



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**POSGRADO EN CIENCIAS
BIOLÓGICAS**

FACULTAD DE MEDICINA

**DETECCIÓN DE LA EXPRESIÓN DE GENES RELACIONADOS
CON LA VIGILANCIA DE LA INTEGRIDAD GENÓMICA EN
CÉLULAS DE ANEMIA DE FANCONI**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
DOCTORA EN CIENCIAS**

P R E S E N T A

ANGÉLICA GRACIELA MARTÍNEZ HERNÁNDEZ

DIRECTORA DE TESIS: DRA. SARA FRÍAS VÁZQUEZ

MÉXICO, D.F.

AGOSTO, 2008



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS

Al posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada de doctorado

A los miembros del comité tutorial:

Dra. Sara Frias Vázquez

Dra. A. Roció Ortiz Muñiz

Dr. Mario A. Altamirano Lozano.

I am grateful to Mathew Coleman for his excellent mentoring and the Coleman's group (Francesca, Marie, Felicia, Jenny) for their help during my time there

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Citogenética del departamento de Investigación en Genética Humana, Instituto Nacional de Pediatría, México DF y en el Lawrence Livermore National Laboratory, Chemicals, Materials, Earth and Life Sciences Directorate, Livermore California, USA. Fue parcialmente financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONACYT 44389 y por el Departamento de Energía de la Universidad de California, Lawrence Livermore National Laboratory No. W-7405-Eng-48

INDICE

| | Páginas |
|--|---------|
| Resumen | 4 |
| Abstract | 6 |
| 1. Introducción | |
| 1.1 Características clínicas de la anemia de Fanconi | 8 |
| 1.2 Características celulares | 10 |
| 1.3 Grupos de complementación | 16 |
| 1.4 Complejo AF | 17 |
| 1.5 <i>TP53</i> | 20 |
| 1.6 Anemia de Fanconi y <i>TP53</i> | 25 |
| 1.7 Hidroxiurea (HU) | 28 |
| 1.8 Mitomicina C (MMC) | 31 |
| 2. Justificación | 33 |
| 3. Hipótesis | 34 |
| 4. Objetivos | 34 |
| 5. Tipo de estudio | 34 |
| 6. Material y Métodos | 35 |
| 7. Resultados | 40 |
| 8. Discusión y conclusiones | 50 |
| 9. Anexo | 60 |
| 10. Referencias | 67 |

ABREVIATURAS

| | |
|--------|--|
| AC | Aberraciones cromosómicas |
| ADN | Acido desoxirribonucleico |
| AF | Anemia de Fanconi |
| BER | Reparación por escisión de bases |
| CC | Ciclo celular |
| DBD | Domino de unión al ADN de P53 |
| DEB | Diepoxibutano |
| dNTPs | Mezcla de los cuatro 2-desoxirribonucleótidos |
| DNasa | Enzima que degrada al ADN |
| DSB | Rupturas de doble hebra en el ADN |
| HU | Hidroxiurea |
| KCL | Cloruro de Potasio |
| MMC | Mitomicina C |
| MMR | Reparación por mal apareamiento |
| NADPH | Fosfato de dinucleótido de nicotinamida y adenina reducido |
| NE | Niveles de expresión |
| NER | Reparación por escisión de nucleótidos |
| NHEJ | Reparación por reunión de extremos no homólogos |
| PCR | Reacción en cadena de la polimerasa |
| RI | Radiación ionizante |
| RH | Recombinación homologa |
| RNA | Acido ribonucleico |
| mRNA | RNA mensajero |
| RNR | Ribonucleótido reductasa |
| ROS | Especies reactivas de oxigeno |
| RT-PCR | Reverso transcripción acoplada a PCR |
| rNTPs | Ribonucleotidos |
| ssDNA | Cadenas sencillas del ADN |
| SOD | Superóxido dismutasa |

