wild-type fibroblasts (control), corrected fibroblasts (cFA404) or FA-iPS-derived cells (cFA404-FiPS4F2). **c**, Western blot analysis of *FANCA* in protein extracts from untransduced cFA404-KiPS4F3 cells or 6 days after transduction with lentiviruses expressing scramble shRNA (control) or the indicated *FANCA* 208

shRNAs. The expression of vinculin was used as a loading control. Values at the bottom represent *FANCA* expression levels measured by densitometry quantification normalized by vinculin expression and referred to untransduced cFA404-KiPS4F3 cells. **d**, Alkaline phosphatase staining of cFA404-KiPS4F3 cells one passage after being transduced with lentiviruses expressing scramble shRNA (control) or the indicated *FANCA* shRNAs, one week after seeding. **e**, Mitotic index values in cFA404-FiPS4F2-derived cells transfected with scramble (control) or *FANCA* siRNAs and incubated in the absence or in the presence of diepoxybutane (DEB). The inset shows *FANCA* depletion induced by *FANCA* siRNAs in these experiments, as visualized by western blot using vinculin as a loading control. Data are presented as mean ± s.d.

this possibility directly, we knocked down the transgenic expression of *FANCA* in FA-iPS cells by lentiviral delivery of *FANCA* short hairpin RNAs (shRNAs). Of the five different shRNAs tested, three achieved greater than 70% downregulation of *FANCA* expression in cFA404-KiPS4F3 cells (Fig. 4c). Notably, iPS cells with the lowest *FANCA* levels failed to proliferate after one passage (Fig. 4d). Similar results were obtained with cFA90-44-14 cells (data not shown). In a complementary approach, transient downregulation of *FANCA* expression in FA-iPS-derived cells by small interfering RNA (siRNA) transfection led to a marked decrease in cell proliferation (~7-fold) compared to scramble-siRNA-transfected cells (Fig. 4e), which was even more pronounced (~15-fold) in response to diepoxybutane-induced DNA damage (Fig. 4e). These results provide further evidence for the FA disease-free status of our FA-iPS cells and, importantly, unveil a previously unsuspected role of the FA pathway as a critical player in the maintenance of pluripotent stem cell self-renewal.

Disease-free haematopoietic progenitors

To test the haematopoietic differentiation ability of FA-iPS cells, embryoid bodies from six different lines (cFA90-44-11 and -44-14,

cFA404-FiPS4F2, -KiPS4F1, -KiPS4F3 and -KiPS4F6) were co-cultured with OP9 stromal cells³⁴ in the presence of haematopoietic cytokines. In all cases, we could detect CD34⁺ cells by flow cytometry starting at day 5 and peaking at day 12 ($7.23 \pm 2.57\%$, $n = 7$). We could also detect CD45⁺ cells in those cultures from day 10, which reached $0.95 \pm 0.38\%$ ($n = 6$) by day 12 (Fig. 5a). The timing of appearance and frequency of haematopoietic progenitors obtained from FA-iPS cells were similar to those obtained using iPS cells from healthy individuals ($7.24 \pm 3.43\%$ of CD34⁺ cells at day 12, $n = 5$ from 2 independent iPS cell lines) and human ES cells ($6.62 \pm 1.03\%$ of CD34⁺ cells at day 12, $n = 5$ from 2 independent human ES cell lines; see also ref. 35).

We purified FA-iPS-derived CD34⁺ cells at day 12 of the differentiation protocol by two rounds of magnetic-activated cell sorting (MACS) to test their haematopoietic differentiation ability in clonogenic progenitor assays. FA-iPS-derived CD34⁺ cells generated large erythroid (burst-forming unit-erythroid (BFU-E)) and myeloid (colony-forming unit-granulocytic, monocytic (CFU-GM)) colonies (Fig. 5b, c). The myeloid nature of CFU-GM colonies was confirmed by the expression of the CD33 and CD45 markers in these colonies (Fig. 5d). The haematopoietic potential of FA-iPS-derived CD34⁺

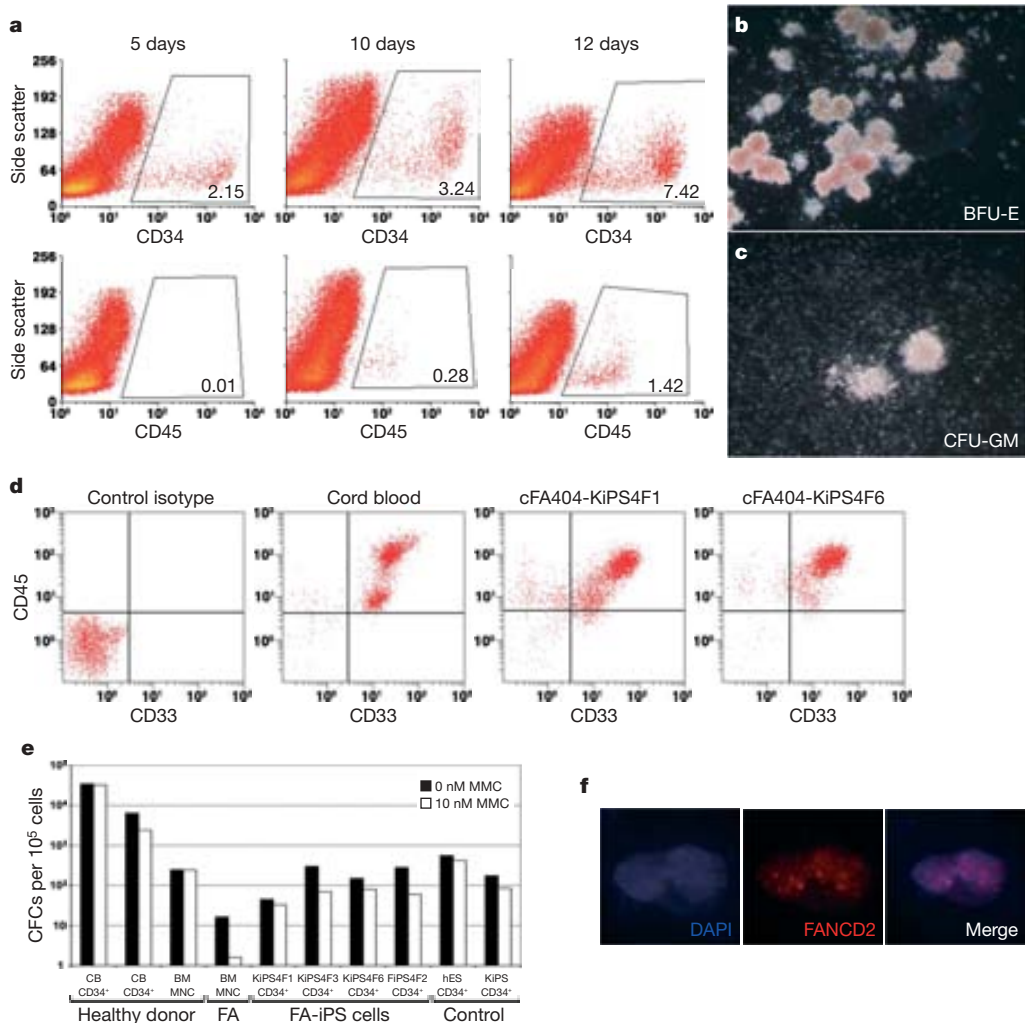


Figure 5 | Generation of disease-free haematopoietic progenitors from FA-iPS cell lines. **a**, Expression of CD34 and CD45 markers in FA-iPS cells subjected to haematopoietic differentiation. **b**, **c**, Representative erythroid (BFU-E) and myeloid (CFU-GM) colonies generated 14 days after the incubation of iPS-derived CD34⁺ cells in semisolid cultures. **d**, The myeloid nature of CFU-GM colonies was confirmed by the co-expression of the CD33 and CD45 markers in CFU-GM colonies. **e**, Total number of CFCs generated in the absence and the presence of 10 nM mitomycin C (MMC) from CD34⁺

cells derived from the indicated FA-iPS cell lines. For comparison, clonogenic assays were also performed using haematopoietic progenitors from healthy donors (purified CD34⁺ cord blood cells from two independent donors, CB CD34⁺; and mononuclear bone marrow cells, BM MNC), from a FA patient and from CD34⁺ cells derived from control human pluripotent stem cells, including ES[2] cells (hES) and KiPS4F1 (KiPS) cells. **f**, Immunofluorescence analysis showing FANCD2 foci in mitomycin-C-treated CD34⁺ cells derived from FA-iPS cells (line cFA90-44-14).

cells was robust and the numbers of colony-forming cells (CFCs) obtained in clonogenic assays were comparable to those obtained from CD34⁺ cells derived from human ES cells or control iPS cells (Fig. 5e, solid bars). These results indicate that FA-iPS cells successfully differentiated into haematopoietic progenitors of the erythroid and myeloid lineages. We also attempted to generate blood cells in nonobese diabetic/severe combined immunodeficient mice transplanted with FA-iPS-derived CD34⁺ cells, but no engraftment was observed, in agreement with the reported technical limitation for repopulating immunodeficient mice with *in-vitro*-differentiated human ES cells³⁶.

To test whether FA-iPS-derived haematopoietic progenitors maintained the disease-free phenotype of FA-iPS cells, haematopoietic colonies were also cultured in the presence of mitomycin C, because hypersensitivity to DNA crosslinking agents is a hallmark of FA cells¹². The proportion of mitomycin-C-resistant colonies obtained from FA-iPS-derived CD34⁺ cells was similar to that obtained from mononuclear bone marrow cells from healthy donors, or from human ES- or control iPS-derived CD34⁺ cells, and contrasted sharply with the hypersensitivity to mitomycin C shown by FA mononuclear bone marrow cells (Fig. 5e, white bars). Moreover, FA-iPS-derived CD34⁺ cells were able to form nuclear foci after exposure to mitomycin C (Fig. 5f), demonstrating a functional FA pathway.

Discussion

Before the clinical application of iPS-based strategies is realized, a number of caveats must be resolved. Retroviral transduction of adult somatic cells with OCT4, SOX2, KLF4 and c-MYC, although currently the most efficient method for generating human iPS cells, results in permanent undesirable transgene integrations. Although the retroviral transgenes become silenced during reprogramming, their re-activation during cell differentiation (particularly that of the proto-oncogene c-MYC) has been associated with tumour formation³⁷. Human iPS cells can be generated without c-MYC, but reprogramming efficiency in this case is markedly reduced^{27,38}. To ascertain whether FA-iPS cells could be generated without c-MYC, we used primary keratinocytes from patient FA404. After three reprogramming attempts, we generated one iPS cell line (cFA404-KiPS3F1), which expanded robustly and showed all the characteristics and differentiation ability of iPS cells generated with four factors, and gave rise to haematopoietic progenitors *in vitro* (Supplementary Fig. 11). As expected, the genome of cFA404-KiPS3F1 cells did not contain integrations of the c-MYC retrovirus, as revealed by Southern hybridization with probes specific for the reprogramming factors (Supplementary Fig. 12) and PCR of genomic DNA (data not shown). These results demonstrate that 'safer' patient-specific iPS cells can be generated with just three factors, although at efficiencies that may not be compatible with practical application. Moreover and ideally, permanent modification of the genome of iPS cells should be avoided, and integrating retroviruses omitted altogether. The recent implementation of reprogramming protocols that do not rely on viral integration^{39–42}, if their applicability to human cells was confirmed, would bring the realization of this possibility closer.

The use of patient-specific iPS cells to generate disease-corrected cells could potentially overcome the risks of insertional oncogenesis⁴³ that currently limit gene therapy strategies, because genetically corrected iPS cells lend themselves to the screening of safe integration sites of the therapeutic transgenes. In addition, homologous recombination⁴⁴ could be used to correct genetic defects of patient-specific iPS cells. Our studies also unveil a critical role of the FA pathway in the self-renewal of pluripotent stem cells, which we postulate provided strong selection advantage to iPS cells that had not completely silenced the therapeutic transgene. The ability of human pluripotent stem cells to silence viral transgenes should be carefully taken into account when devising future iPS-cell-based gene therapy strategies

for conditions in which genetic correction does not confer selection advantage.

METHODS SUMMARY

Somatic cells of FA patients were obtained after approval by the competent authorities. Patients FA5, FA90 and FA153 have been previously described⁴⁵; patients FA430 and FA431 correspond to patients 2 and 10, respectively, in ref. 28. Patient FA404 was newly recruited for the study and typed by standard methods⁴⁵. Somatic cells were reprogrammed with retroviruses encoding Flag-tagged OCT4, SOX2 and KLF4, with or without c-MYC(T58A). The gene therapy lentiviral vectors used to correct FA somatic cells have been previously described²⁶ and were prepared essentially as reported⁴⁶. Characterization of iPS cells was performed essentially as described^{27,30}. The functionality of the FA pathway was assessed by subnuclear accumulation of stalled replication forks induced by local ultraviolet-C (UVC) irradiation essentially as described³³. Haematopoietic differentiation of iPS cells was done by co-culturing embryoid bodies with OP9 stromal cells³⁴ in the presence of BMP4, VEGF, Kit ligand, FGF2, TPO and Flt ligand. For knocking down *FANCA* expression, we used transient transfection of *FANCA* siRNA (ref. 47) as reported⁴⁸, with luciferase siRNA as a control, or lentiviral delivery of five different *FANCA* shRNAs (Sigma, MISSION shRNA NM_000135), with scramble shRNA as a control.

Full Methods and any associated references are available in the online version of the paper at www.nature.com/nature.

Received 20 January; accepted 14 May 2009.

Published online 31 May 2009.

1. Takahashi, K. & Yamanaka, S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* **126**, 663–676 (2006).
2. Takahashi, K. *et al.* Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* **131**, 861–872 (2007).
3. Yu, J. *et al.* Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* **318**, 1917–1920 (2007).
4. Park, I. H. *et al.* Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors. *Nature* **451**, 141–146 (2008).
5. Lowry, W. E. *et al.* Generation of human induced pluripotent stem cells from dermal fibroblasts. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **105**, 2883–2888 (2008).
6. Park, I. H. *et al.* Disease-specific induced pluripotent stem cells. *Cell* **134**, 877–886 (2008).
7. Dimos, J. T. *et al.* Induced pluripotent stem cells generated from patients with ALS can be differentiated into motor neurons. *Science* **321**, 1218–1221 (2008).
8. Ebert, A. D. *et al.* Induced pluripotent stem cells from a spinal muscular atrophy patient. *Nature* **457**, 277–280 (2009).
9. Soldner, F. *et al.* Parkinson's disease patient-derived induced pluripotent stem cells free of viral reprogramming factors. *Cell* **136**, 964–977 (2009).
10. Tischkowitz, M. D. & Hodgson, S. V. Fanconi anaemia. *J. Med. Genet.* **40**, 1–10 (2003).
11. Wang, W. Emergence of a DNA-damage response network consisting of Fanconi anaemia and BRCA proteins. *Nature Rev. Genet.* **8**, 735–748 (2007).
12. Auerbach, A. D. & Wolman, S. R. Susceptibility of Fanconi's anaemia fibroblasts to chromosome damage by carcinogens. *Nature* **261**, 494–496 (1976).
13. Kutler, D. I. *et al.* A 20-year perspective on the International Fanconi Anemia Registry (IFAR). *Blood* **101**, 1249–1256 (2003).
14. Guardiola, P. *et al.* Outcome of 69 allogeneic stem cell transplantations for Fanconi anemia using HLA-matched unrelated donors: a study on behalf of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. *Blood* **95**, 422–429 (2000).
15. Wagner, J. E. *et al.* Unrelated donor bone marrow transplantation for the treatment of Fanconi anemia. *Blood* **109**, 2256–2262 (2007).
16. Waisfisz, Q. *et al.* Spontaneous functional correction of homozygous fanconi anaemia alleles reveals novel mechanistic basis for reverse mosaicism. *Nature Genet.* **22**, 379–383 (1999).
17. Gregory, J. J. Jr *et al.* Somatic mosaicism in Fanconi anemia: evidence of genotypic reversion in lymphohematopoietic stem cells. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **98**, 2532–2537 (2001).
18. Gross, M. *et al.* Reverse mosaicism in Fanconi anemia: natural gene therapy via molecular self-correction. *Cytogenet. Genome Res.* **98**, 126–135 (2002).
19. Rio, P. *et al.* *In vivo* proliferation advantage of genetically corrected hematopoietic stem cells in a mouse model of Fanconi anemia FA-D1. *Blood* **112**, 4853–4861 (2008).
20. Liu, J. M. *et al.* Engraftment of hematopoietic progenitor cells transduced with the Fanconi anemia group C gene (FANCC). *Hum. Gene Ther.* **10**, 2337–2346 (1999).
21. Kelly, P. F. *et al.* Stem cell collection and gene transfer in Fanconi anemia. *Mol. Ther.* **15**, 211–219 (2007).
22. Larghero, J. *et al.* Hematopoietic progenitor cell harvest and functionality in Fanconi anemia patients. *Blood* **100**, 3051 (2002).

23. Jacome, A. *et al.* Lentiviral-mediated genetic correction of hematopoietic and mesenchymal progenitor cells from Fanconi anemia patients. *Mol. Ther.* (in the press).
24. Ying, Q. L. *et al.* The ground state of embryonic stem cell self-renewal. *Nature* **453**, 519–523 (2008).
25. Taniguchi, T. & D'Andrea, A. D. Molecular pathogenesis of Fanconi anemia: recent progress. *Blood* **107**, 4223–4233 (2006).
26. Almarza, E. *et al.* Characteristics of lentiviral vectors harboring the proximal promoter of the *vav* proto-oncogene: a weak and efficient promoter for gene therapy. *Mol. Ther.* **15**, 1487–1494 (2007).
27. Aasen, T. *et al.* Efficient and rapid generation of induced pluripotent stem cells from human keratinocytes. *Nature Biotechnol.* **26**, 1276–1284 (2008).
28. Kalb, R. *et al.* Hypomorphic mutations in the gene encoding a key Fanconi anemia protein, FANCD2, sustain a significant group of FA-D2 patients with severe phenotype. *Am. J. Hum. Genet.* **80**, 895–910 (2007).
29. Brivanlou, A. H. *et al.* Stem cells. Setting standards for human embryonic stem cells. *Science* **300**, 913–916 (2003).
30. Raya, A. *et al.* Generation of cardiomyocytes from new human embryonic stem cell lines derived from poor-quality blastocysts. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* (in the press).
31. Pfeifer, A., Ikawa, M., Dayn, Y. & Verma, I. M. Transgenesis by lentiviral vectors: lack of gene silencing in mammalian embryonic stem cells and preimplantation embryos. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **99**, 2140–2145 (2002).
32. Xia, X., Zhang, Y., Zieth, C. R. & Zhang, S. C. Transgenes delivered by lentiviral vector are suppressed in human embryonic stem cells in a promoter-dependent manner. *Stem Cells Dev.* **16**, 167–176 (2007).
33. Bogliolo, M. *et al.* Histone H2AX and Fanconi anemia FANCD2 function in the same pathway to maintain chromosome stability. *EMBO J.* **26**, 1340–1351 (2007).
34. Nakano, T., Kodama, H. & Honjo, T. Generation of lymphohematopoietic cells from embryonic stem cells in culture. *Science* **265**, 1098–1101 (1994).
35. Vodyanik, M. A., Bork, J. A., Thomson, J. A. & Slukvin, I. I. Human embryonic stem cell-derived CD34⁺ cells: efficient production in the coculture with OP9 stromal cells and analysis of lymphohematopoietic potential. *Blood* **105**, 617–626 (2005).
36. Ji, J., Vijayaragavan, K., Bosse, M., Weisel, K. & Bhatia, M. OP9 stroma augments survival of hematopoietic precursors and progenitors during hematopoietic differentiation from human embryonic stem cells. *Stem Cells* **26**, 2485–2495 (2008).
37. Okita, K., Ichisaka, T. & Yamanaka, S. Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature* **448**, 313–317 (2007).
38. Nakagawa, M. *et al.* Generation of induced pluripotent stem cells without *Myc* from mouse and human fibroblasts. *Nature Biotechnol.* **26**, 101–106 (2008).
39. Okita, K., Nakagawa, M., Hyenjong, H., Ichisaka, T. & Yamanaka, S. Generation of mouse induced pluripotent stem cells without viral vectors. *Science* **322**, 949–953 (2008).
40. Stadtfeld, M., Nagaya, M., Utikal, J., Weir, G. & Hochedlinger, K. Induced pluripotent stem cells generated without viral integration. *Science* **322**, 945–949 (2008).
41. Zhou, H. *et al.* Generation of induced pluripotent stem cells using recombinant proteins. *Cell Stem Cell* **4**, 381–384 (2009).
42. Gonzalez, F. *et al.* Generation of mouse-induced pluripotent stem cells by transient expression of a single nonviral polycistronic vector. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* doi:10.1073/pnas.0901471106 (2009).
43. Hacein-Bey-Abina, S. *et al.* Insertional oncogenesis in 4 patients after retrovirus-mediated gene therapy of SCID-X1. *J. Clin. Invest.* **118**, 3132–3142 (2008).
44. Zwaka, T. P. & Thomson, J. A. Homologous recombination in human embryonic stem cells. *Nature Biotechnol.* **21**, 319–321 (2003).
45. Casado, J. A. *et al.* A comprehensive strategy for the subtyping of patients with Fanconi anaemia: conclusions from the Spanish Fanconi Anemia Research Network. *J. Med. Genet.* **44**, 241–249 (2007).
46. Gonzalez-Murillo, A., Lozano, M. L., Montini, E., Bueren, J. A. & Guenechea, G. Unaltered repopulation properties of mouse hematopoietic stem cells transduced with lentiviral vectors. *Blood* **112**, 3138–3147 (2008).
47. Bruun, D. *et al.* siRNA depletion of BRCA1, but not BRCA2, causes increased genome instability in Fanconi anemia cells. *DNA Repair (Amst.)* **2**, 1007–1013 (2003).
48. Nijman, S. M. *et al.* The deubiquitinating enzyme USP1 regulates the Fanconi anemia pathway. *Mol. Cell* **17**, 331–339 (2005).

Supplementary Information is linked to the online version of the paper at www.nature.com/nature.

Acknowledgements The authors are indebted to FA patients and their families for their cooperation. We are grateful to I. Badell, J. Couselo, A. Almeida and D. Schindler for collaboration in providing samples from FA patients, J.A. Casado for subtyping studies, M. Edel, J. Bilic, V. Pekarik and members of the laboratory for comments on the manuscript, J. M. Andrés-Vaquero for assistance with flow cytometry, R. Pujol for assistance with cytogenetics, M. J. Ramirez for immunofluorescence studies, B. Arán, M. Carrió and Y. Muñoz for assistance with cell culture techniques, E. Melo, L. Mulero and M. Martí for bioimaging assistance, and Y. Richaud, T. Lopez Rovira and M. L. Lozano for technical assistance. I.R.-P. and E.S. were recipients of pre-doctoral fellowships from MEC and DIUE, respectively. M.J.B. and G.T. were partially supported by the Ramón y Cajal program, and J.S. by the ICREA-Academia program. This work was partially supported by the Ministerio de Educación y Ciencia grants BFU2006-12251, SAF2005-00058, SAF2006-3440, and Genoma España (FANCOGENE), European Commission 'Marie-Curie Reintegration Grant' MIRG-CT-2007-046523 and European Program CONSERT LSHB-CT-2004-5242, the Fondo de Investigaciones Sanitarias (RETIC-RD06/0010/0016, PI061897, PI061099), Marató de TV3 (063430), the G. Harold and Leila Y. Mathers Charitable Foundation, Fundación Marcelino Botín, and Fundación Cellex.

Author Information Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints. Correspondence and requests for materials should be addressed to J.C.I.B. (belmonte@salk.edu or izpisua@cmbm.eu).

METHODS

Patients. Studies were approved by the authors' Institutional Review Board and conducted under the Declaration of Helsinki. Patients were encoded to protect their confidentiality, and written informed consent obtained. The generation of human iPS cells was done following a protocol approved by the Spanish competent authorities (Commission on Guarantees concerning the Donation and Use of Human Tissues and Cells of the Carlos III Health Institute). FA patients were diagnosed on the basis of clinical symptoms and chromosome breakage tests of peripheral blood cells using a DNA crosslinker drug. Patients FA5, FA90 and FA153 have been previously described¹⁴; patients FA430 and FA431 correspond to patients 2 and 10, respectively, in ref. 28. Patient FA404 was subtyped by analysing the G2-phase arrest of dermal fibroblasts transduced with enhanced GFP (EGFP) and FANCA retroviral vectors and then exposed to mitomycin C, as previously described¹⁴.

Cell lines. 293T and HT1080 cells (ATCC CRL-12103) were used for the production and titration of lentiviruses, respectively. These cell lines were grown in Dulbecco's modified medium (DMEM, Invitrogen) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS; Biowhitaker). The ES[2] and ES[4] lines of human ES cells were maintained as originally described³⁰. The control iPS cell lines KiPS4F1 and KiPS3F1 and the partially silenced KiPS4F3 cell line were cultured as reported²⁷.

Generation of iPS cells. Fibroblasts were cultured in DMEM supplemented with 10% FBS (all from Invitrogen) at 37 °C, 5% CO₂, 5% O₂ and used between 2 and 6 passages. For reprogramming experiments, about 50,000 fibroblasts were seeded per well of a 6-well plate and infected with a 1:1:1:1 mix of retroviral supernatants of Flag-tagged OCT4, SOX2, KLF4 and c-MYC(T58A) (ref. 27) in the presence of 1 µg ml⁻¹ polybrene. Infection consisted of a 45-min spinfection at 750g after which supernatants were left in contact with the cells for 24 h at 37 °C, 5% CO₂. One or two rounds of three infections on consecutive days were performed at the times indicated in Supplementary Information. Five days after beginning the last round of infection, fibroblasts were trypsinized and seeded onto feeder layers of irradiated human foreskin fibroblasts in the same culture medium. After 24 h, the medium was changed to human ES cell medium, consisting of KO-DMEM (Invitrogen) supplemented with 10% KO-Serum Replacement (Invitrogen), 0.5% human albumin (Grifols), 2 mM Glutamax (Invitrogen), 50 µM 2-mercaptoethanol (Invitrogen), non-essential aminoacids (Cambrex) and 10 ng ml⁻¹ bFGF (PeproTech). Cultures were maintained at 37 °C, 5% CO₂, with media changes every other day. Starting 1 week after plating onto feeders, medium was supplemented with 1 µM PD0325901 and 1 µM CT99021 (both from Stem Cell Sciences) for 1 week. Colonies were picked based on morphology 45–60 days after the initial infection and plated onto fresh feeders. Lines of patient-specific iPS cells were maintained by mechanical dissociation of colonies and splitting 1:3 onto feeder cells in human ES cell medium or by limited trypsin digestion and passaging onto Matrigel-coated plates with human ES cell medium pre-conditioned by mouse embryonic fibroblasts. Other inhibitors were used as indicated in Supplementary Information at the following concentrations: 10 µM U0126 (Calbiochem), 25 µM PD098059 (Calbiochem), 5 µM BIO (Sigma), 10 µM Y27632 (Calbiochem). Generation of patient-specific KiPS cells was essentially as previously reported²⁷, except that primary epidermal keratinocytes were derived from small biopsy explants in the presence of irradiated fibroblasts in DMEM/Hams-F12 (3:1) supplemented with 10% FBS, 1 µg ml⁻¹ EGF (BioNova), 0.4 µg ml⁻¹ hydrocortisone, 5 µg ml⁻¹ transferrin, 5 µg ml⁻¹ insulin, 2 × 10⁻¹¹ M liothyronine (all from Sigma) and 10⁻¹⁰ M cholera toxin (Quimigen).

Quantitative RT-PCR, transgene integration and promoter methylation analyses. Expression of retroviral transgenes and endogenous pluripotency-associated transcription factors, integration of retroviral transgenes by genomic PCR or Southern blot, and methylation status of *OCT4* and *NANOG* promoters were assessed as previously reported²⁷.

HLA typing and DNA fingerprinting. Molecular typing of cell lines was performed by Banc de Sang i Teixits (Barcelona, Spain). HLA typing human ES cell lines used sequence-based typification with the AlleleSEQR HLA Sequencing Kit (Atria Genetics). Microsatellite DNA fingerprinting was performed using multiplex polymerase chain reaction of nine microsatellites and short tandem repeats plus amelogenin gene using AmpliFISTR Profiler Plus Kit (Applied Biosystems).

Analysis of proviral copy number and transgene expression. Quantification of proviral copy number per cell was analysed by qPCR in a Rotor Gene RG-3000 (Corbett Research Products) using primers against FANCA transgene: FANCA-F, 5'-GCTCAAGGGTCAGGGCAAC-3', and FANCA-R, 5'-TGTGAGAA GCTCTTTTCGGG-3', and detected with the Taqman probe FANCA-P, 5'-FAM-CGTCTTTTCTGCTGCAGTTAATACCTCGGT-BHQ1-3'. To quantify the number of cells, β-actin primers were used: DNA-RNA-β-actin-F,

5'-ATTGGCAATGAGCGGTTCC-3', and DNA-β-actin-R, 5'-ACAGTCTCCAC TCACCCAGGA-3', and detected with the probe DNA-RNA-β-actin-P, 5'-Texas Red-CCCTGAGGCACTTCCAGCCTTCC-BHQ1-3'. To measure the average proviral DNA per transduced cell a standard curve of lentiviral vector (*FANCA-IRES-EGFP*) and β-actin DNA amplification was made. Next, the average proviral number per cell was estimated by interpolation of the FANCA-to-β-actin ratio from each DNA sample in the standard curve. The expression of the FANCA transgene was analysed by real-time quantitative RT-PCR on complementary DNA obtained from total RNA. Samples from a healthy donor and a FA patient were used as controls. To distinguish between endogenous expression of FANCA and the expression due to the transgene, total FANCA expression was analysed using FANCA primers and probe and the endogenous expression was analysed using 3' FANCA-F, 5'-TCTTCTGACGGGACTGCC-3', and 3' FANCA-R, 5'-AAGAGCTCCATGTTATGCTTGTAATAAAT-3', and detected with the Taqman probe, 3' FANCA-P, 5'-FAM-CACACCAGCCAGCTCCCGTGTA-BHQ1-3'. For housekeeping control expression β-actin was analysed using DNA-RNA-β-actin-F primer, RNA-β-actin-R primer, 5'-CACAGGACTCCA TGCCCA-3', and Taqman probe DNA-RNA-β-actin-P. Differences between the expression obtained with the FANCA and that obtained using the 3' FANCA indicate the expression of the integrated provirus.

Western blot. Cell extracts were prepared using standard RIPA buffer. The total protein concentration in the supernatant was then measured using the Bio-Rad protein assay (Biorad) according to the manufacturer's instructions. Forty micrograms of total proteins were then loaded on a 6% SDS-PAGE and subjected to standard western blot procedure followed by immunodetection with an anti-human FANCA antibody provided by the Fanconi Anemia Research Fund, Eugene, Portland, USA. Vinculin (Abcam, catalogue number ab18058; 1:5,000) was used as an internal loading control.

Functional studies of the FA pathway in iPS-derived cells. Subnuclear accumulation of stalled replication forks was induced by local UVC irradiation of cells growing on 22 × 22 mm coverslips through polycarbonate filters with pores of 5 µm diameter, essentially as described³³, and processed for immunofluorescence 6 h later. In parallel experiments, primary fibroblast and iPS-derived cells were exposed to hydroxyurea (2 mM) for 24 h and then fixed and processed for immunofluorescence as previously described³³.

For FANCD2 detection at UV-induced stalled replication forks, a primary rabbit antibody against FANCD2 (Abcam; 1:1,000) mixed with an anti-CPD antibody (Kamiya Biomed, MC-062; 1:500) were used. Cells were then incubated with the secondary antibodies anti-mouse Alexa Fluor 488 (Molecular Probes) and anti-rabbit Alexa Fluor 555 (Molecular Probes), and finally mounted in anti-fading medium containing DAPI (Sigma). In the hydroxyurea experiments, immunodetection was identical with the exception that the HCl washing step and a primary mouse antibody against anti-γH2AX (Upstate; 1:3,000) was used instead of an anti-CPD to visualize nuclei foci representing stalled and broken replication forks. Microscopic analysis and image capturing were performed in identical optical and exposure conditions for all cell types using a Zeiss Axio Observer A1 epifluorescence microscope equipped with a AxioCam MRc 5 camera and the AxioVision Rel. 4.6 software.

Immunofluorescence and alkaline phosphatase analyses. Patient-specific iPS cells were grown on plastic coverslide chambers and fixed with 4% paraformaldehyde (PFA). The following antibodies were used: TRA1-60 (MAB4360, 1:100), TRA1-81 (MAB4381, 1:100) and SOX2 (AB5603, 1:500) from Chemicon, SSEA4 (MC-813-70, 1:2) and SSEA3 (MC-631, 1:2) from the Developmental Studies Hybridoma Bank at the University of Iowa, Tuj1 (1:500; Covance), TH (1:1,000; Sigma), α-fetoprotein (1:400; Dako), α-actinin (1:100; Sigma), CT4 (C-10, SantaCruz, 1:100), NANOG (Everest Biotech; 1:100), GFAP (1:1,000; Dako), vimentin (1:500, Chemicon) and FOXA2 (1:100; R&D Biosystems). Secondary antibodies used were all the Alexa Fluor Series from Invitrogen (all 1:500). Images were taken using Leica SP5 confocal microscope. Direct alkaline phosphatase activity was analysed using an alkaline phosphatase blue/red membrane substrate solution kit (Sigma) according to the manufacturer's guidelines. For FANCD2 immunofluorescence assays, cells were grown in plastic coverslide chambers and treated with 30 nM mitomycin C. After 16 h, cells were fixed with 3.7% PFA in PBS for 15 min followed by permeabilization with 0.5% Triton X-100 in PBS for 5 min. After blocking for 30 min in blocking buffer (10% FBS, 0.1% NP-40 in PBS), cells were incubated with polyclonal rabbit anti-FANCD2 antibody (Novus Biologicals, NB 100-182, 1/250). Anti-rabbit Texas red-conjugated antibody (Jackson ImmunoResearch Laboratories) was used as secondary antibody (1:500). Slides were analysed with a fluorescence microscope Axioplan2 (Carl Zeiss) using a ×100/1.45 oil working distance 0.17 mm objective.

In vitro differentiation. Differentiation towards endoderm, cardiogenic mesoderm and neuroectoderm was carried out essentially as described³⁰. Differentiation towards fibroblast-like cells was accomplished by plating embryoid bodies onto

gelatin-coated plates in 90% DMEM, 10% FBS and repeated passaging of differentiated cells with fibroblast-like morphology. For haematopoietic differentiation, embryoid bodies were produced by scraping of confluent iPS wells and cultured in suspension in embryoid body medium (90% DMEM, 10% FBS) for 24–48 h. Embryoid bodies were then placed over a feeder layer of confluent OP9 stromal cells and allowed to attach. The medium used for the first 48 h of differentiation was 50% embryoid body medium and 50% haematopoietic differentiation medium. The haematopoietic differentiation medium was StemSpan serum-free medium (StemCell Technologies) supplemented with cytokines BMP4 (10 ng ml⁻¹), VEGF (10 ng ml⁻¹), SCF (25 ng ml⁻¹), FGF (10 ng ml⁻¹), TPO (20 ng ml⁻¹) and Flt ligand (10 ng ml⁻¹). After 48 h, cells were cultured with haematopoietic differentiation medium, with medium changes every 48 h until the end of the differentiation protocol, day 13 after embryoid body plating. At day 13, OP9 and embryoid bodies were collected by trypsinization (0.25% trypsin), washed and labelled with anti-CD34 bead-conjugated antibody (Miltenyi Biotec) according to manufacturer's specification. The CD34⁺ fraction was purified by MACS, and fraction purity was increased by a second round of MACS. Final purity of the collected cells for CD34 was checked on a fraction of the MACS eluate by flow cytometry. The remaining CD34⁺ cells were frozen in medium IMDM containing 10% DMSO and 20% FBS and stored in liquid nitrogen until further use. For the assessment of CFCs, samples were cultured in triplicates, in Methocult H4434 (Stem Cell Technologies) at 37 °C, in 5% CO₂, 5% O₂ and 95% humidified air. Colonies were scored after two weeks in culture. To analyse the mitomycin C resistance of the haematopoietic progenitors, CFC cultures were treated with 10 nM mitomycin C. In some experiments, iPS-derived CD34⁺ cells were cultured for 7 days in StemSpan serum-free medium (Stem Cell Technologies) supplemented with haematopoietic growth factors SCF (Amgen, 300 ng ml⁻¹), TPO (R&D Systems, 100 ng ml⁻¹) and Flt ligand (BioSource, 100 ng ml⁻¹).

Flow cytometry analyses. For surface phenotyping the following fluorochrome (phycoerythrin (PE) or allophycocyanin (APC))-labelled monoclonal antibodies were used (both from Becton Dickinson Biosciences): anti-CD34 PE (581/CD34) and anti-CD45 APC (HI30). Gating was done with matched isotype control monoclonal antibodies. Hoechst 33528 (H258) was included at 4 µg ml⁻¹ in the final wash to exclude dead cells. All analyses were performed on a MoFlo cell sorter (DakoCytomation) running Summit software. To analyse the phenotype of haematopoietic progenitors, CFU-GM colonies were picked and washed with PBS. Cells were stained with antihuman CD45-PECy5 monoclonal antibody (Clone J33, Immunotech) in combination with anti-human CD33-PE monoclonal antibody (D3HL60.251, Immunotech). Cells were then washed in PBA (phosphate-buffered salt solution with 0.1% BSA and 0.01% sodium azide), resuspended in PBA plus 2 µg ml⁻¹ propidium iodide, and analysed using an

EPICS ELITE-ESP cytometer (Coulter). Off-line analysis was done with CXP Analysis 2.1 flow-cytometry software (Beckman Coulter Inc.).

Teratoma formation. Severe combined immunodeficient beige mice (Charles River Laboratories) were used to test the teratoma induction capacity of patient-specific iPS cells essentially as described²⁷. All animal experiments were conducted following experimental protocols previously approved by the Institutional Ethics Committee on Experimental Animals, in full compliance with Spanish and European laws and regulations.

Genetic correction of FA cells with lentiviral vectors. Lentiviral (LV) vectors carrying the human *FANCA*-IRES-EGFP cassette under the control of the internal spleen-focus-forming virus (*SFFV*) U3 promoter (*FANCA*-LV; ref. 26) were used to transduce fibroblasts and keratinocytes from FA-A patients. Fibroblasts from FA-D2 patients were transduced with a lentivirus carrying the *FANCD2* cDNA under the control of the *vav* promoter (*FANCD2*-LV, ref. 26). Lentiviral vectors carrying either of these promoters were equally efficient to correct the phenotype of human FA cells²⁶. Vector stocks of VSV-G pseudotyped lentiviruses were prepared by four-plasmid calcium-phosphate-mediated transfection in 293T cells, essentially as described⁴⁵. Supernatants were recovered 24 h and 48 h after transfection and filtered through 0.45 µm. Functional titres of infective lentiviruses were determined in HT1080 cells, plated at 3.5 × 10⁴ cells per well in 24-well plates and infected overnight with different dilutions of either lentivirus-supernatant. Cells were washed and incubated with fresh medium, and the proportion of EGFP-positive cells was determined 5 days later by flow cytometry, or after 8 days by qPCR.

Knockdown of *FANCA*. Lentiviral vectors expressing scramble shRNA and five different *FANCA* shRNAs (Sigma, MISSION shRNA NM_000135) were used to generate viral particles according to the manufacturer's instructions. For infection, FA-patient-specific iPS cells were incubated with viral supernatants in 6-well plates for 24 h. Puromycin selection (2 µg ml⁻¹) was applied for 24 h 3 days after lentiviral infection and cells were allowed to recover for 3 days before splitting. Transient RNA interference experiments with siRNA were performed as previously described⁴⁷. In brief, cells were grown in OPTI-MEM medium (Gibco, catalogue number 31985) with 10% FCS without antibiotics and transfected with 10 nM *FANCA* siRNA (ref. 46) or luciferase siRNA as a control (5'-CGUACGCGGAUACUUCGA[dT][dT]-3'), with Lipofectamin RNAiMAX transfection reagent (Invitrogen, catalogue number 13778-075) twice over a period of 24 h. Twenty-four hours after the second transfection, cells were left untreated or were treated with DEB at 0.02 µg ml⁻¹ for 3 days and subsequently harvested for protein lysates or processed following standard cytogenetic methods. Mitotic indexes were calculated by counting the number of mitotic cells in 500–6,000 cells per point in duplicate.

Anexo 4:

**“Histone H2AX and Fanconi anemia FANCD2
function in the same pathway to maintain
chromosome stability”**

EMBO J. 2007 Mar 7;26(5):1340-51

Histone H2AX and Fanconi anemia FANCD2 function in the same pathway to maintain chromosome stability

Massimo Bogliolo^{1,4}, Alex Lyakhovich^{1,4}, Elsa Callén¹, Maria Castellà¹, Enrico Cappelli¹, María J Ramírez¹, Amadeu Creus¹, Ricard Marcos¹, Reinhard Kalb², Kornelia Neveling², Detlev Schindler² and Jordi Surrallés^{1,3,*}

¹Group of Mutagenesis, Department of Genetics and Microbiology, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Barcelona, Spain, ²Department of Human Genetics, University of Würzburg, Würzburg, Germany and ³Centre for Biomedical Research on Rare Diseases (CIBERER), Instituto de Salud Carlos III, Bellaterra, Barcelona, Spain

Fanconi anemia (FA) is a chromosome fragility syndrome characterized by bone marrow failure and cancer susceptibility. The central FA protein FANCD2 is known to relocate to chromatin upon DNA damage in a poorly understood process. Here, we have induced subnuclear accumulation of DNA damage to prove that histone H2AX is a novel component of the FA/BRCA pathway in response to stalled replication forks. Analyses of cells from H2AX knockout mice or expressing a nonphosphorylatable H2AX (H2AX^{S136A/S139A}) indicate that phosphorylated H2AX (γ H2AX) is required for recruiting FANCD2 to chromatin at stalled replication forks. FANCD2 binding to γ H2AX is BRCA1-dependent and cells deficient or depleted of H2AX show an FA-like phenotype, including an excess of chromatid-type chromosomal aberrations and hypersensitivity to MMC. This MMC hypersensitivity of H2AX-deficient cells is not further increased by depleting FANCD2, indicating that H2AX and FANCD2 function in the same pathway in response to DNA damage-induced replication blockage. Consequently, histone H2AX is functionally connected to the FA/BRCA pathway to resolve stalled replication forks and prevent chromosome instability.