RESUMEN

TAD Dominio de transactivación de P53

TBP Proteína de unión a caja TATA

TLS Síntesis de translesiones

TP53 Gen supresor de tumor P53

UV Radiación ultravioleta

VEB Virus Epstein Barr

XP Xeroderma Pigmentosum

casiva, o ligada al X dependiendo el grupo de complemento en todas las razas y grupos étnicos con una frecuencia de heterocigotos de 0.3 – 1% y de homocigotos, de 1/100 000 a 1/300,000. Las células de estos pacientes presentan incremento en mutaciones espontáneas, hipersensibilidad a agentes físicos, químicos y predisposición al desarrollo de neoplasias. La AF presenta heterogeneidad genética, con 13 grupos de complementación: AF-A, B, C, D1 (BRCA2), D2, E, F, G, I, J(BRIP1), L(PHF9), M y N (PALB2), de los cuales los más comunes son el grupo A con el 66% de la población de pacientes AF, seguido de los grupos C y G, con el 9.5% y 8.7% de los individuos, respectivamente. Independientemente del gen afectado, todos los pacientes tienen fenotipos clínicos y celulares similares, por lo que se deduce que los productos génicos forman parte de una sola vía celular desconocida e involucrada en el mantenimiento de la integridad genómica. El gen supresor de tumor (TP53), actúa como factor de transcripción para alrededor de más de 100 genes involucrados en reparación y replicación del ADN, ciclo celular, senescencia y apoptosis. En estudios recientes realizados en modelos de ratones y "zebrafish" se ha demostrado que las proteínas de AF funcionan cooperativamente con TP53 con la finalidad de mantener la estabilidad genómica y debido a que se ha demostrado que las células AF son sensibles a la hidroxurea (HU) e induce un incremento de aberraciones cromosómicas; es probable que la hidroxurea participe en una vía diferente a la que despiertan los agentes alquilantes, tales como la mitomicina c (MMC), por lo que conocer la respuesta de genes que participan en la principal vía de vigilancia del genoma (P53), proporcionará valiosa información sobre el mecanismo de acción de la hidroxurea. En este trabajo se analizó el daño cromosómico y los niveles de expresión de 21 genes relacionados y no relacionados con P53 en líneas linfoblastoides de AF del grupo de complementación A expuesta a MMC e HU, por medio del análisis de aberraciones cromosómicas y por RT-PCR en tiempo real.

RESUMEN

La Anemia de Fanconi (AF) es un padecimiento raro que se hereda de forma recesiva, ya sea autosómica o ligada al X dependiendo el grupo de complementación. La AF se presenta en todas las razas y grupos étnicos con una frecuencia estimada de heterocigotos de 0.3 – 1% y de homocigotos, de 1/100 000 a 1/300,000 nacidos vivos; las células de estos pacientes presentan incremento en la frecuencia de aberraciones cromosómicas espontáneas, hipersensibilidad a agentes físicos, químicos y predisposición al desarrollo de neoplasias. La AF presenta heterogeneidad genética, con 13 grupos de complementación: AF-A, B, C, D1 (BRCA2), D2, E, F, G, I, J(BRIP1), L(PHF9), M y N (PALB2), de los cuales los más comunes son el grupo A con el 66% de la población de pacientes AF, seguido de los grupos C y G, con el 9.5% y 8.7% de los individuos, respectivamente. Independientemente del gen afectado, todos los pacientes tienen fenotipos clínicos y celulares similares, por lo que se deduce que los productos génicos forman parte de una sola vía celular desconocida e involucrada en el mantenimiento de la integridad genómica. El gen supresor de tumor (*TP53*), actúa como factor de transcripción para alrededor de más de 100 genes involucrados en reparación y replicación del ADN, ciclo celular, senescencia y apoptosis. En estudios recientes realizados en modelos de ratones y “zebrafish” se ha demostrado que las proteínas de AF funcionan cooperativamente con *TP53* con la finalidad de mantener la estabilidad genómica y debido a que se ha demostrado que las células AF son sensibles a la hidroxiaurea (HU) e induce un incremento de aberraciones cromosómicas; es probable que la hidroxiaurea participe en una vía diferente a la que despiertan los agentes alquilantes, tales como la mitomicina c (MMC), por lo que conocer la respuesta de genes que participan en la principal vía de vigilancia del genoma (*P53*), proporcionará valiosa información sobre el mecanismo de acción de la hidroxiaurea. En este trabajo se analizó el daño cromosómico y los niveles de expresión de 21 genes relacionados y no relacionados con *P53* en líneas linfoblastoides de AF del grupo de complementación A expuesta a MMC e HU, por medio del análisis de aberraciones cromosómicas y por RT-PCR en tiempo real.