The EMBO Journal (2007) 26, 1340–1351. doi:10.1038/sj.emboj.7601574; Published online 15 February 2007

Subject Categories: genome stability & dynamics

Keywords: BRCA; Fanconi anemia; genome stability; histone H2AX; stalled replication forks

Introduction

Fanconi anemia (FA) is a genetic syndrome characterized by chromosome fragility, congenital malformations, progressive

*Corresponding author. Department of Genetics and Microbiology, Universitat Autònoma de Barcelona, Campus de Bellaterra, Bellaterra, Barcelona 08193, Spain. Tel.: + 34 93 581 18 30; Fax: + 34 93 581 23 87; E-mail: jordi.surralles@uab.es

⁴These authors contributed equally to this work

Received: 8 June 2006; accepted: 3 January 2007; published online: 15 February 2007

pancytopenia and cancer susceptibility (Kutler *et al*, 2003). FA is a rare disease with a carrier frequency of 1/65 to 1/300 (Callén *et al*, 2005). There are at least 12 FA complementation groups (A, B, C, D1, D2, E, F, G, I, J, L and M), each connected with a distinct gene. All these genes, but *FANCI*, have been cloned (reviewed in Thompson, 2005). The FA proteins FANC-A, B, C, E, F, G, L and M assemble in a nuclear complex (FA complex), which is required for FANCD2 activation via monoubiquitination at the residue K561 during S phase and in response to DNA damage (García-Higuera *et al*, 2001; Taniguchi *et al*, 2002a). FANCL has been suggested to provide the monoubiquitin E3 ligase function for FANCD2 (Meetei *et al*, 2003a), although no direct evidence has been provided to date. The recently cloned FANCI/BRIP1 and FANCM/Hef both have a helicase domain, but the molecular biology of the whole FA/BRCA pathway is far from being understood (reviewed in Thompson, 2005).

The *FANCD2* gene is a key player in the FA pathway (reviewed in Bogliolo and Surrallés, 2005). Together with *FANCL* and *FANCM/Hef*, it is the only FA gene present in non-vertebrates and its functionally important features are highly conserved (Castillo *et al*, 2003). The FA complex is assembled in the absence of FANCD2 indicating that FANCD2 is downstream to this complex in the FA pathway (García-Higuera *et al*, 2001) but upstream to other components, resulting in a central position. Active FANCD2 colocalizes or interacts with the breast cancer susceptibility and the double-strand break (DSB) repair proteins BRCA1, Rad51 and BRCA2/FANCD1 in DNA damage-induced nuclear foci or during S phase (García-Higuera *et al*, 2001; Taniguchi *et al*, 2002a; Hussain *et al*, 2004; Wang *et al*, 2004).

Both BRCA1 and BRCA2/FANCD1 interact with the recombination protein Rad51 and are involved in DSB repair by homologous recombination (HR) (Patel *et al*, 1998; Venkitaraman, 2002). It has also been proposed that FA proteins mediate translesion DNA synthesis and, therefore, promote replication block bypass (Niedzwiedz *et al*, 2004; reviewed in Thompson, 2005). Repair by HR predominates during S/G2 phase of the cell cycle when sister chromatids are present. The fact that FANCD2 forms 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; Nakanishi *et al*, 2005). Indeed, a number of recent publications indicate that FANCD2 participates in the resolution of DNA interstrand crosslinks (ICL)-induced stalled replication forks (Andreassen *et al*, 2004; Hussain *et al*, 2004; Pichierri *et al*, 2004; Rothfuss and Grompe 2004; Wang *et al*, 2004) possibly by ensuring correct replication fork repair by HR (reviewed by Pichierri and Rosselli, 2004a; Macé *et al*, 2005).

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, not ATM (Pichierri and Rosselli, 2004b). Once activated, ATR

phosphorylates FANCD2, probably allowing subsequent monoubiquitination of FANCD2 (Andreassen *et al.*, 2004; Pichierri and Rosselli, 2004b; Ho *et al.*, 2006). Interestingly, ATR-mediated FANCD2 phosphorylation in response to ICLs depends on both an intact FA complex and nibrin, the product of the *NBS1* gene, mutated in Nijmegen breakage syndrome patients (Pichierri and Rosselli, 2004b). *NBS1* also interacts with FANCD2 after DNA damage (Nakanishi *et al.*, 2002). In turn, RAD50-MRE11-NBS1 (RMN) foci formation after ICLs requires the FA complex (Pichierri *et al.*, 2002). Consistent with a crosstalk between ATR, *NBS1* and the FA/BRCA pathways, not only FA cells but also NBS and Seckel syndrome cells with leaky splicing mutations leading to low levels of ATR are hypersensitive to MMC (Nakanishi *et al.*, 2002; O'Driscoll *et al.*, 2003) and NBS; Seckel syndrome and FA patients share some clinical features (Andreassen *et al.*, 2004). In addition, FA proteins crosstalk with other proteins involved in maintaining chromosome stability such as ATM and BLM (Taniguchi *et al.*, 2002b; Meetei *et al.*, 2003b; Pichierri *et al.*, 2004), building an integrated network of genome stability pathways (Surrallés *et al.*, 2004; Venkitaraman, 2004).

Exposure to ultraviolet radiation C (UVC) results in replication arrest as most of the DNA polymerases are unable to replicate templates containing UV-induced DNA lesions (Ward and Chen, 2001). Consistently, FANCD2 becomes monoubiquitinated and forms foci in response to not only MMC and X-rays, but also UVC (García-Higuera *et al.*, 2001; Pichierri *et al.*, 2004). ATR inactivation leads to the inhibition of histone H2AX phosphorylation and phosphorylated H2AX (γ H2AX) foci formation upon treatment with UVC or hydroxyurea (HU), indicating that H2AX is phosphorylated by ATR in response to replication blockage (Ward and Chen, 2001). Conversely, ATM is not required for H2AX phosphorylation following UVC or HU replication block (Ward and Chen, 2001). Many components of the DNA damage response including BRCA1, the MRN complex, 53BP1, MDC1 and Rad51 form foci that colocalize with γ H2AX foci (Fernández-Capetillo *et al.*, 2004). As FANCD2 relocates to the chromatin fraction upon DNA damage in a poorly understood process (Montes de Oca *et al.*, 2005), here we have locally irradiated cells of different genetic backgrounds with UVC to induce subnuclear accumulation of stalled replication forks and hence study the dynamics and regulation of FANCD2 relocation to damaged sites. These studies led us to uncover that histone H2AX is involved in the FA/BRCA pathway.

Results

FANCD2 dynamically relocates to UVC-induced stalled replication forks: a functional assay for the FA/BRCA pathway

In the first series of experiments, wild-type MRC5 fibroblasts were locally irradiated with 20, 40 or 60 J/m² of UVC radiation through a filter with 5- μ m-diameter pores and the locally irradiated nuclear areas were visualized by immunofluorescence with antibodies against cyclobutane pyrimidine dimers (CPD). At the pore size and density used, over 70% of the nuclei initially presented a UV spot. FANCD2 presented a diffuse or speckle nuclear pattern in the majority of non-irradiated cells or in cells immediately after irradiation but

relocated to the site of UVC-induced damage only few hours after irradiation (Figure 1A). FANCD2 relocation followed a specific and consistent dynamics: 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 6–8 h after irradiation, when 70–80% of UV spots presented FANCD2 signal (Figure 1B; wild-type cells). FANCD2 signal was present at the site of irradiation as long as the CPD were detectable, up to 48 h after irradiation in few cells (data not shown). Six hours 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 the cells without UV-spots. These results indicate that FANCD2 relocation correlates with the presence of CPD.

It is known that UVC induces stalled replication forks (see Introduction). Consistent with this notion, the pattern of UVC-induced FANCD2 relocation correlates with the pattern of PCNA colocalization (Figure 1C), reflecting that FANCD2 and PCNA colocalize during DNA replication stress response (Howlett *et al.*, 2005). In addition, FANCD2 relocated to the UV spot in exponentially growing primary human fibroblasts but not in the same cells synchronized in the G0/G1 phase of the cell cycle (>95% of the cells in G0/G1 phase) by serum starving (Figure 1D) or other methods (data not shown). Finally, when cells were grown in the presence of BrdU, 80 out of 80 cells with FANCD2 signal at the site of damage were positive for BrdU incorporation as detected with antibodies against BrdU (Figure 1E). Our unpublished confocal microscopy studies with cells expressing YFP-FANCD2 are also consistent with FANCD2 relocating to UV locally induced stalled forks during S phase (data not shown).

To determine whether this assay was a functional assay to study the FA/BRCA pathway, we analyzed the dynamics of FANCD2 relocation to the site of UVC-induced damage in cells deficient in well-known players of the FA/BRCA pathway (FANCA, BRCA1, ATR or ATM) and in FANCD2-deficient cells stably transduced with a non-ubiquitinable K561R-FANCD2 cDNA. As shown in Figure 1B, FANCD2 does not relocate in cells deficient in BRCA1, FANCA, ATR or expressing a non-monoubiquitinable K561R-FANCD2 but it normally relocates to the UV spots in wild-type cells (green), in FANCA-deficient cells functionally corrected by retrovirus-mediated FANCA cDNA transduction (blue), in ATM-deficient cells (orange), in BRCA2-deficient cells and in BRCA1-deficient cells functionally corrected by microcell-mediated chromosome transfer (data not shown). Thus, all known components required for FANCD2 monoubiquitination (the upstream FA proteins, ATR and FANCD2 K561) or FANCD2 foci formation (BRCA1) in response to DNA ICLs are also required for FANCD2 relocation to UVC-induced stalled replication forks. Therefore, all the data obtained by local irradiation and presented in Figure 1 are in keeping with all known functional requirements of the FA pathway and therefore validate our approach as a novel *in vivo* functional assay for dissecting the FA/BRCA pathway.

γ H2AX is required for FANCD2 relocation to damaged sites but not for FANCD2 activation

As mentioned in Introduction, histone H2AX is phosphorylated by ATR but not by ATM on its S139 residue in response

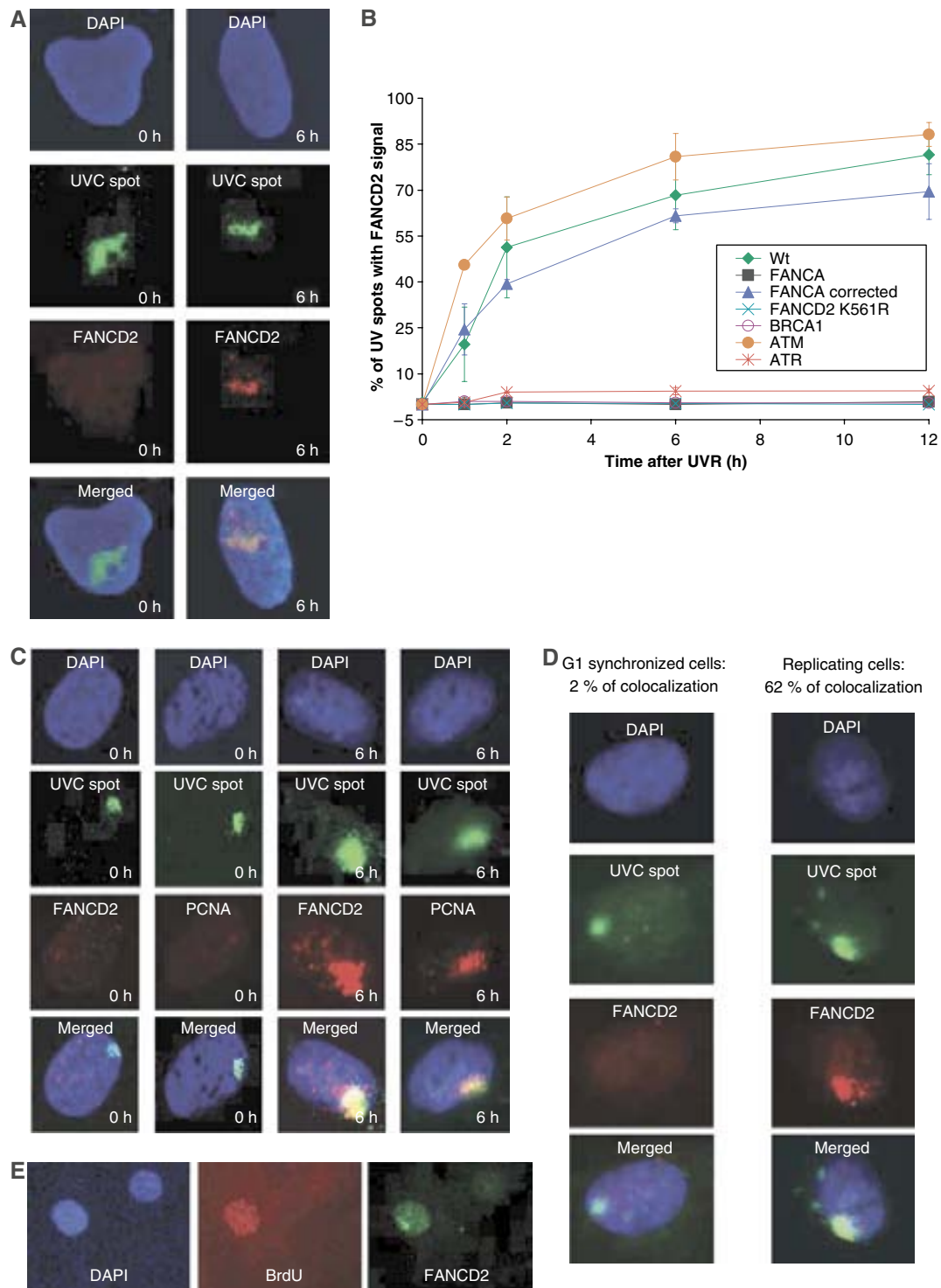


Figure 1 FANCD2 relocates to the sites of UVC radiation-induced stalled replication forks in S phase: a functional assay for the FA/BRCA pathway. Cells (human wild-type MRC5 fibroblasts) irradiated through a 5- μ m-pore filter with UVC (20 J/m²) present FANCD2 signal (detected with anti-FANCD2 antibodies in red) at the site of damage (detected with anti-CPD antibodies in green) 6 h after irradiation but not immediately after irradiation (A). FANCD2 relocates to UV spots following a specific dynamics and in a manner dependent on ATR, FANCA, BRCA1 and FANCD2 K561 but independent of ATM (means and s.d. of three experiments are shown in the graph) (B). PCNA and FANCD2 (red) relocate to the site of irradiation (green) following the same dynamics (C). FANCD2 (red) relocates to the irradiated site (green) only in replicating but not in G1 synchronized (>95% of the cells in G1 phase) wild-type primary fibroblasts (D); FANCD2 relocates to UV spots (right green panel) only in S-phase cells, as shown by BrdU incorporation (red middle panel). Nuclear counterstaining in DAPI (left blue panel) (E).

to UVC-induced stalled replication forks (Shiloh, 2001; Ward and Chen, 2001) and γ H2AX is required for the accumulation of several DNA repair/damage response factors to the site of DNA damage (Fernández-Capetillo *et al*, 2004).

Consequently, we applied our newly developed functional assay of local UVC-irradiation to check whether H2AX is required for FANCD2 relocation to the site of UVC-induced stalled replication forks. As shown in Figure 2, FANCD2 does

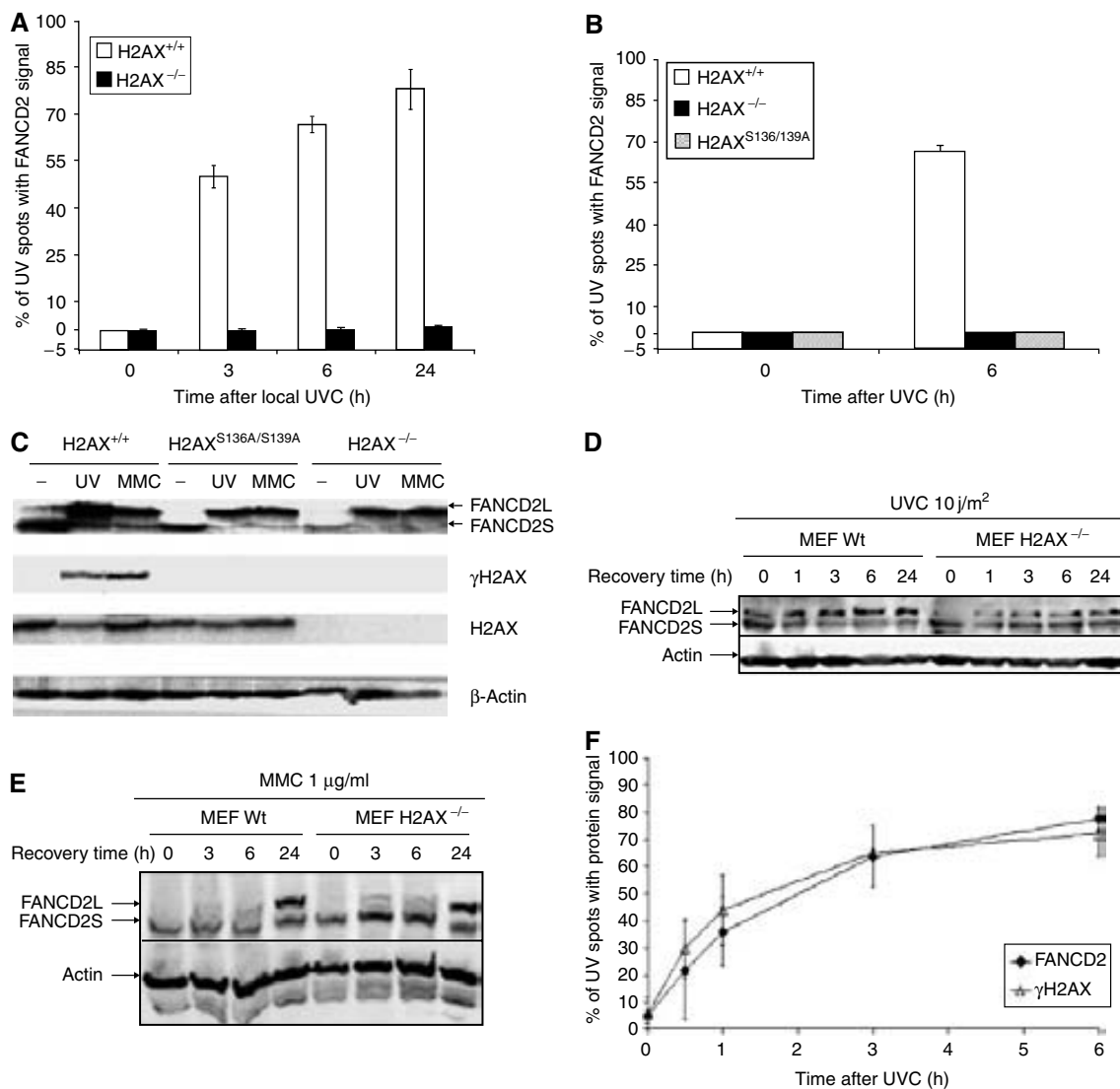


Figure 2 Relocation of FANCD2 to UVC-induced damage requires H2AX phosphorylation. FANCD2 does not relocate to locally induced stalled replication forks with UVC in H2AX^{-/-} MEFs (A) or in H2AX^{-/-} MEFs expressing a nonphosphorylatable H2AX (H2AX^{S136A/S139A}) (B). H2AX is not required for UVC- or MMC-induced FANCD2 monoubiquitination (C–E). H2AX-deficient MEF and their wild-type counterpart were treated with either UVC (10 J/m²; C, D) or with MMC (1 mg/ml; C, E). Cells were then harvested at the indicated recovery times and analyzed by Western blot for FANCD2 monoubiquitination. The equal loading of each slot was confirmed by probing the blot with anti-actin antibody (C–E). Local UVC irradiation results in concurrent H2AX phosphorylation and FANCD2 accumulation at the site of irradiation, with a dynamics of H2AX phosphorylation identical to the dynamics of FANCD2 relocation (F). (Means and s.d. of three experiments are shown in panels A, B and F.)

not relocate to the site of UVC-induced damage in H2AX^{-/-} mouse embryonic fibroblasts (MEFs) (Figure 2A) or H2AX^{-/-} MEFs expressing a nonphosphorylatable H2AX (H2AX^{S136A/S139A}) (Figure 2B). However, normal FANCD2 relocation was observed in genetically matched wild-type MEF, indicating a critical role for H2AX and H2AX phosphorylation in FANCD2 relocation to UVC-induced stalled replication forks.

H2AX and γH2AX are not required for FANCD2 activation, as FANCD2 is normally monoubiquitinated in response to UVC or MMC, both in H2AX^{-/-} and in nonfunctional H2AX^{S136A/S139A} MEF cells (Figure 2C). In addition, the kinetics of FANCD2 monoubiquitination upon UVC (Figure 2D) or MMC (Figure 2E) treatments are not compromised in H2AX-deficient cells. The reduced amount of monoubiquitinated FANCD2 (FANCD2L) in H2AX^{-/-} MEFs observable in Figure 2D is attributable to subtle differences in the proportion of cells in S phase between genetic back-

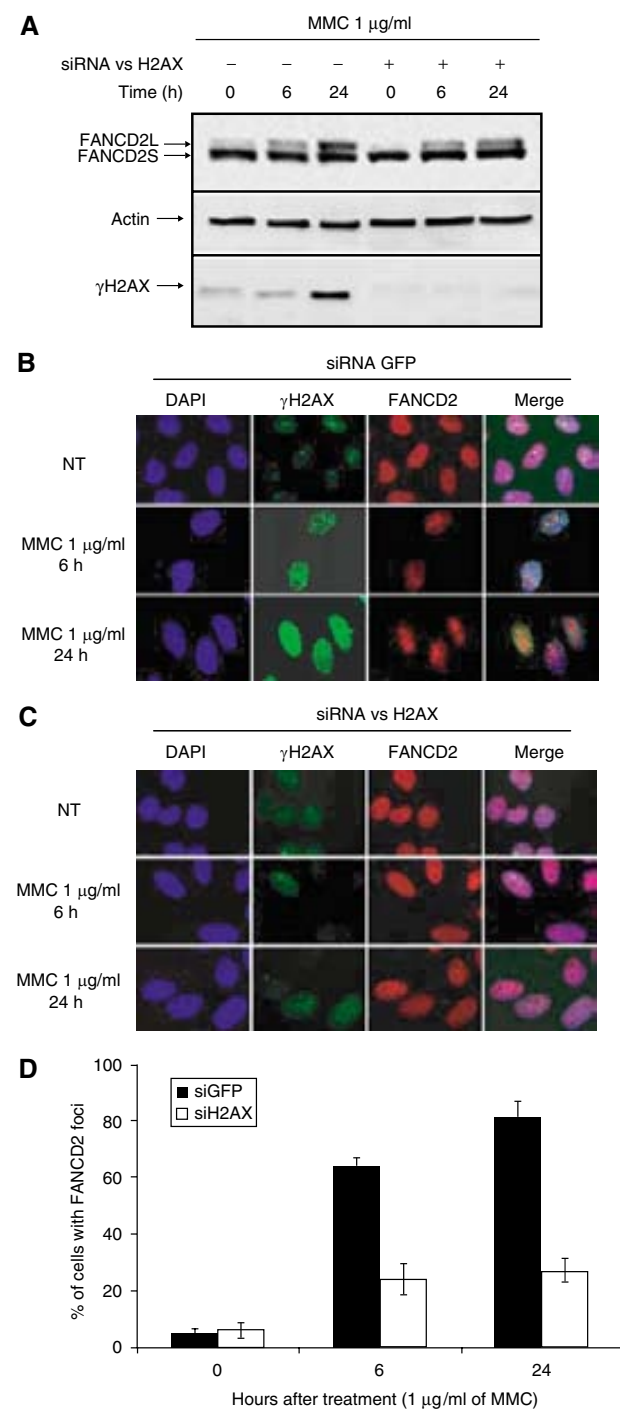
grounds (data not shown). These results indicate that H2AX phosphorylation is not involved in FANCD2 activation but rather in FANCD2 recruitment or accumulation to stalled replication forks.