El tratamiento con MMC en las células AF-A indujo un incremento de las aberraciones cromosómicas y un incremento en los niveles de transcripción de TP53 y 7 genes regulados por *TP53* relacionados con ciclo celular, respuesta a estrés, replicación del ADN y apoptosis. Después de la exposición a HU, las células AF-A mostraron un incremento en las aberraciones cromosómicas y en la expresión de 9 genes directamente relacionados con *TP53* (*CDKN1A*, *DDB2*, *GADD45A*, *MDM2*, *PCNA*, *SGK*, *TNFRSF10B*, *TRIAP1* y *XPC*) y de un gene no relacionado con *TP53* (*NFKB1A*), posiblemente con la finalidad de detener a las células en G_1 y G_2 , identificar e iniciar la reparación o iniciar apoptosis. Es interesante observar que la exposición de las células AF-A a los dos agentes (MMC+HU) incrementó 24 veces la frecuencia de aberraciones cromosómicas e indujo la expresión de genes que detectan daño cromosómico o participan en ciclo celular y reparación del ADN, sin embargo debido a que la célula es incapaz de reparar este daño, induce mecanismos de apoptosis con la finalidad de eliminar a las células con daño. Estos resultados muestran una conexión entre la vía AF y la activación de *TP53* en respuesta a un daño al ADN.

Palabras clave: anemia de Fanconi, hidroxiurea, mitomicina C, *TP53*, ciclo celular, reparación y apoptosis.

ABSTRACT

Fanconi anemia (FA) is a rare, heritable chromosomal instability disease characterized by several congenital defects and cancer predisposition. Functional interactions between specific FA proteins and DNA damage response and repair activities have been reported, but the interplay between these mechanisms for maintaining genomic stability are not well understood. Many DNA damage response proteins are transcriptionally regulated by the tumor suppressor protein p53 (TP53), suggesting an important regulatory role for the DNA damage and stress response pathway. To better understand the association between FA and the DNA damage stress response we analyzed the levels of chromosomal damage and damage mediated gene transcription responses in lymphoblastoid cells derived from normal individuals and patients carrying the most common FA complementation group (FA-A). Chromosomal aberrations were first measured after exposure to mitomycin C (MMC) or hydroxyurea (HU). Aliquots of the same cell were then assayed for the transcriptional response of 21 DNA damage and stress response genes using quantitative real-time PCR. The FA-A lymphoblastoid cells showed significant increases in the frequency of chromosome aberrations relative to non-FA-A lymphoblastoid lines after MMC treatment. The MMC induced damage was correlated with a general increase in expression of *TP53*-modulated DNA damage stress response genes involved in processes such as DNA repair, cell cycle progression, and apoptosis. Following HU treatment FA cells showed an increased of CAs with much less transcriptional differences between targeted genes. Overall, the differences between the normal and FA-A cells after genotoxic treatments imply an increased activation and reliance of FA cells on the down-stream activities of *TP53* for prevention of cell killing and chromosome damage from interstrand crosslinks but not for general replication arrest and double strand breaks. Furthermore, these results imply a regulatory connection between the FA pathway and activation of TP53 for responding to DNA damage.

Keywords: Fanconi Anemia, Hydroxyurea, Mitomycin C, *TP53*, Gene expression, Cell cycle, reparation and apoptosis.

1. INTRODUCCION

1.1 Características clínicas de la Anemia de Fanconi (AF).

La AF fue descrita por primera vez en 1927 por Guido Fanconi, se presenta en todas las razas y grupos étnicos con una frecuencia de 1 en 100,000 nacidos vivos^{1,2} y una proporción entre hombres y mujeres de 3:1³. La forma de herencia es recesiva, ya sea autosómica o ligada al X^{4,5}. La AF presenta heterogeneidad genética y hasta la fecha, se conocen trece grupos de complementación, denominados AF- A-N⁶.

Los pacientes AF presentan: Retraso en el desarrollo pre y post natal, malformaciones esqueléticas (ausencia o malformación de radio y pulgar) (Figura 1), alteraciones en la pigmentación de la piel (hiper e hipo pigmentación), facies características (cabeza, ojos y boca pequeños) hipogonadismo y fertilidad disminuida. Otros sistemas afectados son el sistema cardiaco, gastrointestinal y renal^{1,2}.



Figura 1. Malformaciones de pulgar observada en pacientes con anemia de Fanconi.

La presencia de pancitopenia, debido a una falla en la medula ósea en la primera década de la vida (3-7 años) es una característica importante en AF. Los pacientes tienen un elevado riesgo de desarrollar leucemia mieloide (94%) y linfocítica (4%) con un promedio de esperanza de vida de 20 años. En el 40% de los casos también se ha observado, el desarrollo de carcinomas de células escamosas de cabeza, cuello, vulva y cérvix^{2,7,8}.

Existen algunas correlaciones entre el grupo de complementación o el tipo de mutación con la severidad del fenotipo clínico AF. Respecto al grupo de complementación, los individuos que pertenecen a los grupos A,B,C,E,F,G,I,L y M tienen el fenotipo clásico de la enfermedad, mientras que los individuos del grupo de complementación D1, presentan antes de los 5 años de edad anomalías congénitas severas y leucemia aguda mieloide, así como tumores sólidos, tales como Wilms o meduloblastoma⁹. El incremento en el riesgo de desarrollar cáncer en los pacientes AF, es una característica importante de la enfermedad, estudios en pacientes con mutaciones heterocigotas en *BRCA1* o *BRCA2/FANCD1* han revelado, que estos individuos, tienen 82% de riesgo de desarrollar cáncer de mama y 54% y 23% de presentar cáncer de ovario, respectivamente. También se ha observado que los pacientes con mutaciones en *FANCD1* (*BRIP1*) presentan cáncer de mama tardíamente¹⁰. Por otro lado, se ha reportado que, en los judíos Ashkenazi, la mutación IVS4+4A>T en *FANCC* está asociada con la aparición temprana de las características hematológicas, severas malformaciones congénitas y pobre supervivencia del individuo, por el contrario, la misma mutación, en la población japonesa presenta características clínicas moderadas; lo que ha sugerido, que genes modificadores o factores ambientales pueden contribuir al fenotipo de la enfermedad¹⁰.

1.2 Características celulares.

a) Ciclo celular (cc)

Las células AF tienen alterado el punto de restricción en la fase S. En condiciones normales, las células detienen su paso por la fase S, con el fin de reparar diferentes tipos de lesiones en el ADN. En el caso de las células AF, se ha demostrado, que el punto de restricción de la fase S está alterado, ya que en presencia de un enlace cruzado, las células continúan replicándose y horas más tarde, la síntesis del ADN se bloquea parcialmente, lo que conduce a la acumulación de gaps y rupturas en las hebras del ADN¹¹. Adicionalmente, también se ha demostrado que en linfocitos AF estimulados con fitohemaglutinina, agentes tales como la mitomicina C (MMC) y la hidroxiurea (HU) inhiben significativamente la síntesis del ADN en relación a linfocitos provenientes de individuos normales¹².

Respecto a la fase G₂ del cc, las células AF tienen esta fase más larga en comparación a las células normales. La duración de esta fase, en el primer ciclo de linfocitos AF estimulados con fitohemaglutinina es de 10.7 horas en comparación con 5.2 horas en las células normales¹³. Este alargamiento es aun más evidente, cuando las células se exponen a agentes alquilantes tales como la MMC, DEB (diepoxibutano) o cisplatino, lo que sugiere que la acumulación de las células en G₂ y el alargamiento de la fase, es una respuesta al daño excesivo en el ADN, con la finalidad de intentar reparar las lesiones^{11,13,14}. Esto contrasta con la fase G₁, en donde se ha demostrado que es más corta, con una duración aproximada de 3.7 horas en comparación a 6.1 horas de las células normales¹³.

b) Proliferación y diferenciación celular

En relación a la proliferación y diferenciación celular, se ha observado que las células AF tienen una baja producción de Interleucina 6 (IL-6). La IL-6 es una citocina que aumenta la proliferación y diferenciación de las células B y T; y en sinergismo con la interleucina 3 (IL-3), la IL-6 incrementa la proliferación de las células progenitoras hematopoyéticas. Rosselli y cols (1992), demostraron, que la adición de IL-6 a células AF previamente dañadas con MMC induce una resistencia a la toxicidad de manera

dosis dependiente, observándose un aumento en la viabilidad de las células, sugiriendo que la pancitopenia presente en los pacientes AF, puede ser el resultado de la reducción de los niveles de IL-6¹⁵.