We then compared 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 was identical to the dynamics of H2AX phosphorylation at the site of damage (Figure 2F), suggesting that FANCD2 relocates to the site of damage immediately after H2AX phosphorylation. As expected (Ward and Chen, 2001), H2AX phosphorylation at the site of UV irradiation was greatly reduced in Seckel syndrome cells expressing low levels of functional ATR (data not shown). 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 damaged site.

To confirm our observations with H2AX-deficient cells and local UVC irradiation, we studied FANCD2 foci formation upon MMC treatment in the presence or absence of H2AX by RNA interference (RNAi) (Figure 3). Our data indicate that depletion of H2AX by RNAi results in normal FANCD2 monoubiquitination (Figure 3A) but impaired FANCD2 foci formation (Figure 3B–D) in response to MMC.

As FANCD2 binds to chromatin upon DNA damage (Montes de Oca *et al.*, 2005), we studied relocation of FANCD2 to the chromatin fraction in HeLa cells (Figure 4A)



and in wild-type or H2AX^{S136A/S139A} MEFs (Figure 4B) to probe that normal MMC-induced binding of FANCD2 to chromatin requires a functional H2AX. FANCD2 was normally detected in the chromatin pellet in HeLa cells upon ICL (8-methoxypsoralen (8-MOP)) or UVC treatment (Figure 4A) and in wild-type MEF upon MMC treatment (Figure 4B). However, MMC-induced chromatin loading of FANCD2 was strongly impaired in H2AX^{S136A/S139A} MEFs, consistent with the notion that FANCD2 relocation to damaged chromatin requires a functional H2AX. However, we cannot disregard the possibility that this impairment, at least in part, is attributable to reduced overall levels of monoubiquitinated FANCD2 in H2AX-deficient cells.

FANCD2 interacts with γ H2AX upon DNA damage in a BRCA1-dependent manner

We then pursued the question of whether FANCD2 is recruited to the site of damage in a γ H2AX-dependent manner by performing immunoprecipitation (IP) experiments in H2AX^{+/+}, H2AX^{-/-} or H2AX^{S136A/S139A} MEF cell extracts as well as in BRCA1-deficient and genetically complemented cells. We were able to show that γ H2AX and FANCD2 co-immunoprecipitate (Figure 5A). Importantly, FANCD2- γ H2AX binding was significantly dependent on DNA damage (MMC or UVC) and was abolished in BRCA1-deficient cells (Figure 5B) and in H2AX^{-/-} and H2AX^{S136A/S139A} cells, suggesting that only phosphorylated form of H2AX is required, in concert with BRCA1, for recruitment of FANCD2 to damaged DNA. Consistently, we observed that MMC-induced chromatin loading of FANCD2L is also impaired in BRCA1-deficient cells (data not shown), again supporting the notion acquired in chicken cells that BRCA1 is dispensable for FANCD2 monoubiquitination but required for FANCD2 foci formation (Vandenberg *et al.*, 2003).

FANCD2- γ H2AX interaction was further studied by surface plasmon resonance (SPR) technique when comparing binding of recombinant human FANCD2 with γ H2AX (Figure 5C). We recognized the increase of FANCD2 binding upon *in vitro* H2AX phosphorylation. This binding was abolished by coinjection of γ H2AX with anti- γ H2AX antibodies. Some binding was also observed for H2AX protein alone that could be due to the partial (less than 10%) H2AX phosphorylation in the sample. Thus, all these experiments allow us to conclude that

Figure 3 H2AX depletion by RNAi disrupts FANCD2 foci formation ability after MMC treatment but does not impair FANCD2 monoubiquitination. HeLa cells were interfered with siRNA versus H2AX or versus GFP and treated with MMC for 0, 6 and 24 h. Western blot showing inhibition of H2AX phosphorylation after siRNA and normal FANCD2 monoubiquitination (A). FANCD2 foci in HeLa cells interfered with siRNA versus GFP (B). FANCD2 foci in HeLa cells interfered with siRNA versus H2AX (C). Graph showing percentage of inhibition of FANCD2 foci formation in GFP-interfered cells versus H2AX-depleted cells (D). Mean and s.d. of two independent experiments are reported. H2AX expression was knocked down by transfection with a SMARTpool[®] reagent (Dharmacon, USA) designed against H2AX. SiRNA was transfected using the Oligofectamine reagent (Invitrogen, USA) according to the manufacturer's indications. As a control, an siRNA duplex directed against GFP (Dharmacon, USA) was used. All the experiments were carried out 72 h after transfection when maximal inhibition was observed as analyzed by Western blot, (A). The equal loading of each slot was confirmed by probing the blot with anti-actin antibody.

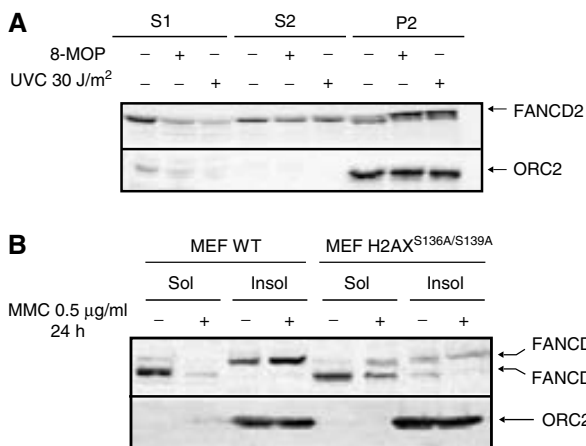


Figure 4 H2AX-dependent association of FANCD2 to chromatin after DNA damage. HeLa cells were left untreated or treated with 8-MOP + UVA or with 30 J/m² of UVC, let to recover for 6 h and then fractionated and analyzed by Western blot (A). S1 = cytoplasmic fraction, S2 = nucleoplasmic fraction, P2 = chromatin fraction. Wild type and H2AX^{-/-} MEFs were treated with 1 µg/ml MMC for 24 h and then fractionated and analyzed by Western blot (B). S1 and S2 fractions were pooled (Sol) and 50 µg of total protein of the Sol fraction and of the chromatin fraction (Insol) were analyzed by Western blot. ORC2 was used as a marker of the chromatin fraction (A, B).

in DNA-damaged cells, γ H2AX is involved in the recruitment of FANCD2 to chromatin at stalled replication forks.

H2AX^{-/-} cells are hypersensitive to MMC and both FANCD2 and H2AX cooperate in the same pathway in response to MMC

FA cells are phenotypically characterized by an increased sensitivity to the chromosome breaking ability of DNA cross-linkers 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 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 important for the proper functioning of the FA/BRCA pathway. Consistent with this notion, H2AX^{-/-} MEFs treated with MMC have an excess of chromatid-type aberrations, including radial figures, when compared to genetically matched wild-type MEF (Figure 6A and B). In addition, H2AX^{-/-} MEF (Figure 6C) or H2AX-depleted wild-type MEF (Figure 6D) are hypersensitive to the cytotoxic effects of MMC, another hallmark of FA. A similar phenotype of an excess chromosome fragility was observed in H2AX KO MEFs reconstituted with a nonphosphorylatable H2AX (Figure 6A and B). Thus, our data indicate that H2AX-deficient cells have FA-like cellular phenotype.

Finally, we investigated whether H2AX and FANCD2 cooperate in response to DNA damage in the same pathway. For that purpose, MMC sensitivity was evaluated in H2AX^{+/+}, H2AX^{-/-} or H2AX^{S136A/S139A} MEF after depleting FANCD2 by RNAi. As shown in Figure 6E, siRNA FANCD2 depletion led to an increased sensitivity to MMC in H2AX^{+/+} cells, as expected. However, similar FANCD2 depletion did not further increase the sensitivity to MMC of H2AX^{-/-} or H2AX^{S136A/S139A} MEF. This indicates that FANCD2 and H2AX are likely to function in the same pathway in response to MMC.

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 tumor suppressor and genome stability pathways (Surrallés *et al.*, 2004; Venkitaraman, 2004), and its disruption leads to an increasing number of sporadic cancers (reviewed in Lyakhovich and Surrallés, 2006). However, the downstream function/s of the FA proteins is/are still a mystery. Here, we have focused our attention on 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 upstream FA core complex proteins. In the present investigation, human or mouse fibroblasts with different genetic backgrounds and under various culture conditions were locally irradiated with UVC to induce subnuclear accumulation of stalled replication forks 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 novel, practical and versatile functional assay for the FA/BRCA pathway as only when all known components of this pathway are fully functional, FANCD2 does normally relocate to the site of local irradiation.

Although FANCD2 relocates to UV-induced stalled replication forks, primary FA cells of complementation group FA-D2 (deficient in FANCD2) are only 20% more sensitive to UV than normal cells (Kalb *et al.*, 2004). This sensitivity might be even stronger considering that all FA-D2 patients generally have hypomorphic mutations and express low levels of FANCD2 (Kalb *et al.*, submitted). However, it is true but not surprising that, unlike XP cells, FA cells are not known for their hypersensitivity to UVC. The main reason is probably that the FA pathway is only the third line of defense, after nucleotide excision repair and translesion synthesis, against UV-induced DNA lesions. A similar picture occurs with ionizing radiation: FANCD2 gets phosphorylated by ATM and monoubiquitinated in response to ionizing radiation (Taniguchi *et al.*, 2002b) but FA-D2 cells are not hypersensitive to ionizing radiation. Understanding the differential spectrum of mutagen sensitivities between genome instability syndromes that crosstalk at the molecular level is an important avenue for future research.

Here, we show that the ATR substrate histone H2AX is not required for FANCD2 monoubiquitination in response to UVC or MMC. However, we cannot disregard the possibility of reduced levels of FANCD2 monoubiquitination at longer times of mutagen exposure in H2AX-deficient cells as some differences in intensities have been observed between experiments. This might as well be explained by the variations in the proportion of cells in S phase between H2AX-proficient and -deficient genetic backgrounds (see Results). An alternative, yet speculative, possibility is that the active FANCD2 is more easily deubiquitinated in H2AX-deficient cells as it is not properly retained at damaged chromatin. Importantly, γ H2AX is strictly required for proper accumulation of active FANCD2 to the site of damage. Thus, FANCD2 phosphorylation and monoubiquitination are necessary but not sufficient for FANCD2 relocation to stalled replication forks. The observations that (i) FANCD2 does not relocate to the site of damage in H2AX-deficient cells expressing a

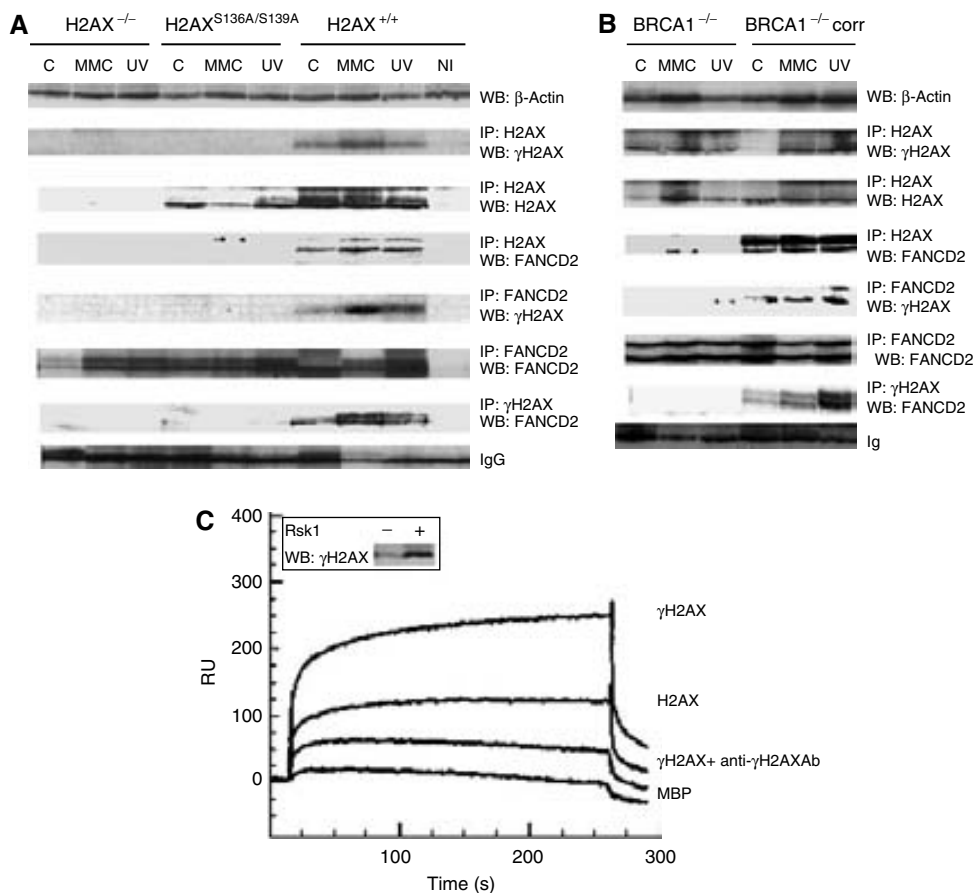


Figure 5 BRCA1-dependent binding of FANCD2 to γ H2AX upon DNA damage. FANCD2 co-immunoprecipitates with γ H2AX after DNA damage in a BRCA1-dependent manner. H2AX^{+/+}, H2AX^{S136A/S139A}, H2AX^{-/-} MEF (A) or BRCA1^{-/-} and BRCA1^{-/-} corrected cells (B) were not treated (-), MMC-treated (MMC) or UVC-irradiated (UV) as described in Materials and methods. Cells were lysed and immunoprecipitated with γ H2AX, H2AX, FANCD2 or non-immune control (NI) antibodies followed by Western blot, and the protein bands were detected by probing with FANCD2, H2AX or γ H2AX antibody, respectively. Loading control was monitored either by β -actin Western (A, B, upper row) or nonspecific binding to IgG (A, B, lowest row). Steady-state levels of γ H2AX, FANCD2 or β -actin are maintained by Western blot of the corresponding samples before IP. In panels A and B, blots 2–4 and 5–7 represent H2AX IPs and FANCD2 IPs, respectively. Direct binding of FANCD2 to γ H2AX by SPR (C). Equal aliquots of H2AX and H2AX phosphorylated by Rsk1 kinase were monitored by Western blot probed with γ H2AX antibodies. Binding sensorgram of phosphorylated H2AX to the immobilized FANCD2. FANCD2 was immobilized (5 ng/mm²) on a dextran surface, as described in Materials and methods. Phosphorylated (A), nonphosphorylated (C) or phosphorylated H2AX premixed with anti- γ H2AX antibody diluted at 1:500 (B) was injected over immobilized FANCD2. Control binding was performed on an unrelated (MBP) protein surface (C). The double bands of the FANCD2 WB panels in panels A and B correspond to FANCD2L (monoubiquitinated FANCD2; upper band) and FANCD2S (non-monoubiquitinated FANCD2).

nonphosphorylatable H2AX, (ii) FANCD2 relocates to UVC spots in concert with H2AX phosphorylation and (iii) ATR is required for proper H2AX phosphorylation suggest that ATR-mediated phosphorylation of H2AX at stalled replication forks is an additional requirement for FANCD2 relocation. Consistent with this model, γ H2AX and FANCD2 co-immunoprecipitate in response to DNA damage, both H2AX-deficient cells and H2AX^{-/-} cells reconstituted with a nonphosphorylatable H2AX have a FA-like cellular phenotype, and FANCD2 and H2AX cooperate in the same pathway in response to MMC. In addition, H2AX depletion by RNAi disrupts FANCD2 foci formation after ICL treatment and results in an increased MMC sensitivity. Thus, all avenues lead to the conclusion that γ H2AX is a novel functional requirement of the FA/BRCA pathway to resolve stalled replication forks. It is currently accepted that UV-induced photoproducts can be bypassed by the HR machinery when nucleotide excision repair is saturated and our data suggest that the FANCD2–H2AX interaction is probably functional for

the repair of these types of lesions at stalled replication forks, not for the general response to fork stalling.

The way in which BRCA1 affects the accumulation of FANCD2 at sites of DNA damage is not yet precisely defined. BRCA1 has been reported to mediate FANCD2 foci formation and to colocalize with FANCD2 at damaged sites (García-Higuera *et al.*, 2001), but it does not interact with FANCD2 (Folias *et al.*, 2002) and is dispensable for FANCD2 monoubiquitination (Vandenberg *et al.*, 2003). However, lack of BRCA1 partially disrupts this post-translational modification (García-Higuera *et al.*, 2001; Bruun *et al.*, 2003). Consistent with previous data (Foray *et al.*, 2003), H2AX is normally phosphorylated in response to MMC or UV even in the absence of BRCA1, but normal FANCD2 binding to γ H2AX requires BRCA1. Thus, our results suggest that BRCA1 mediates the recruitment of FANCD2 by γ H2AX to damaged chromatin.

The role of H2AX in genome stability is controversial. γ H2AX has been reported to be essential for the recruitment

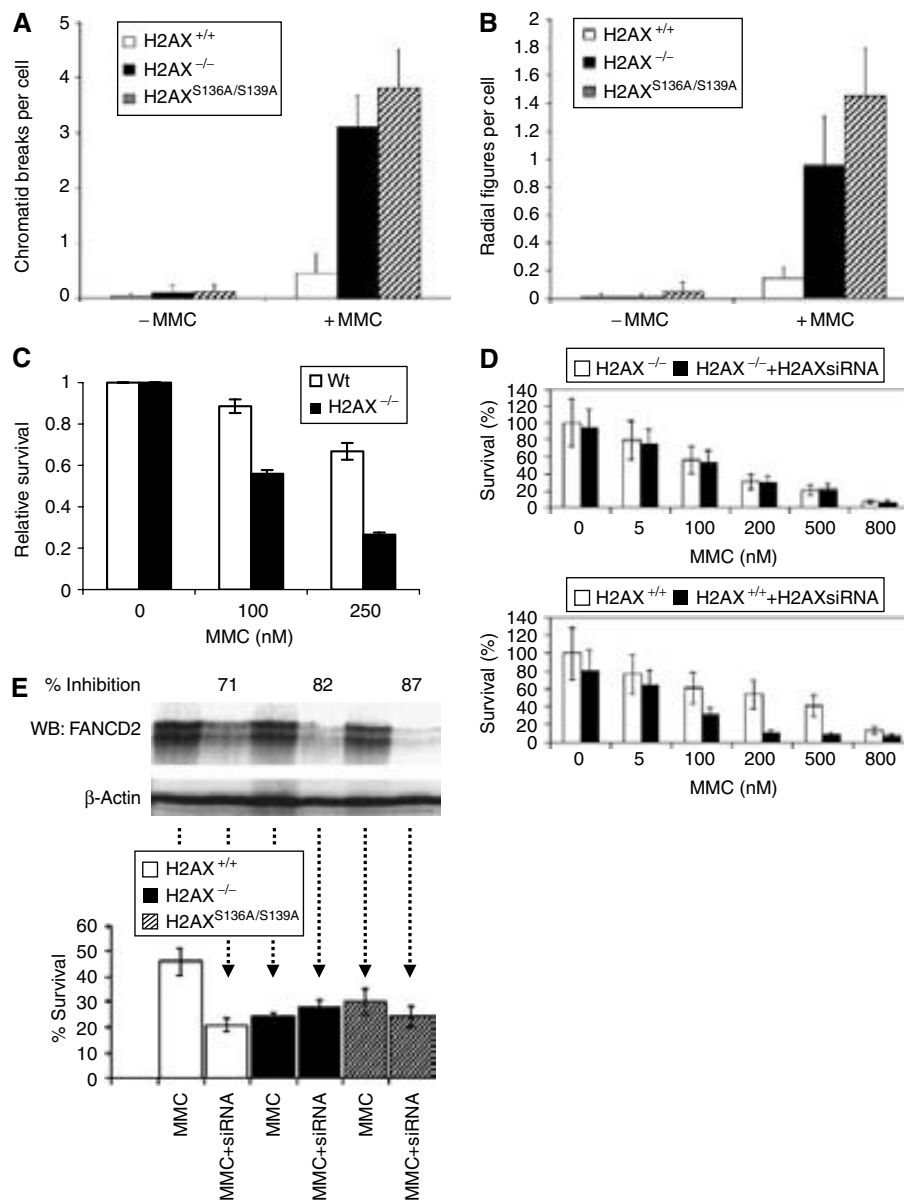


Figure 6 H2AX deficiency leads to an excess of MMC-induced chromatid-type chromosomal aberrations and cytotoxicity. Excess of MMC-induced chromatid-type aberrations (**A**) and radial (**B**) in MEF derived from H2AX KO mice or H2AX^{-/-} MEF expressing a nonphosphorylatable H2AX (H2AX^{S136A/S139A}). Means and s.d. of 2–4 experiments are shown. Differences between H2AX^{-/-} and H2AX^{S136A/S139A} are not statistically significant. Differences between wild-type and H2AX^{-/-} or H2AX^{S136A/S139A} cells are highly significant ($P < 0.001$). H2AX-deficient cells are hypersensitive to the cytotoxic effect of MMC (**C**) (means and s.d. of 48 measures per dose and cell type are shown). Differences between wild-type and H2AX^{-/-} cells are highly significant ($P < 0.001$). Depletion of H2AX by RNAi in wild-type (but not in H2AX^{-/-}) MEF increases cellular sensitivity to MMC (**D**). FANCD2 and H2AX function in the same pathway in response to MMC (**E**). FANCD2 depletion by RNAi does not further increase MMC sensitivity in H2AX-deficient cells, suggesting that both FANCD2 and H2AX are in the same pathway. H2AX^{+/+}, H2AX^{-/-} and H2AX^{S136A/S139A} MEFs were exposed to either FANCD2 RNAi or scramble RNAi (the same RNA sequence with five mismatches) and then exposed to MMC (200 nM for 24 h). FANCD2 immunoblot shows inhibition of FANCD2 synthesis by siRNA-FANCD2, not by scramble siRNA-FANCD2, irrespective of the H2AX genetic background (upper blot). The double bands of the FANCD2 WB panel in panel E correspond to FANCD2L (monoubiquitinated FANCD2; upper band) and FANCD2S (non-monoubiquitinated FANCD2). Percent of inhibition is calculated by TotaLab2.1 software as a ratio of FANCD2 RNAi and scRNA signals and normalized to the loading control signals (β -actin; upper blot, lowest row). The effect of FANCD2 depletion on MMC sensitivity in the three genetic backgrounds is shown in the graph. FANCD2 depletion by RNAi in wild-type cells increases MMC sensitivity. Similar and concurrent FANCD2 depletion in H2AX-deficient cells does not further increase MMC sensitivity, suggesting that both FANCD2 and H2AX act in the same pathway in response to MMC.