Otra citocina alterada en AF, es el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α). En condiciones normales, TNF- α incrementa los niveles de O₂ intra y extracelular e induce rupturas en el ADN y muerte celular. En linfocitos de individuos normales, el tratamiento con TNF- α , induce un ligero incremento de intercambio de cromátidas hermanas y un retraso en la progresión del cc a expensas de la fase G₂, por lo que, niveles alterados de TNF- α pueden tener efectos patológicos en el organismo¹⁶. En 1994, Rosselli y cols, demostraron, que linfoblastos AF de los grupos de complementación A, B, C, y D, presentan un incremento en los niveles TNF- α y que la adición de IL-6 y anti TNF- α a los cultivos, induce una corrección parcial del efecto clastogénico de la MMC¹⁶ y también se ha observado, que el TNF- α induce la expresión de dos genes de AF, *FANCG* y *FANCA* lo que sugiere una asociación entre las proteínas AF y la muerte celular^{17,18}.

Otra característica importante en las células AF es la falla a nivel de la medula ósea, lo que condiciona la pancitopenia en estos pacientes. Diversos estudios han demostrado que el daño a nivel de medula ósea es producto de la reducción de la proliferación del linaje eritroide y de las células progenitoras de los granulocitos-macrófagos en los cuales el factor de necrosis tumoral está estrechamente implicado^{13,19}.

c) Hipersensibilidad a agentes químicos y físicos

Las células AF tienen como característica principal, la hipersensibilidad a agentes que inducen enlaces cruzados inter e intracatenarios en las hebras del ADN, tales como la MMC y el cisplatino²⁰. Los enlaces cruzados intercatenarios, se unen covalentemente a las dos hebras del ADN e impiden la separación de las hebras afectando los procesos de replicación y transcripción y son potentes inductores de rupturas de doble hebra (DSB) durante la fase S del cc, como consecuencia del colapso de la horquilla

de replicación²¹. Las células AF también son sensibles a otros agentes que inducen DSB tales como la radiación ionizante y los rayos X^{2,22}.

En condiciones normales, el daño inducido en el ADN por los agentes inductores de enlaces cruzados (MMC o cisplatino), es reparado durante la fase S del cc mediante recombinación homologa (RH), lo que ha sugerido, que las células AF tienen alterado este tipo de reparación^{21,23,24}. Adicionalmente, se ha demostrado que uno de los genes de AF (*FANCD1* o *BRCA2*) juega un papel importante en el mecanismo de reparación RH, ya que, estabiliza la horquilla de replicación, facilita la formación de filamentos de nucleoproteína durante la invasión de las hebras²⁴, se une al ADN específicamente a los extremos de doble hebra y a las uniones Holliday durante la HR²⁵, con lo que es posible relacionar estrechamente a la vía celular AF y la reparación por RH.

Recientemente, se ha propuesto, que la vía AF está involucrada en el mecanismo de síntesis de translesiones (TLS) en respuesta a un daño en el ADN de manera espontánea o inducida, sin embargo, la manera precisa del funcionamiento de las proteínas AF en esta vía, aun permanece desconocido⁹.

d) Apoptosis y sensibilidad al oxígeno

La apoptosis es el resultado de señales de muerte celular producida por una gran variedad de estímulos tanto endógenos, como exógenos. Es un mecanismo esencial para el mantenimiento de la homeostasis en todos los organismo multicelulares y se encuentra activo durante la diferenciación celular en respuesta a factores de crecimiento o a la exposición de agentes genotóxicos. En condiciones normales, si la célula entra en apoptosis, se inducen una serie de señales que promueven la degradación de las proteínas, la fragmentación del ADN y cambios en la membrana celular^{26,27}. En relación a este proceso, diversos estudios han mostrado, que los mecanismos que regulan la apoptosis están alterados en AF. Ridet y cols (1997), demostraron en células en cultivo, que los niveles espontáneos de apoptosis están aumentados en comparación a las células normales y cuando las células fueron

tratadas con rayos gama, se observó una aparente radioresistencia de las células AF ya que un menor número de ellas sufrieron apoptosis²⁶.

En contraste, los estudios con MMC han demostrado, que las células AF incrementan significativamente la apoptosis y aunque no presentan el mecanismo clásico de muerte celular apoptótica, es decir, no hay la formación de cuerpos apoptóticos, no existe activación de la caspasa-3, no se lleva a cabo el clivaje de PARP (Poly(ADP-ribose) polymerase), biomarcador utilizado para medir la apoptosis y la fragmentación del ADN no es oligonucleosomal. Las características antes mencionadas han sido reportadas en procesos necróticos y no apoptóticos, lo cual ha sido observado en estudios con radiación gamma, donde se observó que después de un tratamiento con este agente, las células AF presentan procesos necróticos-inflamatorios^{26,27,28}. La apoptosis se coordina por la liberación de factores pro-apoptóticos por la mitocondria, lo que sugiere, que las anormalidades antes mencionadas en apoptosis que presentan las células AF son inducidas por el daño estructural y funcional en las mitocondrias²⁸.