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 it is more involved in the retention or accumulation of repair factors than in the actual recruitment (Celeste *et al*, 2003a; Fernández-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; Fernández-Capetillo *et al*, 2004; Xie *et al*, 2004). γ H2AX is not essential for NHEJ or HR in mammalian cells but, resembling the FA pathway, it appears 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 (Fernández-Capetillo *et al.*, 2004; Xie *et al.*, 2004). It is known that FANCD2 binds to chromatin once activated by DNA damage and that monoubiquitinated FANCD2 then recruits BRCA2/FANCD1 into chromatin complexes suggesting that the FA/BRCA pathway and FANCD2 function to load BRCA2/FANCD1 on to chromatin, a process required for normal homology-directed DNA repair (Wang *et al.*, 2004). It is possible that γ H2AX plays a key role in this process, although further studies are needed to elucidate this issue.

Resembling FA patients and FA KO mice with mutations in either upstream or downstream FA genes (Navarro *et al.*, 2006), 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 tumor susceptibility in synergism with P53 deficiency (Bassing *et al.*, 2003; Celeste *et al.*, 2003b), again resembling FANCD2-deficient mice (Houghtaling *et al.*, 2005). This phenotypic coincidence and the herein reported functional involvement of H2AX in the FA pathway downstream of FANCD2 monoubiquitination open the possibility that H2AX might be a candidate FA gene different from BRCA2/FANCD1 and FANCI. In a collaborative multicenter study, we recently reported the existence of a 13th FA protein downstream of FANCD2 monoubiquitination (de Vries *et al.*, 2005). However, the sensitivity of H2AX-deficient cells is lower than that observed in FA cells and we have been unable to find H2AX mutations in any FA patient with normal FANCD2 monoubiquitination and normal BRCA2/FANCD1 and FANCI (data not shown). This suggests that, resembling ATR or NBS1, H2AX interacts with the FA pathway to prevent MMC-induced damage but that H2AX itself is not a FA gene.

The data reported here and in previously published studies can be integrated in the following model: UVC (or MMC, HU, 8-MOP) induces DNA lesions that block replication forks when the cell is (or once the cell enters) in 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. Phosphorylated H2AX then allows recruitment and/or retention of active FANCD2 to chromatin at the site of stalled replication forks in concert with BRCA1. Once the DNA lesions are repaired, no signal for ATR activation is present, leading to inactivation of the FA pathway. Another possibility is that chromatin remodeling at the site of irradiation mediated by γ H2AX allows FANCD2 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 at variance with this second possibility.

Materials and methods

Cell lines and culturing

The following human transformed fibroblasts cell lines were used in this study: MRC5 and HeLa (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 wild-type FANCA cDNA; CAPAN1 (BRCA2/FANCD1-deficient); HCC1937 (BRCA1-deficient); HCC1937 corrected for BRCA1 deficiency by microcell-mediated chromosome transfer; AT-7 (ATM^{-/-}) and F02/98 (ATR^{-/-}). In addition, we used primary wild-type human skin fibroblasts and MEFs derived from histone H2AX KO mice, wild-type genetically matched counterparts, as well as H2AX KO MEFs reconstituted with a cDNA coding for a nonphosphorylatable H2AX (H2AX^{S136A/S139A}). All the cell lines were cultured as described previously (Bogliolo *et al.*, 2000; Callén *et al.*, 2002; Surrallés *et al.*, 2002).

Local UV irradiation

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- μ m-diameter pores. The site of irradiation (UV spot) was visualized with antibodies against CPD and the relocation of FANCD2 or other proteins of interest to the site of damage was measured at different times using specific antibodies. All the relocation experiments were repeated at least three times and 200 locally irradiated nuclei per time point and experiment were analyzed to measure the percentage of UV spots containing the protein of interest.

The local UVC irradiation was performed essentially by the method of Volker *et al.* (2001) with some minor modifications. Briefly, cells were seeded on 18 \times 18 mm sterile coverslips and grown to near-confluency. Before irradiation, the medium was aspirated and the cells were washed with phosphate-buffered saline (PBS). The cells on the coverslips were then covered with an isopore polycarbonate filter with pores of 5- μ m-diameter (Millipore, Bedford, MA, USA) and exposed to UVC from above with a Philips 15 W UVC 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 μ m diameter area of the nuclei. The size of the irradiated area was confirmed by confocal microscopy measurements (data not shown). Subsequently, the filter was removed, fresh prewarmed medium was added back to the cells, and cells were returned to culture conditions or immediately processed.

Cell cycle analysis and flow cytometry

Primary fibroblasts growing on coverslips or in normal tissue flasks (unsynchronized) or cells subjected to serum starvation were harvested for flow cytometric analysis of the cell cycle. The harvested cells were washed twice in PBS and fixed in cold 70% ethanol for at least 30 min at 4°C. The samples were then centrifuged at 2000 r.p.m. and the pellets washed with PBS and resuspended in 1 ml of PBS. The samples were then treated with RNase (200 μ g/ml final concentration), and 20 μ g/ml of propidium iodide was added to each sample. The cell-cycle distributions were then analyzed with the flow cytometer FACScalibur (Becton Dickinson).

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 and 0.5% Triton (Sigma-Aldrich) for 15 min at RT. To visualize the site of UV irradiation, cells were washed twice with PBS, treated with 1 M 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) and 0.05% Tween 20 (Sigma-Aldrich) in PBS, incubated with a mouse primary anti-CPD antibody at 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 labeling, 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; rabbit

polyclonal); anti-PCNA (Becton Dickinson; 1:10 000). Incubation with secondary antibodies anti-mouse Alexa Fluor 488 (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) 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 labeling step, the preparations were mounted in anti-fading medium containing 4'-6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI) as a DNA counter stain (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). Using this color combination, nuclei were visualized in blue, the site of UV irradiation in green and the specific proteins in red. Microscopic analysis and quantification were performed using 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 1.0 program.

FANCD2 monoubiquitination studies

Cell extracts were prepared basically by the method of Tanaka *et al* (1992) with some modifications. Briefly, harvested cells were washed three times with PBS and resuspended in buffer I (10 mM Tris-HCl pH 7.8 and 200 mM KCl) at 1×10^6 cells/10 μ l. After the addition of an equal volume of buffer II (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 mg/ml aprotinin, 5 mg/ml leupeptin and 1 mg/ml pepstatin), the cell suspension was stirred for 1 h at 4°C and centrifuged at 13 000 r.p.m. for 15 min. The total protein concentration in the supernatant was then measured using the Bio-Rad Protein Assay (Biorad, Hercules, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. Total proteins (50–100 μ g) were then loaded on a 7% SDS-PAGE and subjected to standard Western blot procedure followed by immunodetection with monoclonal anti-human FANCD2 (1:250 Santa Cruz Biotechnology).

Cytogenetic and cell viability assays for MMC sensitivity

Exponentially growing MEFs with different H2AX genetic backgrounds were allowed to attach to coverslips for 24 h and subsequently treated with 50 nM MMC for 2 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-well ELISA microtiter plates at a density of 2000 cells in a final volume of 100 μ l culture medium per well. The cells were allowed to grow for 24 h and MMC was added at increasing concentrations for 1 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.

Immunoprecipitation experiments

IP was carried out as described previously (Lyakhovich and Shekhar, 2003). Briefly, 1 μ g of anti- γ H2AX, H2AX (Abcam, UK), FANCD2 (F117, Santa Cruz Biotechnology Inc.) or unrelated (non-immune control) antibody was bound to protein A-agarose beads (Invitrogen) in the presence of ethidium bromide (20 μ g/ml) and incubated with appropriate cell lysates overnight at 4°C. After extensive washing with PBS buffer, beads were eluted by boiling in SDS gel sample buffer and proteins were separated by SDS-PAGE and immunoblotted onto nylon membrane. Protein bands were visualized with anti-rabbit or anti-mouse IgG coupled to horseradish peroxidase using the ECL kit (Amersham, Arlington Heights, IL, USA).

RNAi and cytotoxicity

RNAi experiments were maintained as described by Nijman *et al* (2005). Shortly, cells were grown in RPMI medium and transfected with FANCD2 siRNA (Invitrogen, primer number 97480D01), set of H2AFX Stealth™ RNAs (Invitrogen HSS142373; HSS142373; HSS142374) or corresponding scrambled RNA by Lipofectamin 2000 transfection (Invitrogen) two times with the an interval of 24 h. After second transfection, cells were either harvested to prepare lysates or submitted to MMT cytotoxicity assay. The

sensitivity of siRNA-transfected MEF cells was evaluated using an MTT assay as described previously (Zhang *et al*, 2004). Immediately after second transfection, cells seeded into 96-well plates with 100 μ l of culture medium were treated with indicated concentrations of MMC for 5 days and processed for viability assay as above.

Binding affinity measurements by SPR

Interaction between immobilized FANCD2 and phosphorylated and nonphosphorylated H2AX was determined using SPR technique on a BIACore 2000 (BIAcore AB, Max Planck Institute, Munich). H2AX (80 μ M) was phosphorylated by incubation with the Rsk1 kinase as described previously (Keogh *et al*, 2006). Immobilization was carried out to the activated carboxyl groups of CM5 sensor chip by coupling reagent 2-(2-pyridinyldithio)ethaneamine according to the manufacturer's procedures. Analytes were dissolved in 10 mM HEPES pH 7.4 containing 150 mM NaCl, 3 mM EDTA and 0.005% surfactant P-20, and were injected over the sensor chip at a flow rate of 10 μ l/min at 25°C. Specificity of interaction was monitored by competition assay with analyte premixed with corresponding anti-phosphorylated H2AX antibody. Control experiments were performed on an unrelated (MBP) protein surface. The blank sensorgram was subtracted from the assay curve. All data were interpreted using the BioEvaluation 3.2 software (Biacore).

Chromatin fractionation experiments

All chromatin fractionation experiments are based on previous reports (Mendez and Stillman, 2000; Zou *et al*, 2002): briefly, 3×10^6 cells were washed twice with PBS (Ca^{2+} - and Mg^{2+} -free) and resuspended in solution A (10 mM HEPES, pH 7.9, 10 mM KCl, 1.5 mM MgCl_2 , 0.34 M sucrose, 10% glycerol, 1 mM dithiothreitol, 10 mM NaF, 1 mM Na_2VO_3 , protease inhibitors (Roche)). Triton X-100 was added to a final concentration of 0.1%, and the cells were incubated for 5 min on ice. Cytosolic and soluble proteins (S1) were separated from nuclei by centrifugation (4 min, 1300 g). Nuclei were washed once in solution A, and then lysed in solution B (3 mM EDTA, 0.2 mM EGTA, 1 mM dithiothreitol, protease inhibitors) for 30 min at 4°C. Insoluble chromatin was then separated from soluble nuclear proteins (S2) by centrifugation (4 min, 1700 g), washed once in solution B and collected by centrifugation (1 min, 10 000 g). The final chromatin pellet (P2) was resuspended in SDS sample buffer and sonicated. In the case of MEF cells analysis, the soluble fractions (S1 and S2) were pooled ('Sol' in Figure 4B) and the equivalent of 50 μ g of total proteins of the Sol fraction and of the chromatin fraction ('Insol' in Figure 4B) was analyzed by Western blot. FANCD2 was detected with the Santa Cruz sc-28194 rabbit polyclonal antibody. 8-MethoxyPsoralen (Mop) treatment was as follows: cells were exposed to 10 μ M 8-MOP (Sigma) for 20 min followed by 10 kJ/m² of UVA and they were recovered for the indicated times and then fractionated.

Acknowledgements

We are grateful to Drs Barbara Cox (Portland, USA), Alan D D'Andrea (Boston, USA), Anna Genescà (Barcelona, Spain), Mien-Chie Hung (Houston, USA), Penny Jeggo (Sussex, UK), Andre Nussenzweig (Bethesda, USA), Tsukusa Matsunaga (Kanazawa, Japan), Jeff Parvin (Boston, USA), Filippo Rosselli (Villejuif, France) Joseph S Siino (Davis, USA), Margaret Z Zdzienicka (Leiden, The Netherlands) and Marina Zhuravleva (Bethesda, USA) for sharing materials; to Dr Nosov (Munich, Germany) for the help with SPR experiments; to Mr Jean Hugues Guervilly for technical help with the cell fractionation experiments; and to the Universitat Autònoma de Barcelona (UAB) Microscopy Service for image acquisition. FA research in JS laboratory is funded by the Generalitat de Catalunya (SGR-00197-2002), the La Caixa Foundation Oncology Program (BM05-67-0), Genoma España, the Spanish Ministry of Health and Consumption (projects FIS PI020145, FIS PI051205, FIS G03/073 and CIBER-ER CB06/07/0023), the Spanish Ministry of Science and Technology (projects SAF2001-5138, SAF2002-11833-E, SAF2003-020328, SAF2004-20372-E and SAF2006-3440), the Commission of the European Union (projects HPMF-CT-2001-01330, FIGH-CT-2002-00217 and F16R-CT-2003-508842) and the European Regional Development Funds. MB was supported by a postdoctoral Marie Curie fellowship awarded by the Commission of the European Union (contract HPMF-CT-2001-01330).

References

- Abraham RT (2001) Cell cycle checkpoint signalling through the ATM and ATR kinases. *Genes Dev* **15**: 2177–2196
- Andreassen PR, D'Andrea AD, Taniguchi T (2004) ATR couples FANCD2 monoubiquitination to the DNA-damage response. *Genes Dev* **18**: 1958–1963
- Bassing CH, Suh H, Ferguson DO, Chua KF, Manis J, Eckersdorff M, Gleason M, Bronson R, Lee C, Alt FW (2003) Histone H2AX: a dosage-dependent suppressor of oncogenic translocations and tumors. *Cell* **114**: 359–370
- Bassing CH, Alt FW (2004) H2AX may function as an anchor to hold broken chromosomal DNA ends in close proximity. *Cell Cycle* **3**: 149–153
- Bogliolo M, Taylor RM, Caldecott KW, Frosina G (2000) Reduced ligation during DNA base excision repair supported by BRCA2 mutant cells. *Oncogene* **19**: 5781–5787
- Bogliolo M, Surrallés J (2005) The Fanconi anemia/BRCA pathway: FANCD2 at the crossroad between repair and checkpoint response to DNA damage. In: *DNA Repair and Human Diseases*, A Balajee (ed) New York: Ed. Landes Bioscience Ed.
- Bruun D, Folias A, Akkari Y, Cox Y, Olson S, Moses R (2003) siRNA depletion of BRCA1, but not BRCA2, causes increased genome instability in Fanconi anemia cells. *DNA Repair* **2**: 1007–1013
- Callén E, Samper E, Ramírez MJ, Creus A, Marcos R, Ortega JJ, Olivé T, Badell I, Blasco MA, Surrallés J (2002) Breaks at telomeres and TRF2-independent end fusions in Fanconi anemia. *Hum Mol Genet* **11**: 439–444
- Callén E, Casado JA, Tischkowitz MD, Bueren JA, Creus A, Marcos R, Dasi A, Estella JM, Muñoz A, Ortega JJ, de Winter J, Joenje H, Schindler D, Hanenberg H, Hodgson SV, Mathew CG, Surrallés J (2005) A common founder mutation in FANCA underlies the world highest prevalence of Fanconi anemia in gypsy families from Spain. *Blood* **105**: 1946–1949
- Castillo V, Cabré O, Marcos R, Surrallés J (2003) Molecular cloning of the *Drosophila* Fanconi anaemia gene FANCD2 cDNA. *DNA Repair* **2**: 751–758
- Celeste A, Difilippantonio S, Difilippantonio MJ, Fernández-Capetillo O, Pilch DR, Sedelnikova OA, Eckhaus M, Ried T, Bonner WM, Nussenzweig A (2003b) H2AX haploinsufficiency modifies genomic stability and tumor susceptibility. *Cell* **114**: 371–383
- Celeste A, Fernández-Capetillo O, Krulhak MJ, Pilch DR, Staudt DW, Lee A, Bonner RF, Bonner WM, Nussenzweig A (2003a) Histone H2AX phosphorylation is dispensable for the initial recognition of DNA breaks. *Nat Cell Biol* **5**: 675–679
- Celeste A, Petersen S, Romanienko PJ, Fernández-Capetillo O, Chen HT, Sedelnikova OA, Reina-San-Martin B, Coppola V, Meffre E, Difilippantonio MJ, Redon C, Pilch DR, Olaru A, Eckhaus M, Camerini-Otero RD, Tessarollo L, Livak F, Manova K, Bonner WM, Nussenzweig MC, Nussenzweig A (2002) Genomic instability in mice lacking histone H2AX. *Science* **296**: 922–927
- D'Andrea AD (2003) The Fanconi road to cancer. *Genes Dev* **15**: 1933–1936
- D'Andrea AD, Grompe M (2003) The Fanconi anaemia/BRCA pathway. *Nat Rev Cancer* **3**: 23–34
- De Vries Y, Levitus M, Steltenpool J, Rooimans MA, Thacker J, Surrallés J, Arwert F, Joenje H, de Winter JP (2005) Evidence for a new complementation group with a defect downstream of FANCD2 in the Fanconi anemia pathway. Seventeenth Fanconi Anemia Research Fund Scientific Symposium, Abstract book, p 77
- Fernández-Capetillo O, Celeste A, Nussenzweig A (2003) Focusing on foci: H2AX and the recruitment of DNA-damage response factors. *Cell Cycle* **2**: 426–427
- Fernández-Capetillo O, Lee A, Nussenzweig M, Nussenzweig A (2004) H2AX: the histone guardian of the genome. *DNA Repair* **3**: 959–967
- Folias A, Matkovic M, Bruun D, Reid S, Hejna J, Grompe M, D'Andrea A, Moses R (2002) BRCA1 interacts directly with the Fanconi anemia protein FANCA. *Hum Mol Genet* **11**: 2591–2597
- Foray N, Marot D, Gabriel A, Randrianarison V, Carr AM, Perricaudet M, Ashworth A, Jeggo P (2003) A subset of ATM- and ATR-dependent phosphorylation events requires the BRCA1 protein. *EMBO J* **22**: 2860–2871
- Furuta T, Takemura H, Liao ZY, Aune GJ, Redon C, Sedelnikova OA, Pilch DR, Rogakou EP, Celeste A, Chen HT, Nussenzweig A, Aladjem MI, Bonner WM, 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 MS, Timmers C, Hejna J, Grompe M, D'Andrea AD (2001) Interaction of the Fanconi anemia proteins and BRCA1 in a common pathway. *Mol Cell* **7**: 249–262
- Ho GP, Margossian S, Taniguchi T, D'Andrea AD (2006) Phosphorylation of FANCD2 on two novel sites is required for mitomycin C resistance. *Mol Cell Biol* **26**: 7005–7015
- Houghtaling S, Granville L, Akkari Y, Torimaru Y, Olson S, Finegold M, Grompe M (2005) Heterozygosity of p53, Trp53^{-/-}, accelerated epithelial tumor formation in Fanconi anemia complementation group D2 (Fancd2) knockout mice. *Cancer Res* **65**: 85–91
- Howlett NG, Taniguchi T, Durkin SG, D'Andrea AD, Glover TW (2005) The Fanconi anemia pathway is required for the DNA replication stress response and for the regulation of common fragile site stability. *Hum Mol Genet* **14**: 693–701
- Hussain S, Wilson JB, Medhurst AL, Hejna J, Witt E, Ananth S, Davies A, Masson JY, Moses R, West SC, de Winter JP, Ashworth A, Jones NJ, Mathew CG (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, Schindler D (2004) Lack of sensitivity of primary Fanconi's anemia fibroblasts to UV and ionizing radiation. *Radiat Res* **161**: 318–325
- Keogh MC, Kim JA, Downey M, Fillingham J, Chowdhury D, Harrison JC, Onishi M, Datta N, Galicia S, Emili A, Lieberman J, Shen X, Buratowski S, Haber JE, Durocher D, Greenblatt JF, Krogan NJ (2006) A phosphatase complex that dephosphorylates γ H2AX regulates DNA damage checkpoint recovery. *Nature* **439**: 497–501
- Kutler DI, Singh B, Satagopan J, Batish SD, Berwick M, Giampietro PF, Hanenberg H, Auerbach AD (2003) A 20-year perspective on the International Fanconi Anemia Registry (IFAR). *Blood* **101**: 1249–1256
- Lupardus PJ, Byun T, Yee MC, Hekmat-Nejad M, Cimprich KA (2002) A requirement for replication in activation of the ATR-dependent DNA damage checkpoint. *Genes Dev* **16**: 2327–2332
- Lyakhovich A, Shekhar MP (2003) Supramolecular complex formation between Rad6 and proteins of p53 pathway during DNA damage-induced response. *Mol Cell Biol* **23**: 2463–2475
- Lyakhovich A, Surrallés J (2006) Disruption of the Fanconi anemia/BRCA pathway in sporadic cancer. *Cancer Lett* **232**: 99–106
- Macé G, Bogliolo M, Guerville JH, Dugas du Villard JA, Rosselli F (2005) 3R coordination by Fanconi anemia proteins. *Biochimie* **87**: 647–658
- 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 (2003a) A novel ubiquitin ligase is deficient in Fanconi anemia. *Nat Genet* **35**: 165–170
- Meetei AR, Sechi S, Wallisch M, Yang D, Young MK, Joenje H, Hoatlin ME, Wang W (2003b) A multiprotein nuclear complex connects Fanconi anemia and Bloom syndrome. *Mol Cell Biol* **23**: 3417–3426
- Mendez J, Stillman B (2000) Chromatin association of human origin recognition complex, cdc6, and minichromosome maintenance proteins during the cell cycle: assembly of prereplication complexes in late mitosis. *Mol Cell Biol* **20**: 8602–8612
- Montes de Oca R, Andreassen PR, Margossian SP, Gregory RC, Taniguchi T, Wang X, Houghtaling S, Grompe M, D'Andrea AD (2005) Regulated interaction of the Fanconi anemia protein, FANCD2, with chromatin. *Blood* **105**: 1003–1009
- Nakanishi K, Taniguchi T, Ranganathan V, New HV, Moreau LA, Stotsky M, Mathew CG, Kastan MB, Weaver DT, D'Andrea AD (2002) Interaction of FANCD2 and NBS1 in the DNA damage response. *Nat Cell Biol* **12**: 913–920
- Nakanishi K, Yang Y-G, Pierce AJ, Taniguchi T, Digweed M, D'Andrea AD, Wang Z-Q, Jasim M (2005) Human Fanconi anemia monoubiquitination pathway promotes homologous DNA repair. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**: 1110–1115
- Navarro S, Meza NW, Quintana-Bustamante O, Casado JA, Jacome A, McAllister K, Puerto S, Surrallés J, Segovia JC, Bueren JA

- (2006) Hematopoietic dysfunction in a mouse model for Fanconi anemia group D1. *Mol Ther* **14**: 525–535
- Nijman SM, Huang TT, Dirac AM, Brummelkamp TR, Kerkhoven RM, D'Andrea AD, Bernards R (2005) The deubiquitinating enzyme USP1 regulates the Fanconi anemia pathway. *Mol Cell* **3**: 331–339
- Niedzwiedz W, Mosedale G, Johnson M, Ong CY, Pace P, Patel KJ (2004) The Fanconi anaemia gene FANCC promotes homologous recombination and error-prone DNA repair. *Mol Cell* **15**: 607–620
- O'Driscoll M, Ruiz-Perez VL, Woods CG, Jeggo PA, Goodship JA (2003) A splicing mutation affecting expression of ataxia-telangiectasia and Rad3-related protein (ATR) results in Seckel syndrome. *Nat Genet* **33**: 497–501
- Patel KJ, Yu VP, Lee H, Corcoran A, Thistlethwaite FC, Evans MJ, Colledge WH, Friedman LS, Ponder BA, Venkitaraman AR (1998) Involvement of Brca2 in DNA repair. *Mol Cell* **1**: 347–357
- Paull TT, Rogakou EP, Yamazaki V, Kirchgessner CU, Gellert M, Bonner WM (2000) A critical role for histone H2AX in recruitment of repair factors to nuclear foci after DNA damage. *Curr Biol* **10**: 886–895
- Pichierrri P, Rosselli F (2004a) Fanconi anemia proteins and the S phase checkpoint. *Cell Cycle* **3**: 698–700
- Pichierrri P, Rosselli F (2004b) The DNA crosslink-induced S-phase checkpoint depends on ATR–CHK1 and ATR–NBS1–FANCD2 pathways. *EMBO J* **10**: 1178–1187
- Pichierrri P, Averbeck D, Rosselli F (2002) DNA cross-link-dependent RAD50/MRE11/NBS1 subnuclear assembly requires the Fanconi anemia C protein. *Hum Mol Genet* **11**: 2531–2546
- Pichierrri P, Franchitto A, Rosselli F (2004) BLM and the FANCD proteins collaborate in a common pathway in response to stalled replication forks. *EMBO J* **23**: 3154–3163
- Rothfuss A, Grompe M (2004) Repair kinetics of genomic inter-strand 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
- Surrallés J, Jackson SP, Jasin M, Kastan MB, West SC, Joenje H (2004) Molecular cross talk among chromosome fragility syndromes. *Genes Dev* **18**: 1359–1370
- Surrallés J, Ramírez MJ, Marcos R, Natarajan AT, Mullenders LHF (2002) Clusters of transcription-coupled repair in the human genome. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**: 10571–10574
- Tanaka M, Lai JS, 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 PR, Gregory RC, Grompe M, D'Andrea AD (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 PR, Gregory RC, Kim ST, Lane WS, Kastan MB, D'Andrea AD (2002b) Convergence of the Fanconi anemia and ataxia telangiectasia signaling pathways. *Cell* **109**: 459–472
- Tercero JA, Longhese MP, Diffley JF (2003) A central role for DNA replication forks in checkpoint activation and response. *Mol Cell* **11**: 1323–1336
- Thompson L (2005) Unraveling the Fanconi anemia–DNA repair connection. *Nat Genet* **37**: 921–922
- Vandenberg CJ, Gergely F, Ong CY, Pace P, Mallery DL, Hiom K, Patel KJ (2003) BRCA1-independent ubiquitination of FANCD2. *Mol Cell* **12**: 247–254
- Venkitaraman AR (2002) Cancer susceptibility and the functions of BRCA1 and BRCA2. *Cell* **108**: 171–182
- Venkitaraman AR (2004) Tracing the network connecting BRCA and Fanconi anaemia proteins. *Nat Rev Cancer* **4**: 266–276
- Volker M, Mone MJ, Karmakar P, van Hoffen A, Schul W, Vermeulen W, Hoeijmakers JH, van Driel R, van Zeeland AA, Mullenders LH (2001) Sequential assembly of the nucleotide excision repair factors *in vivo*. *Mol Cell* **8**: 213–224
- Wang X, Andreassen PR, D'Andrea AD (2004) Functional interaction of monoubiquitinated FANCD2 and BRCA2/FANCD1 in chromatin. *Mol Cell Biol* **24**: 5850–5862
- Ward IM, Chen J (2001) Histone H2AX is phosphorylated in an ATR-dependent manner in response to replicational stress. *J Biol Chem* **276**: 47759–47762
- Xie A, Puget N, Shim I, Odate S, Jarzyna I, Bassing CH, Alt FW, Scully R (2004) Control of sister chromatid recombination by histone H2AX. *Mol Cell* **16**: 1017–1025
- Zhang M, Zhang X, Bai CX, Chen J, Wei MQ (2004) Inhibition of epidermal growth factor receptor by RNA interference in A549 cells. *Acta Pharmacol Sin* **25**: 61–67
- Zou L, Cortez D, Elledge SJ (2002) Regulation of ATR substrate selection by Rad17-dependent loading of Rad9 complexes onto chromatin. *Genes and Dev* **16**: 198–208

Anexo 5:

“A comprehensive strategy for the subtyping of patients with Fanconi anaemia: conclusions from the Spanish Fanconi Anemia Research Network”

J Med Genet. 2007 Apr;44(4):241-9

A comprehensive strategy for the subtyping of patients with Fanconi anaemia: conclusions from the Spanish Fanconi Anemia Research Network

José Antonio Casado, Elsa Callén, Ariana Jacome, Paula Río, Maria Castella, Stephan Lobitz, Teresa Ferro, Arturo Muñoz, Julián Sevilla, Ángeles Cantalejo, Elena Cela, José Cervera, Jesús Sánchez-Calero, Isabel Badell, Jesús Estella, Ángeles Dasí, Teresa Olivé, Juan José Ortega, Antonia Rodríguez-Villa, María Tapia, Antonio Molinés, Luis Madero, José C Segovia, Kornelia Neveling, Reinhard Kalb, Detlev Schindler, Helmut Hanenberg, Jordi Surrallés, Juan A Bueren

J Med Genet 2007;000:1–10. doi: 10.1136/jmg.2006.044719

See end of article for authors' affiliations

Correspondence to:
Dr J A Bueren,
Hematopoiesis and Gene
Therapy Program, CIEMAT
Avenida Complutense, No
22, 28040 Madrid, Spain;
juan.bueren@ciemat.es

Accepted 16 October 2006
Published Online First
14 November 2006

Background: Fanconi anaemia is a heterogeneous genetic disease, where 12 complementation groups have been already described. Identifying the complementation group in patients with Fanconi anaemia constitutes a direct procedure to confirm the diagnosis of the disease and is required for the recruitment of these patients in gene therapy trials.

Objective: To determine the subtype of patients with Fanconi anaemia in Spain, a Mediterranean country with a relatively high population (23%) of patients with Fanconi anaemia belonging to the gypsy race.

Methods: Most patients could be subtyped by retroviral complementation approaches in peripheral blood T cells, although some patients with mosaic Fanconi anaemia were subtyped in cultured skin fibroblasts. Other approaches, mainly based on western blot analysis and generation of nuclear RAD51 and *FANCF* foci, were required for the subtyping of a minor number of patients.

Results and conclusions: From a total of 125 patients included in the Registry of Fanconi Anaemia, samples from 102 patients were available for subtyping analyses. In 89 cases the subtype could be determined and in 8 cases exclusions of common complementation groups were made. Compared with other international studies, a skewed distribution of complementation groups was observed in Spain, where 80% of the families belonged to the Fanconi anaemia group A (FA-A) complementation group. The high proportion of gypsy patients, all of them FA-A, and the absence of patients with FA-C account for this characteristic distribution of complementation groups.

Fanconi anaemia is a rare hereditary recessive disease characterised by developmental abnormalities, bone marrow failure and predisposition to cancer, mainly acute myeloid leukaemia.¹ To date, 12 complementation groups have been reported (FA-A, B, C, D1, D2, E, F, G, I, J, L and M) and 11 associated genes have already been identified: *FANCA*, *FANCB*, *FANCC*, *FANCD1/BRCA2*, *FANCD2*, *FANCE*, *FANCF*, *FANCG/XRCC9*, *BRIP1/FANCF*, *FANCL* and *FANCM/Hef*.^{2–14} In dividing cells or in cells exposed to DNA damage, eight Fanconi anaemia proteins (FANCA/B/C/E/F/G/L/M) form a Fanconi anaemia core complex, necessary for the monoubiquitination of FANCD2.^{5–15} In contrast with these Fanconi anaemia proteins, FANCD1 and FANCF are not involved in FANCD2 monoubiquitination, indicating that these proteins participate downstream of FANCD2 in the FA/BRCA pathway.^{2–7}

Because of the overlap in the phenotype and molecular pathways between the different chromosome fragility syndromes, Fanconi anaemia subtyping constitutes an invaluable approach to confirm the diagnosis of the disease.^{16–17} Additionally, in the case of patients with FAD1, subtyping analysis allows the identification of *BRCA2* mutation carriers, characterised by an increased risk of developing breast, ovarian and other types of cancers.¹⁸ Fanconi anaemia subtyping also facilitates mutation screening studies and therefore the identification of mutations with particular pathogenic effects. In addition to the above-mentioned applications, subtyping is essential before enrolling a patient with Fanconi anaemia in a gene therapy trial.

Progress in the cloning of Fanconi anaemia genes enabled the identification of mutations in specific Fanconi anaemia genes by means of DNA sequencing approaches or other methods.¹⁹ The large number and complexity of some Fanconi anaemia genes and their mutations, together with the necessity of verifying the pathogenicity of each new mutation, implies that subtyping of patients with Fanconi anaemia by mutational analysis is often time consuming and laborious. The possibility of reverting the phenotype of Fanconi anaemia cells by the transfer of functional Fanconi anaemia genes has been recently proposed as an efficient approach for identifying the pathogenic genes that account for the disease in patients with Fanconi anaemia.^{20–21} A different Fanconi anaemia subtyping approach is based on the western blot analysis of FANCD2.²² By means of the observation of the ubiquitinated (FANCD2-L) and non-ubiquitinated (FANCD2-S) forms of the protein FANCD2, it is possible to predict pathogenic mutations in proteins upstream or downstream of FANCD2.²³ In the case of patients belonging to rare complementation groups such as FAD1 or FA-J, approaches based on the formation of RAD51 or BRIP1 nuclear foci are also highly informative in identifying their complementation group.²⁴

With the purpose of determining the prevalence of the different Fanconi anaemia complementation groups in Spain,

Abbreviations: DEB, diepoxybutane; FBS, fetal bovine serum; LCL, lymphoblast cell line; MMC, mitomycin C; PBS, phosphate-buffered saline; TBS, TRIS-buffered saline

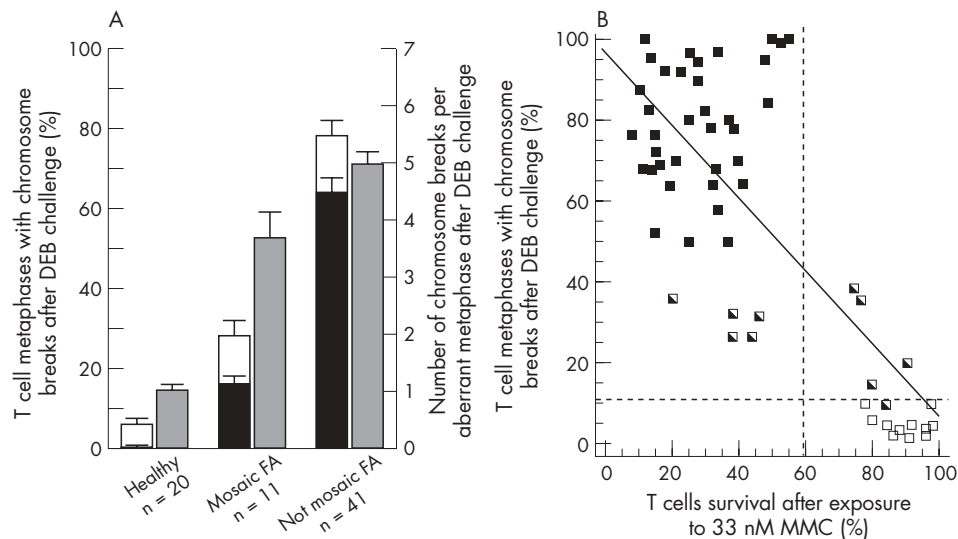


Figure 1 Analysis of the response of peripheral blood T cells from healthy donors and patients with Fanconi anaemia to diepoxybutane (DEB) and mitomycin C (MMC). (A) Proportion of T cells with single (white bars) and multiple (black bars) chromosome aberrations, as well as the number of chromosome breaks per aberrant cell after DEB treatment (grey bars). Each bar represents the mean (SD) of individual data. (B) Relationship between the proportion of peripheral blood T cells with aberrant metaphases after DEB challenge and the viability of these cells after exposure to 33 nM MMC. Individual points correspond to samples from healthy donors (○) and from patients with mosaic (□) and non-mosaic (■) Fanconi anaemia.

we conducted an extensive subtyping study of Fanconi anaemia in this Mediterranean country. In addition to a predominantly caucasian population, a relatively large population of about 500 000 gypsies also live in Spain. In this population, the incidence of recessive syndromes is high, owing to the high rates of consanguinity.²⁵ This study will allow us to identify potential differences in the distribution of Fanconi anaemia subtypes due to geographical and ethnic characteristics, and will also allow us to conduct further mutation studies within the population of patients subtyped for Fanconi anaemia. Additionally, our subtyping study will facilitate the enrolling of patients with Fanconi anaemia in clinical gene therapy trials aimed at the genetic correction of their haematopoietic stem cells.

METHODS

Patients, chromosome breakage tests, lymphoblast cell lines and skin fibroblasts

The national registry of patients with Fanconi anaemia from Spain was created in 1998. Currently the registry includes 125 patients. Patients were coded to protect their confidentiality, and informed consent was obtained from the patients or their relatives. Patients with Fanconi anaemia were diagnosed on the basis of clinical symptoms and positive results from chromosome breakage tests using a DNA cross-linker drug.²⁶ Fresh peripheral blood lymphocytes were stimulated with phytohaemagglutinin for 24 h and further incubated with or without diepoxybutane (DEB) for 48 h. Aberrant metaphases were defined by the presence of chromosomal breakages, gaps or radial chromosomes.²⁶ Epstein-Barr virus-transformed lymphoblast cell lines (LCLs) were generated from peripheral blood cells of healthy donors and patients with Fanconi anaemia, and maintained in RPMI medium (Gibco) supplemented with 20% fetal bovine serum (FBS; Gibco) and antibiotics. To generate fibroblast cells, a skin biopsy specimen was obtained, and then mechanically fragmented and incubated in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Gibco) with collagenase 0.25% (Sigma) for 12 h. Cells were centrifuged and cultured for 2–3 weeks in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with antibiotics and 10% FBS (Gibco) at 37°C and 5% CO₂.

Subtyping by complementation studies with retroviral vectors

Retroviral subtyping on blood T cells was based on the reversion of the mitomycin C (MMC) hypersensitivity of Fanconi anaemia cells mediated by the transfer of complementary Fanconi anaemia genes, using retroviral vectors as described previously.²⁰ Mononuclear cells from heparinised peripheral blood were stimulated in plates coated (overnight at 4°C) with 30 µg/ml of purified anti-human CD3 (OKT3 Ortho Biotech) and anti-CD28 (CD28 Pharmingen, San Diego, California, US) monoclonal antibodies. After 5–6 days, proliferating T cells were placed in fibronectin-coated wells (2 µg/cm² CH-296; Takara Shuzo, Otsu, Japan) pre-loaded with retroviral supernatants. Two additional infections of 24 h in the presence of interleukin (IL)2 (100 IU/ml) were performed to achieve high percentages of cell transductions. After the second infection, cells were collected and exposed to increasing concentrations of MMC (0–1000 nmol/l) in fresh medium with IL2. Five days later, cells were resuspended in phosphate-buffered saline (PBS)–bovine serum albumin (BSA; 0.05%) containing 0.5 µg/ml propidium iodide (Sigma) and incubated for 10 min at 4°C. Cell viability was determined by flow cytometry (EPICS, Coulter Electronics, Hialeah, Florida, USA) based on the propidium iodide exclusion test, using a dot blot of forward scatter versus propidium iodide fluorescence. The following retroviral vectors were used: LFAPEG (*FANCA+EGFP*) and SFA (*FANCA*), LFCPEG (*FANCC+EGFP*), LFGPEG (*FANCG+EGFP*), S11FEIEG (*FANCE+EGFP*), LFFIEG (*FANCF+EGFP*), S11FD2IN (*FANCD2+Neo^r*) and a control LPEG (*EGFP*).^{20–27} Retroviral complementation was considered to have occurred if survivals to at least three different concentrations of MMC increased >20% as a result of the transduction of cells with one Fanconi anaemia vector, compared with viabilities obtained in cells treated under identical conditions, but transduced with the control vector. When EGFP-retroviral vectors were used, the efficacy of transduction was also monitored by flow cytometry.

In patients with mosaic Fanconi anaemia, retroviral complementation was routinely conducted with a control retroviral vector expressing the neomycin phosphotransferase (*Neo^r*) gene (S11IN) and a vector coexpressing *FANCA* and *Neo^r*

(S11FAIN) on skin fibroblasts subjected to G-418 selection. In this case, the reversion in the G2/M arrest on exposure to MMC was used as the biological end point.²¹ Retroviral complementation was considered to have occurred if the percentage of MMC-treated cells in G2/M was at least 15% lower in cells transduced with the complementing FA-vector, compared with the G2/M value obtained in cells treated under identical conditions, but transduced with the control vector. The cell cycle was analysed by flow cytometry, and linear fluorescence emission of propidium iodide from 10 000 events was collected with doublet discrimination. Analysis of the cell cycle was performed using MODFIT-LT (Verity Software House, Topsham, Maine, USA).

Western blot analyses

Western blot analyses were performed using extracts of proliferating LCLs. Two million cells per sample were collected by centrifugation, washed twice in PBS, lysed in 1 × lysis buffer (50 mM TRIS-HCl, 70 mM 2-mercaptoethanol and 2% sodium dodecylsulphate), boiled for 5 min and subjected to 7.5% polyacrylamide sodium dodecylsulphate gel electrophoresis. After electrophoresis, proteins were transferred to a nitrocellulose membrane using a submerged transfer apparatus (BioRad), filled with 25 mM TRIS Base, 200 mM glycine and 20% methanol. After blocking with 5% non-fat dried milk in TRIS-buffered saline Tween-20 (50 mM Tris-HCl (pH 8), 150 mM NaCl and 0.1% Tween 20), the membrane was incubated with primary antibodies (anti-FANCD2, SantaCruz Biotechnology, Santa Cruz, California, USA; Ab-1 anti-BRCA2, Oncogene Research Products; or anti-BRIP1, Novus Biologicals, Littleton, Colorado, USA) diluted in TRIS-buffered saline Tween-20, washed extensively and incubated with the appropriate horseradish peroxidase-linked secondary antibody (Amersham). Detection was performed with the Western Breeze Immunodetection Kit (Invitrogen). When necessary, nuclear extracts were collected by the Nuclear Extraction Kit (Chemicon). The concentration of protein was measured by the Bradford assay.