Respecto a la sensibilidad del oxígeno, las células AF son más sensibles al O₂, manifestándose como un incremento significativo en las aberraciones cromosómicas (AC) después de la exposición a elevadas concentraciones de oxígeno de manera dosis dependiente y un retraso en la fase G₂ del cc^{2,29}. Yoshimitsu K y cols (1984), sugirieron que las células AF presentan una sensibilidad a los radicales libres producidos por el metabolismo del oxígeno, la cual no es atribuida a un daño en la enzima superóxido dismutasa (SOD), ya que en este trabajo los autores demostraron que los niveles de la enzima fueron normales³⁰. En otro estudio realizado en fibroblastos AF, también se observó que otras enzimas, tales como, la catalasa, la glutatión reductasa, la hidropéroxido fosfolípido y la glutatión peroxidasa se encuentran normales³¹.

Estudios recientes han demostrado que dos de las proteínas AF interactúan con proteínas involucradas en el metabolismo redox. FANCC interacciona con diversas proteínas citoplasmáticas, tales como GSTP1 y algunas chaperonas como GRP94 y

HSP70 y FANCG interactúa con CYP2E1, la cual está asociada con la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y la bioactivación de carcinógenos, confiriendo un posible papel de FANCG en la protección contra el daño oxidativo, lo que ha permitido sugerir una directa asociación del estrés oxidativo con el defecto primario en AF³¹.

e) Inestabilidad cromosómica.

Las células AF, presentan inestabilidad cromosómica espontánea e inducida con agentes alquilantes tales como la MMC, el DEB y el cisplatino, los cuales se unen de una manera covalente a las hebras del ADN e inducen un bloqueo de la transcripción y la replicación. La frecuencia espontánea de AC en células de pacientes AF es de 0.3 aberraciones por célula, a diferencia de los observado en células de pacientes normales (0.04 aberraciones por célula)³². Estudios en linfocitos T estimulados han mostrado que más del 50% de los linfocitos presentan de 1 a 3 aberraciones por célula, siendo las más frecuentes las rupturas cromosómicas, cromatídicas y figuras radiales. Este daño cromosómico espontáneo es posiblemente originado por una detención espontánea y retraso de la fase S tardía y/o G₂ del cc, características observadas en las células AF² (Figura 2).

La inestabilidad cromosómica, es aun más evidente cuando las células son expuesta a agentes alquilantes, siendo esta respuesta una característica patognomónica de AF y se utiliza actualmente como prueba diagnóstica de la enfermedad. El tipo de AC más frecuentes que se observan en células AF tratadas con MMC o DEB son las rupturas cromatídicas, cromosómicas y figuras radiales (tri-radios y tetra-radios) y con menor frecuencia, translocaciones, cromosomas en anillo, cromosomas dicéntricos y fragmentos^{32,33}(Figura 2).

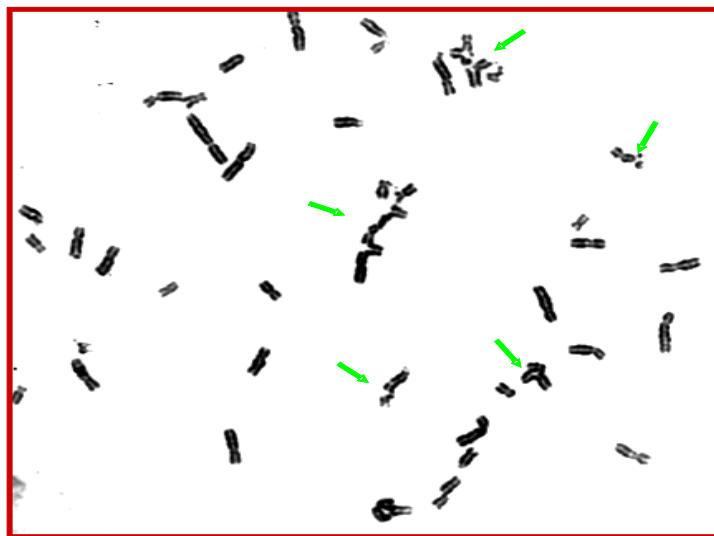
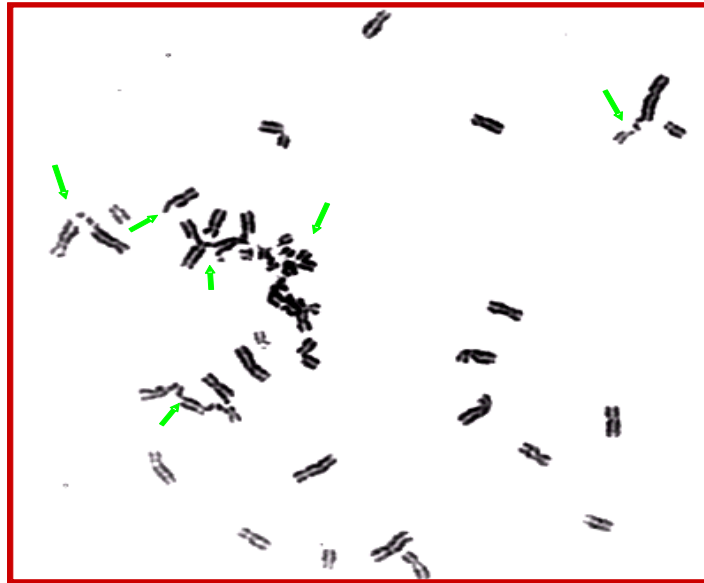