Immunofluorescence studies of RAD51 and BRIP1 foci

For immunofluorescence studies, cells were fixed with 3.7% paraformaldehyde in PBS for 15 min followed by permeabilisation with 0.5% Triton X-100 in PBS for 5 min. After blocking for 30 min in blocking buffer (10% FBS, 0.1% NP-40 in PBS), cells were incubated with either polyclonal rabbit anti-RAD51 antibody (Calbiochem, La Jolla, California, USA) or polyclonal rabbit anti-BRIP1 antibody (Sigma-Aldrich, St Louis, Missouri, USA). Cells were subsequently washed three times in TBS and incubated with anti-rabbit Alexa 488 nm and Alexa 594 (Molecular Probes, Leiden, The Netherlands) as secondary antibodies. Alternatively, anti-rabbit Texas red-conjugated antibody (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Cambridgeshire, California, USA) was used. After 45 min, cells were washed three times with TBS and the slides were mounted in Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, California, USA) with 4,6-diamidino-2-phenylindole.

RESULTS AND DISCUSSION

Response of peripheral blood T cells from healthy donors and patients with Fanconi anaemia to DEB and MMC

Cytogenetic analyses allowed us to determine the proportion of metaphases with single and multiple chromosome breaks in a population of 72 patients with Fanconi anaemia and healthy donors whose T cells were exposed to DEB (fig 1A). In contrast with results obtained from healthy donors, a high proportion of metaphases from patients with typical (non-mosaic) Fanconi

anaemia contained single or multiple breaks after DEB challenge (6.40% (1.13%) vs 77.8% (2.4%), respectively). As observed in previous studies,^{23 28–30} samples from a relatively reduced number of patients showed intermediate proportions of T cell metaphases with chromosome aberrations after DEB challenge, thus complicating the diagnosis of these patients. In these cases, the presence of metaphases with ≥ 2 breaks was most helpful for the diagnosis. Although only 0.70% (0.32%) of metaphases from healthy donors showed more than one break, 16.3% (2.1%) and 63.9% (3.1%) metaphases from patients with mosaic and non-mosaic Fanconi anaemia, respectively, had more than one break. In addition to this parameter, the number of DEB-induced chromosome breaks per aberrant metaphase constituted a powerful parameter for the diagnosis of patients with mosaic Fanconi anaemia (fig 1A). Although DEB-treated cells from healthy donors contained a mean (SD) of 1.04 (0.18) breaks per aberrant cell, this parameter increased to 3.75 (0.42) and 5.02 (0.3) in the case of patients with mosaic and non-mosaic Fanconi anaemia. On the basis of these observations, initial suspects of somatic mosaicism in T cells are routinely considered when samples treated with DEB contain 5–50% of metaphases with chromosome breaks and intermediate or no sensitivity to MMC in the retroviral subtyping study. T cell mosaicism is more evident when the proportions of metaphases with multiple breaks range between 10–60% (additionally, LCLs from all these samples were resistant to MMC). When relatively low percentages of metaphases with single or multiple breaks are observed, the quantification of the mean number of breaks per aberrant metaphase is highly useful in identifying patients with mosaic Fanconi anaemia, since mean values > 2 breaks per aberrant metaphase are highly indicative of the presence of Fanconi anaemia cells. In some instances, however, to exclude a negative diagnosis of a patient with Fanconi anaemia with a high level of mosaicism in peripheral blood, cytogenetic and cell cycle analyses of skin fibroblasts are required.

For the subtyping of patients with Fanconi anaemia, the retroviral complementation assay was routinely used as a first approach.²⁰ This assay is based on the analysis of the MMC sensitivity of peripheral blood T cells, followed by the correction of the MMC hypersensitivity conferred by the complementing Fanconi anaemia gene. The retrospective analysis of 57 peripheral blood samples from healthy donors and from patients with mosaic and non-mosaic Fanconi anaemia showed a good relationship—fitting to a linear regression model ($p < 0.01$)—between the proportion of T cell metaphases with DEB-induced aberrant chromosomes and the sensitivity of T cells to 33 nM MMC—a dose that showed more marked differences in viability between healthy cells and Fanconi anaemia cells (fig 1B). Although survivals $> 60\%$ after an exposure to 33 nM MMC corresponded either to healthy donors ($n = 11$) or to patients with mosaic Fanconi anaemia ($n = 5$), T cell survivals below this threshold always corresponded to patients with Fanconi anaemia (36 non-mosaic and 5 mosaic). This simple analysis can be conducted by any laboratory with experience in cell culture and flow cytometry, and would have diagnostic value in all cases where a high sensitivity to MMC is observed.

Subtyping analysis of non-gypsy patients with Fanconi anaemia

Once the diagnosis of Fanconi anaemia was confirmed, patients were subtyped by transducing their T cells with retroviral vectors expressing three different Fanconi anaemia genes: *FANCA* (two vectors), *FANCC* and *FANCG*, and one negative control (*EGFP*). In some instances, samples that were not complemented with these vectors were subtyped with additional retroviral vectors carrying three further Fanconi anaemia

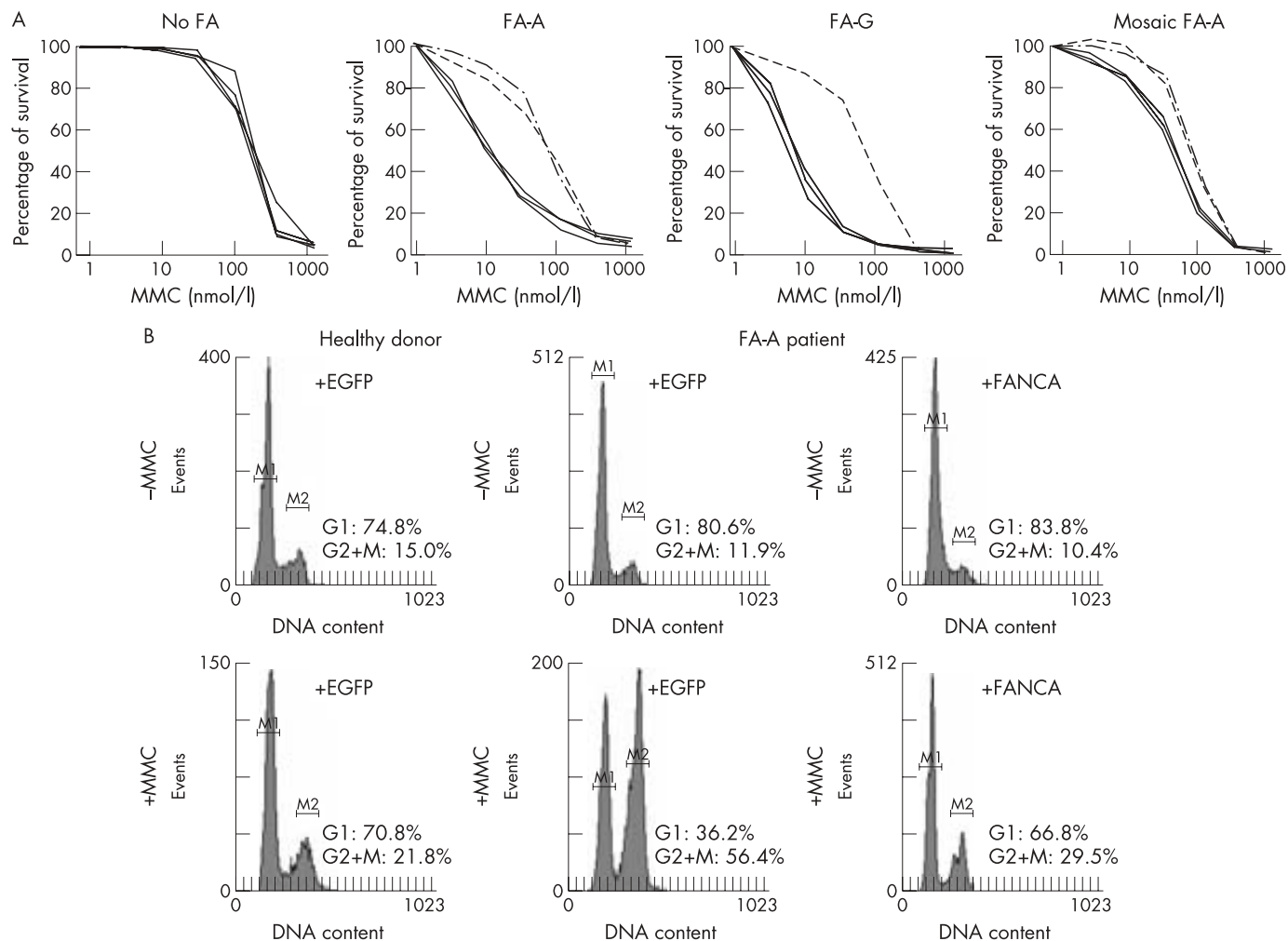


Figure 2 Genetic complementation of cells from patients with Fanconi anaemia (FA), with retroviral vectors expressing functional *FANCA* genes. Panel A shows representative reversions in the mitomycin C (MMC) hypersensitivity of T cells after retroviral-mediated gene transfer of different Fanconi anaemia genes. Since FA-A subtype is the most frequently represented group, two different *FANCA* vectors were routinely used (LFAPEG and SFA), together with one vector encoding *FANCC* (LFCPEG), *FANCG* (LFGPEG) and a control *EGFP* vector (LPEG). Data corresponding to a healthy donor, a patient with non-mosaic FA-A and FA-G, and a patient with mosaic (with partial sensitivity to MMC) FA-A are shown. Broken lines represent complementation of MMC-hypersensitivity. Panel B shows a representative correction of the MMC-induced G₂ phase accumulation in fibroblasts from a patient with mosaic FA-A after retroviral-mediated gene transfer of *FANCA*. For subtyping in skin fibroblasts, a retroviral vector coexpressing *FANCA* and the neomycin phosphotransferase gene was used (*S11FAIN*).

genes (*FANCD2*, *FANCE* and *FANCF*) and the control *EGFP* vector. The MMC hypersensitivity of T cells from patients assigned to the FA-A subgroup was clearly reversed by the transfer of *FANCA*, using either the LFAPEG or SFA retroviral vectors. Similar results were obtained in samples corresponding to other complementation groups after transduction with the corresponding *FANCA* gene (for a representative analysis of a patient with FA-G see fig 2A). Of 14 patients with mosaic Fanconi anaemia, six could be subtyped using the same approach, since their T cells were sensitive enough to MMC (fig 2A). In other instances, however, T cells from patients with mosaic Fanconi anaemia were resistant to MMC, and those patients were subtyped in skin fibroblasts, where somatic mosaicism has not been reported so far. In this case, the reversion of the MMC-induced G₂/M arrest produced after the transduction with the complementing Fanconi anaemia gene was chosen as a biological end point (fig 2B).³⁰

Taken together, the retroviral complementation approach allowed us to subtype 57 of the 73 caucasian patients with Fanconi anaemia who entered the study. A total of 50 patients (45 families) were FA-A, three patients were FAD2 (FA78 and siblings FA70 and FA71), two patients were FA-E (FA202 and

FA281) and two patients were FA-G (FA59 and FA116). Regarding the other 16 patients, five patients could not be further studied (mosaics with MMC-resistant T cells; skin samples not available) and 11 patients were classified as non-FA-A/C/G.

In five patients (FA62, 69, 104, 177 and 287), further subtyping studies could be conducted using complementary strategies to retroviral subtyping. Additionally, the subtype of patient FA72 was deduced from analyses of her sibling (FA69). Western blot analyses of *FANCD2* were conducted with these samples to determine whether the mutated gene was upstream or downstream of the *FANCD2* monoubiquitination pathway (fig 3A). Consistent with retroviral complementation analyses, *FANCD2* was not detected in samples from FA70 and FA78. Cells from FA287 (not shown) only showed the small *FANCD2* band, suggesting that this patient must be deficient in a *FANCA* protein upstream of *FANCD2*, except for *FANCA*, *FANCC* and *FANCG* (ruled out by retroviral complementation). Cells from three unassigned patients (FA62, 69 and 104) showed both the non-ubiquitinated and monoubiquitinated *FANCD2* isoforms, indicating an intact Fanconi anaemia complex upstream of *FANCD2* in these cells. Western blot analysis of *BRCA2* showed

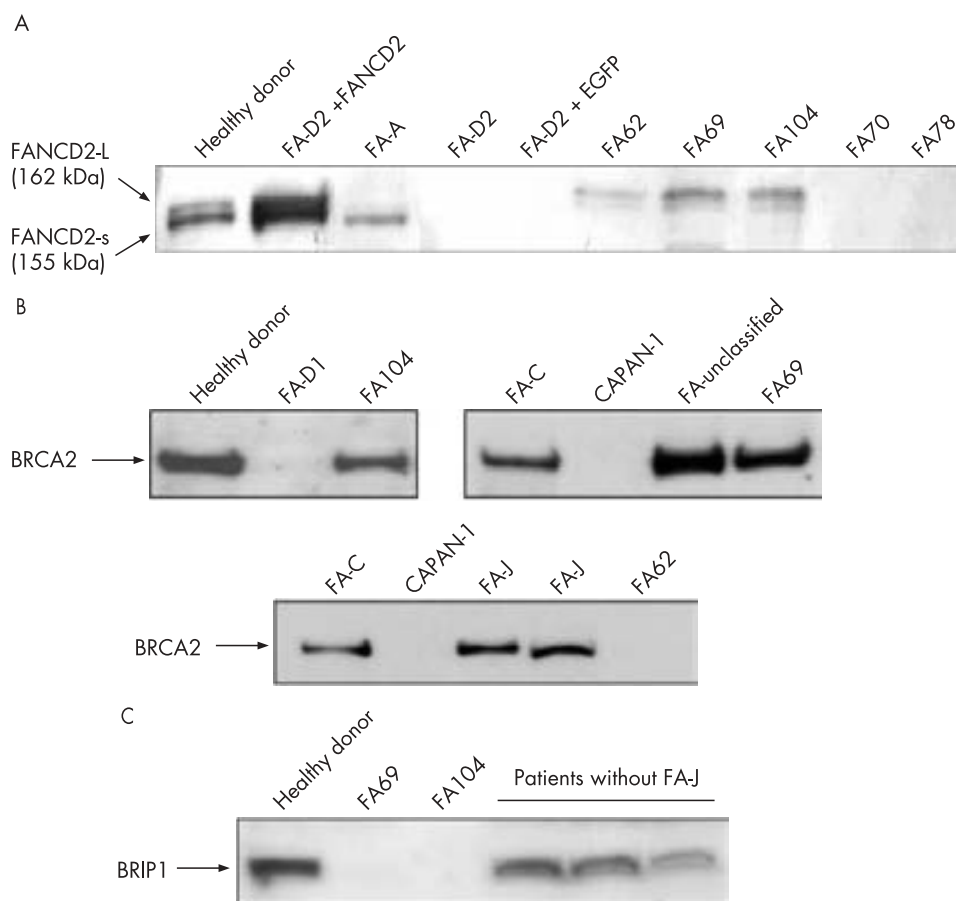


Figure 3 Western blot analyses of the FANCD2, BRCA2 and BRIP1 proteins in cells from patients with Fanconi anaemia (FA) not complemented with *FANCA*, *FANCC* and *FANCG* retroviral vectors. Protein extracts from proliferating lymphoblast cell line were transferred to a nitrocellulose membrane, incubated with the corresponding antibodies, and then revealed as described in the Methods section. Western blot analysis of FANCD2, showing the ubiquitinated (L-FANCD2) and non-ubiquitinated (S-FANCD2) forms of FANCD2. (B and C) Western blot analyses of BRCA2 and BRIP1 proteins, respectively. CAPAN-1: negative control consisting of cells not expressing BRCA2.^{7,2}

a band of the expected size in FA69 and FA104 cells, whereas no band was detected in cells from patient FA62 (fig 3B). As BRCA2 is required for generating RAD51 foci after exposure to MMC, we investigated the formation of RAD51 foci in cells from these patients after an MMC challenge.²⁴ Consistent with the lack of the BRCA2 band in the western blot analysis, RAD51 foci were not induced by MMC in FA62 cells, but were evident in FA69 and FA104 cells (fig 5), indicating that FA62 is a patient with FAD1. This finding has been recently confirmed by BRCA2 mutational analysis (data not shown).

On the basis of the recent discovery that mutations in *BRIP1* account for the FA-J complementation group, western blot analyses of BRIP1 as well as analyses of BRIP1 foci in cells from patients FA69 and FA104 were conducted.^{12,13} FA69 cells did not generate any band of the expected size in the BRIP1 western blot (fig 3C), and neither generated BRIP1 foci after exposure to MMC (fig 4). This indicates that FA69 and her sibling FA72 are patients with FA-J. Regarding patient FA104, the analysis of the BRIP1 band was not evident in extracts from these cells (fig 3C), although nuclear extracts showed a tiny putative BRIP1 band (not shown). Analyses of BRIP1 foci in FA104 cells were not conclusive, as BRIP1 foci were observed in 10% of these cells after exposure to MMC, thus indicating the necessity of confirming the complementation group of this patient.

Figure 5 shows a detailed description of the progress of the subtyping studies conducted with samples from the 73

Caucasian patients with Fanconi anaemia and the 29 gypsy patients with Fanconi anaemia.

Subtyping of gypsy patients with Fanconi anaemia

A total of 29 gypsy patients with Fanconi anaemia have been identified, which constitute 23% of the 125 patients included in the Spanish registry of Fanconi anaemia. Initially, these patients were subtyped by the standard retroviral analysis, showing that all 10 analysed gypsy patients corresponded to the FA-A complementation group. Thereafter, we observed that patients with Fanconi anaemia corresponding to the gypsy ethnic group shared a mutation in *FANCA* consisting of a novel homozygotic truncating mutation (295C→T) in the fourth exon, which leads to a truncation in *FANCA*.³¹ In fact, 10 out of 10 Spanish gypsy patients (8 of whom had also been analysed by the retroviral complementation method) shared this mutation. Additionally, eight of eight Spanish gypsy patients shared the same genetic haplotype based on four microsatellite markers flanking the *FANCA* gene, and every analysed obligate carrier was heterozygotic for this mutation. On the basis of these observations, patients with Fanconi anaemia from the gypsy race of Spanish origin are now routinely screened by the presence of this ancestral mutation using a simple PCR reaction. Although samples from 17 gypsy patients were not available for subtyping or mutation screening, the fact that all tested patients of the gypsy ethnic group shared the 295C→T ancestral mutation and an identical genetic haplotype allows us

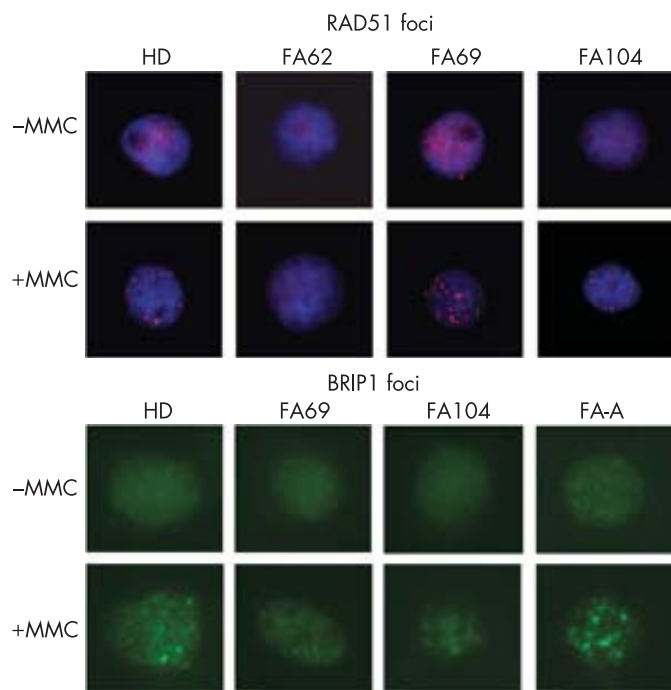


Figure 4 Mitomycin C (MMC) induction of RAD51 and BRIP1 foci in Fanconi anaemia (FA) samples not complemented with *FANCA*, *FANCC* and *FANCG* retroviral vectors. For immunofluorescence analysis of RAD51 and BRIP1 foci, untreated and MMC-treated cells were stained with anti-RAD51 or anti-BRIP1 antibodies, and labelled with an anti-rabbit Alexa antibody, as indicated in the Methods section. RAD51 foci were not observed in cells from patient FA62. BRIP1 foci were not observed in cells from patient FA69 and were reduced in cells from patient FA104 compared with cells from a healthy donor (HD) or a patient with FA-A patient.

to presume that all our 29 gypsy patients belong to the FA-A complementation group.

Distribution of Fanconi anaemia complementation groups in Spain

By means of the different subtyping approaches shown above, we can propose, for the first time, the distribution of complementation groups in Spain (fig 5B). From the 102 samples available from subtyping, 89 patients have been totally subtyped and eight patients partially subtyped. Since the registry of Spanish patients with Fanconi anaemia includes 125 patients, our subtyping study represents 82% of our registry. Figure 5 shows the distribution of the complementation groups in non-related families with Fanconi anaemia. Since all gypsy patients are FA-A, the distribution of the complementation groups in the Caucasian Fanconi anaemia population is slightly modified (fig 5B).