Figura 2. Metafasas de un paciente con anemia de Fanconi. Las flechas indican las aberraciones cromosómicas típicas de las células AF, tales como, rupturas cromatídicas, cromosómicas y figuras radiales.

1.3 Grupos de complementación.

La AF es una enfermedad que presenta heterogeneidad genética y hasta la fecha, se conocen trece grupos de complementación, denominados AF A-N^{6,34}. Los genes mutados, se han identificado por una gran variedad de métodos, entre los que se pueden mencionar, estrategia posicional (*FANCD2*, *FANCI*), expresión y complementación clonal (*FANCA*, *FANCC*, *FANCE*, *FANCF*, *FANCG*), purificación bioquímica (*FANCB*, *FANCL*, *FANCM*), gen candidato (*FANCD1*, *FANCI*) y espectrometría de masas e inmunoprecipitación (*FANCM*)^{6,34}. Los grupos de complementación más frecuentes son el AF-A (*FANCA*), con el 66% de la población, seguido del AF-C (*FANCC*) con el 9.5% y el AF-G (*FANCG/XRCC9*) con el 8.7% del total de los pacientes, los grupos AF-B (*FAAP95*) D1 (*BRCA2*), D2 (*FANCD2*), E (*FANCE*) y F (*FANCF*) son menos del 4% y los grupos AF-I (*FANCI*), J (*FANCI*), L (*FANCL*), <2%⁸. Los grupos M (*FANCM*) y N (*FANCM*) se acaban de descubrir, por lo que todavía no existe una frecuencia reportada (Figura 3).

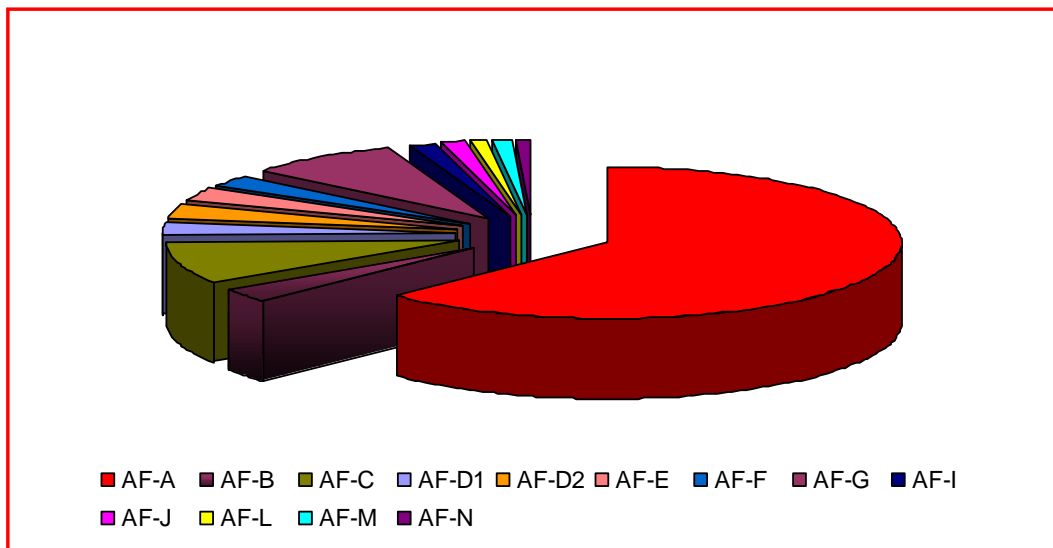


Figura 3. Frecuencia aproximada de los 13 grupos de complementación de anemia de Fanconi.