Our study shows the high prevalence of the FA-A subgroup in Spain (80% including the gypsy patients). This observation is mainly a consequence of the absence of FA-C patients and the low prevalence of FA-G complementation groups in Spain, which in other series were around 19% and 15%, respectively.^{1,2} Also, the high proportion of Fanconi anaemia gypsies found in our country (23% of all the Spanish patients with Fanconi anaemia), all sharing an ancestral mutation in *FANCA*, accounts for the high prevalence of the FA-A subtype in Spain.³¹ Also, in Italy and in Tunisia, two other Mediterranean countries, a very high proportion of FA-A patients has been observed.^{32,33} Whether or not common mutations are present in patients with Fanconi anaemia from these countries is still unknown, although this might be the case, since we have detected an insertion in *FANCA* (c3558–3559 insG) in a Spanish

patient previously detected in an Italian patient (data not shown).³⁴

With regard to the frequency of patients with mosaic Fanconi anaemia, we have determined the presence of 14 Caucasian patients corresponding to the FA-A complementation group, with clear evidences of somatic mosaicism in the peripheral blood. This represents 19% of the caucasian patients—proportion that is similar to the 15% value recently reported in other populations with Fanconi anaemia.²³

A proposed approach for the subtyping of patients with Fanconi anaemia

On the basis of the different approaches used in this study, we propose the algorithm shown in fig 6 for the subtyping of patients with Fanconi anaemia. In addition to chromosomal instability studies, the analysis of the MMC sensitivity of peripheral blood T cells is proposed to evaluate whether the subtyping can be conducted in peripheral blood or, alternatively, whether it should be conducted in skin fibroblasts (step 1 in fig 6). Since most patients with Fanconi anaemia distributed along the world are FA-A, FA-C or FA-G (85% on average), most patients with Fanconi anaemia could be subtyped by the transduction of peripheral blood T cells with only three retroviral vectors carrying *FANCA*, *FANCC* and *FANCG* (step 2 in fig 6). Moreover, in Mediterranean countries such as Spain or Italy, the use of a single vector encoding *FANCA* would facilitate the subtyping of a similar proportion of patients. In those cases in which the suspicion of Fanconi anaemia is high, steps 1 and 2 could be conducted in parallel, so that the subtyping of the patient could be obtained in only 2–3 weeks. It is expected that about 15% of the analysed samples would not be complemented by *FANCA*, *FANCC* and *FANCG*. In these patients, the analysis of *FANCD2* by western blot (step 3 in fig 6) would indicate whether the mutated gene is *FANCD2* itself or is upstream or downstream of the ubiquitination of this regulatory protein.²² According to previous studies, it is predicted that 20% of samples not complemented by *FANCA*, *FANCC* and *FANCG* will not present any *FANCD2* band (estimated frequency of *FAD2* patients: 3%).² It is also expected that 40% of these samples will present both bands of *FANCD2* (groups FAD1 and J; estimated frequencies: 2–4% each). Another 40% will only show a single non-ubiquitinated *FANCD2* band (groups FA-B, E, F, I, L and M; total estimated frequency: 6%). According to the information provided by the *FANCD2* western blot, further studies of retroviral complementation, RAD51 or BRIP1 foci formation, cell fusion, immunoprecipitation, mutation screening and so on could be conducted (step 4 in fig 6), aimed at determining the assignment of the patient to a rare complementation group or to a new unidentified group.

Our study constitutes the first systematic subtyping analysis of patients with Fanconi anaemia in Spain, a Mediterranean country with a significant population of gypsy patients. We have observed a skewed distribution of complementation groups in this country with respect to other international studies. Further analyses of mutational screening are in progress to investigate the presence of common mutations in patients from particular regions from this country and to facilitate the prenatal and pre-implantation diagnosis of Fanconi anaemia. It is our hope that the subtyping of this large population of patients with Fanconi anaemia will improve their clinical management and also their recruitment into optimised gene therapy trials with clinical efficacy.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by a grant from the Spanish Ministry of Health for the Cooperative Network on Fanconi Anemia (G03/073). CIEMAT has also been supported by grants from the European

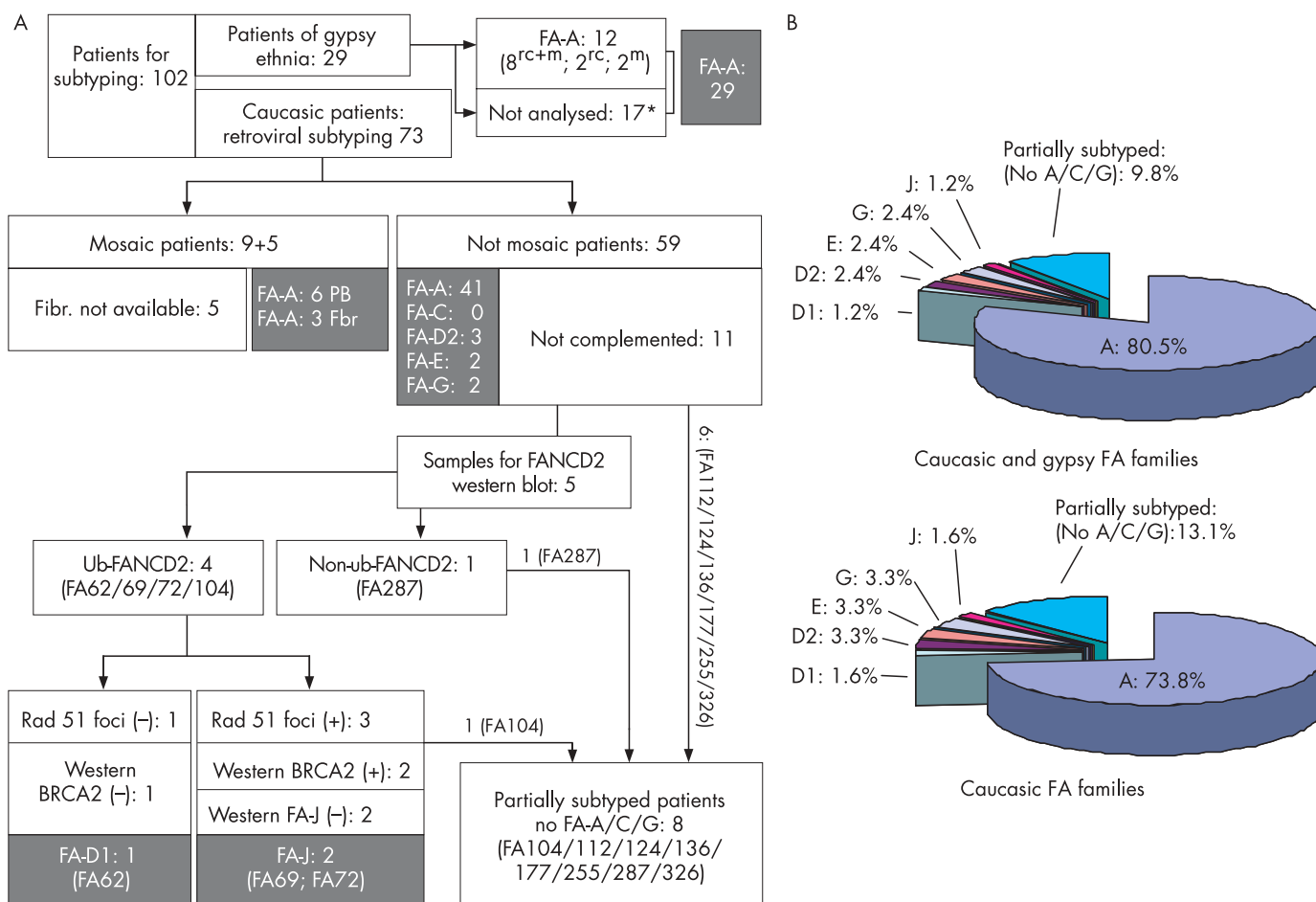


Figure 5 Summarised subtyping studies conducted in patients with Fanconi anaemia from the Spanish registry. (A) Subtyping screening analyses conducted to determine the complementation groups in patients with Fanconi anaemia corresponding to the gypsies ($n = 29$) and the caucasians ($n = 73$). (B) Complementation groups distributed by unrelated families affected by Fanconi anaemia, both in the total ($n = 82$) and in the Caucasian ($n = 61$) populations. Symbols used in the Gypsy populations: ^mSamples analysed for the 295C→T mutation; ^{rc}Samples subjected to retroviral complementation; ^{rc+m}Samples subjected to both analyses. *Considered FA-A patients; see the Results and Discussion section for details.

Programme “Life Sciences, Genomics and Biotechnology for Health” (CONCERT; Ref 005242 and F16R-CT-2003-508842). Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología (SAF2002-03234; 2003-020328; SAF2004-20372E; 2005-00058), Fondo Investigación Sanitaria (PI051205) La Caixa Foundation and the Marcelino Botín Foundation. We thank Sergio García for invaluable help in the subtyping of patients, and Gloria Umbert for cytogenetic analyses. We also thank Mrs Aurora de Lacal, Elena García and M Dolores López for coordination in the delivery of the samples. We are indebted to the Spanish patients and their families, always enthusiastic for promoting the research on Fanconi anaemia.

Authors’ affiliations

José Antonio Casado, Elsa Callén, Ariana Jacome, Paula Río, María Castella, Teresa Ferro, Arturo Muñoz, Julián Sevilla, Ángeles Cantalejo, Elena Cela, José Cervera, Jesús Sánchez-Calero, Isabel Badell, Jesús Estella, Ángeles Dasí, Teresa Olivé, Juan José Ortega, Antonia Rodríguez-Villa, María Tapia, Antonio Molinés, Luis Madero, José C Segovia, Jordi Surrallés, Juan A Bueren, Spanish Fanconi Anemia Research Network, Madrid, Spain

Stephan Lobitz, Helmut Hanenberg, Department of Pediatric Oncology, Hematology and Immunology, Children’s Hospital, Düsseldorf, Germany
Kornelia Neveling, Reinhard Kalb, Detlev Schindler, Department of Human Genetics, University of Würzburg, Würzburg, Germany

Competing interests: None declared.

REFERENCES

- 1 Taniguchi T, D’Andrea AD. The molecular pathogenesis of Fanconi anemia: recent progress. *Blood* 2006;**107**:4223–33.
- 2 Levitus M, Roomians MA, Steltenpool J, Cool NF, Oostra AB, Mathew CG, Hoatlin ME, Waisfisz Q, Arwert F, de Winter JP, Joenje H. Heterogeneity in Fanconi anemia: evidence for 2 new genetic subtypes. *Blood* 2004;**103**:2498–503.
- 3 Meetei AR, Medhurst AL, Ling C, Xue Y, Singh TR, Bier P, Steltenpool J, Stone S, Dokal I, Mathew CG, Hoatlin M, Joenje H, de Winter JP, Wang W. A human ortholog of archaean DNA repair protein Hef is defective in Fanconi anemia complementation group M. *Nat Genet* 2005;**37**:958–63.
- 4 Lo Ten Foe JR, Roomians MA, Bosnoyan-Collins L, Alon N, Wijker M, Parker L, Lightfoot J, Carreau M, Callen DF, Savoia A, Cheng NC, van Berkel CG, Strunk MH, Gille JJ, Pals G, Kruyt FA, Pronk JC, Arwert F, Buchwald M, Joenje H. Expression cloning of a cDNA for the major Fanconi anemia gene, FAA. *Nat Genet* 1996;**14**:320–3.
- 5 Meetei AR, Levitus M, Xue Y, Medhurst AL, Zwaan M, Ling C, Roomians 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;**36**:1219–24.
- 6 Strathdee CA, Gavish H, Shannon WR, Buchwald M. Cloning of cDNAs for Fanconi’s anaemia by functional complementation. *Nature* 1992;**356**:763–7.
- 7 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* 2002;**297**:606–9.
- 8 Timmers C, Taniguchi T, Hejna J, Reifsteck C, Lucas L, Bruun D, Thayer M, Cox B, Olson S, D’Andrea AD, Moses R, Grompe M. Positional cloning of a novel Fanconi anemia gene, FANCD2. *Mol Cell* 2001;**7**:241–8.
- 9 de Winter JP, Leveille F, van Berkel CG, Roomians MA, van Der Weel L, Steltenpool J, Demuth I, Morgan NV, Alon N, Bosnoyan-Collins L, Lightfoot J, Leegwater PA, Waisfisz Q, Komatsu K, Arwert F, Pronk JC, Mathew CG, Digweed M, Buchwald M, Joenje H. Isolation of a cDNA representing the Fanconi anemia complementation group E gene. *Am J Hum Genet* 2000;**67**:1306–8.
- 10 de Winter JP, Roomians MA, van Der Weel L, van Berkel CG, Alon N, Bosnoyan-Collins L, de Groot J, Zhi Y, Waisfisz Q, Pronk JC, Arwert F, Mathew CG, Scheper RJ, Hoatlin ME, Buchwald M, Joenje H. The Fanconi anemia gene

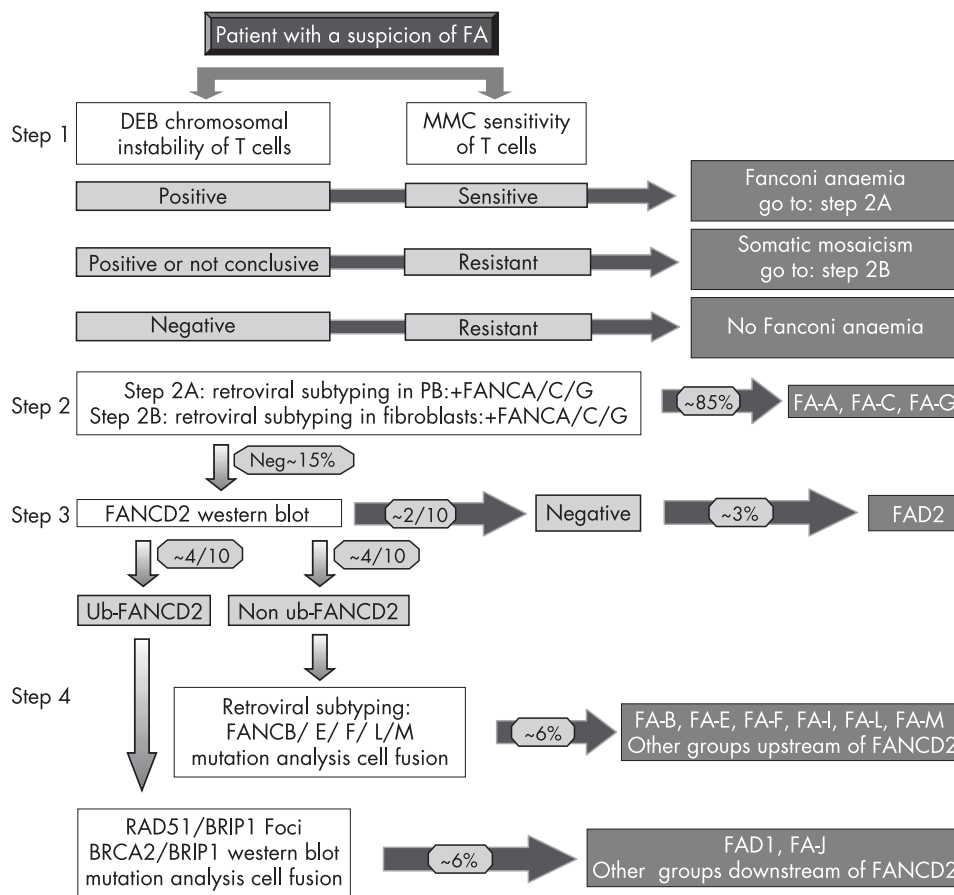


Figure 6 Proposed algorithm for the subtyping of patients with Fanconi anaemia (FA). A four-step process is proposed for the subtyping of patients with Fanconi anaemia. Step 1 aims to confirm the diagnosis of Fanconi anaemia and somatic mosaicism. According to step 2, 85% of patients with Fanconi anaemia would be subtyped by retroviral complementation. The complementation groups of the remaining 15% of the patients could be discriminated by means of analyses shown in step 3. Finally, the subtype of rare complementation groups or the discovery of new complementation groups could be determined by means of different research approaches described in step 4. DEB, diepoxybutane; MMC, mitomycin C; PB, peripheral blood; Ub, ubiquitinated.

- FANCF encodes a novel protein with homology to ROM. *Nat Genet* 2000;**24**:15–16.
- 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* 1998;**20**:281–3.
 - Levrano O, Attwooll C, Henry RT, Milton KL, Neveling K, Rio P, Batish SD, Kalb R, Velleuer E, Barral S, Ott J, Petrini J, Schindler D, Hanenberg H, Auerbach AD. The BRCA1-interacting helicase BRIP1 is deficient in Fanconi anaemia. *Nat Genet* 2005;**37**:931–3.
 - Levitus M, Waisfisz Q, Godthelp BC, de Vries Y, Hussain S, Wiegant WW, Elghalbzouri-Maghrani E, Steltenpool J, Rooimans MA, Pals G, Arwert F, Mathew CG, Zdzienicka MZ, Hiom K, de Winter JP, Joenje H. The DNA helicase BRIP1 is defective in Fanconi anemia complementation group J. *Nat Genet* 2005;**37**:934–5.
 - 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* 2003;**35**:165–70.
 - 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* 2001;**7**:249–62.
 - Surrallés J, Jackson SP, Jasin M, Kastan MB, West SC, Joenje H. Molecular cross-talk among chromosome fragility syndromes. *Genes Dev* 2004;**18**:1359–70.
 - Shimamura A, D'Andrea AD. Subtyping of Fanconi anemia patients: implications for clinical management. *Blood* 2003;**102**:3459.
 - 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* 1995;**378**:789–92.
 - 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, Gibson RA, Gluckman E, Arwert F, Joenje H, Savoia A, Hoehn H, Pronk JC, CG Mathew, et al. Heterogeneous spectrum of mutations in the Fanconi anaemia group A gene. *Eur J Hum Genet* 1999;**7**:52–9.
 - 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. Phenotypic correction of primary Fanconi anemia T cells with retroviral vectors as a diagnostic tool. *Exp Hematol* 2002;**30**:410–20.
 - Chandra S, Levrano O, Jurickova I, Maas C, Kapur R, Schindler D, Henry R, Milton K, Batish SD, Cancelas JA, Hanenberg H, Auerbach AD, Williams DA. A rapid method for retrovirus-mediated identification of complementation groups in Fanconi anemia patients. *Mol Ther* 2005;**12**:976–84.
 - Shimamura A, Montes de Oca R, Svenson JL, Haining N, Moreau LA, Nathan DG, D'Andrea AD. A novel diagnostic screen for defects in the Fanconi anemia pathway. *Blood* 2002;**100**:4649–54.
 - Soulier J, Leblanc T, Larghero J, Dastot H, Shimamura A, Guardiola P, Esperou H, Ferry C, Jubert C, Feugeas JP, Henri A, Toubert A, Socie G, Baruchel A, Sigaux F, D'Andrea AD, Gluckman E. Detection of somatic mosaicism and classification of Fanconi anemia patients by analysis of the FA/BRCA pathway. *Blood* 2005;**105**:1329–36.
 - Godthelp BC, Wiegant WW, Waisfisz Q, Medhurst AL, Arwert F, Joenje H, Zdzienicka MZ. Inducibility of nuclear Rad51 foci after DNA damage distinguishes all Fanconi anemia complementation groups from D1/BRCA2. *Mutat Res* 2006;**594**:39–48.
 - Hajjiof S, McKee M. The health of the Roma people: a review of the published literature. *J Epidemiol Community Health* 2000;**54**:864–9.
 - Auerbach AD, Rogatko A, Schroeder-Kurth TM. International Fanconi Anemia Registry: relation of clinical symptoms to diepoxybutane sensitivity. *Blood* 1989;**73**:391–6.
 - Jacome A, Navarro S, Casado JA, Rio P, Madero L, Estella J, Sevilla J, Badell I, Ortega JJ, Olive T, Hanenberg H, Segovia JC, Bueren JA. A simplified approach to improve the efficiency and safety of ex vivo hematopoietic gene therapy in Fanconi anemia patients. *Hum Gene Ther* 2006;**17**:245–50.
 - Auerbach AD, Rogatko A, Schroeder-Kurth TM. International Fanconi Anemia Registry (IFAR): first report. In: Schroeder-Kurth TM, Auerbach AD, Obe G, eds. *Fanconi anemia, clinical and experimental aspects*. Heidelberg: Springer-Verlag, 1989:3–17.
 - Gregory JJ Jr, Wagner JE, Verlander PC, Levrano 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 U S A* 2001;**98**:2532–7.
- 30 **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* 2002;**98**:126–35.
- 31 **Callen E**, Casado JA, Tischkowitz MD, Bueren JA, Creus A, Marcos R, Dasi A, Estella JM, Munoz A, Ortega JJ, de Winter J, Joenje H, Schindler D, Hanenberg H, Hodgson SV, Mathew CG, Surralles J. A common founder mutation in FANCA underlies the world highest prevalence of Fanconi anemia in gypsy families from Spain. *Blood* 2005;**105**:1946–9.
- 32 **Savoia A**, Zatterale A, Del Principe D, Joenje H. Fanconi anaemia in Italy: high prevalence of complementation group A in two geographic clusters. *Hum Genet* 1996;**97**:599–603.
- 33 **Bouchlaka C**, Abdelhak S, Amouri A, Ben Abid H, Hadji S, Frikha M, Ben Othman T, Amri F, Ayadi H, Hachicha M, Rebai A, Saad A, Dellagi K, Tunisian Fanconi Anemia Study Group. Fanconi anemia in Tunisia: high prevalence of group A and identification of new FANCA mutations. *J Hum Genet* 2003;**48**:352–61.
- 34 **Savino M**, Lanzano 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* 1997;**61**:1246–53.