1.4 Complejo AF

Durante la fase S del cc, el ADN se duplica, formándose múltiples horquillas de replicación; en condiciones normales, el ADN sufre lesiones que pueden romper la estructura de la cromatina, induciendo enlaces cruzados, que originan una falla en la replicación. Diversos estudios han demostrado, que 10 proteínas de AF (FANCA, FANCB, FANCC, FANCD2, FANCE, FANCF, FANCG, FANCI, FANCL y FANCM) y las proteínas BRCA1 y BRCA2 (FANCD1) se unen en una vía conocida como AF/BRCA la cual se activa en fase S del cc con la finalidad de reparar estas lesiones que en condiciones normales se forman durante el proceso de replicación o cuando la célula está expuesta a agentes que dañan al ADN, tales como, MMC y radiación ionizante (RI), radiación ultravioleta (UV)^{10,36,35}. Incluso, se ha demostrado, que la vía AF/BRCA también está activa, después de un estrés replicativo, inducido con agentes tales como la afidicolina y la HU^{36,37}. Independientemente del agente inductor del daño, las proteínas FANCA, B, C, E, F, G, L y M interaccionan y forman un complejo nuclear AF (complejo AF) responsable de monoubiquitinar en la lisina 561 a FANCD2. La función exacta de todas las proteínas AF dentro del complejo es desconocida, sin embargo se sabe, que FANCL es una ubiquitina ligasa E3, que actúa como subunidad catalítica dentro del complejo y monoubiquitina a FANCD2 durante la fase S en respuesta a un estrés genotóxico²¹. La proteína FANCM, que es un miembro de la familia de endonucleasas, incide en el extremo 3' de la horquilla de replicación e interactúa con FAAP24, también parte del complejo AF y esencial para la ubiquitinación de FANCD2 y la unión directa de FANCM con el ADN. FANCM contiene motivos de helicasa y actividad de translocasa, sugiriendo un posible papel como sensor del daño en el ADN, y en asociación con FAAP24, puede servir como anclaje del complejo AF en la horquilla de replicación²¹ (Figura 4). Recientemente se demostró, que FANCI, es también monoubiquitinizada en la lisina 523 durante la fase S. Esta monoubiquitinización es dependiente de la presencia de FANCD2, con la que colocaliza en un mismo *focus* subnuclear, uniéndose de manera coordinada a la cromatina^{38,39}.

La formación del complejo AF es crucial para iniciar la cascada de eventos con el fin de reparar el daño en el ADN, ya que la interacción de estas proteínas promueve la asociación en la cromatina de otras proteínas como BLM (síndrome bloom), la topoisomerasa III y la proteína de replicación.

Posterior a su monoubiquitinización, FANCD2, se moviliza a un *focus* nuclear donde colocaliza con FANCD1/BRCA2, RAD51, PCNA (antígeno de proliferación nuclear) y NBS1 (Síndrome de Nijmegen). FANCD1/BRCA2, interactúa en este mismo *focus* nuclear con FANCN y la proteína FANCI con BRCA1, otra proteína clave para la RH²¹ (Figura 4). La monoubiquitinización de FANCD2 es un evento reversible, llevado a cabo por la enzima deubiquitinazadora USP1. La remoción de la ubiquitina durante la fase G₂, permite la disociación del complejo AF y la continuación de la célula a mitosis^{10,40}.

La proteína FANCD2 no solo se monoubiquitina, también se fosforila en la serina 222 por la cinasa ATM (ataxia telangiectasia) en respuesta a la RI (Figura 5), lo que permite la activación de proteínas involucradas en la respuesta de un punto de control en fase S del cc, tales como p53, CHK2, NBS1 (síndrome de Nijmegen) y BRCA1¹. Independientemente del agente inductor del daño, todas estas interacciones entre proteínas AF y no AF, son indispensables para el desenrollamiento del ADN y requeridas para llevar a cabo la reparación por recombinación homóloga.

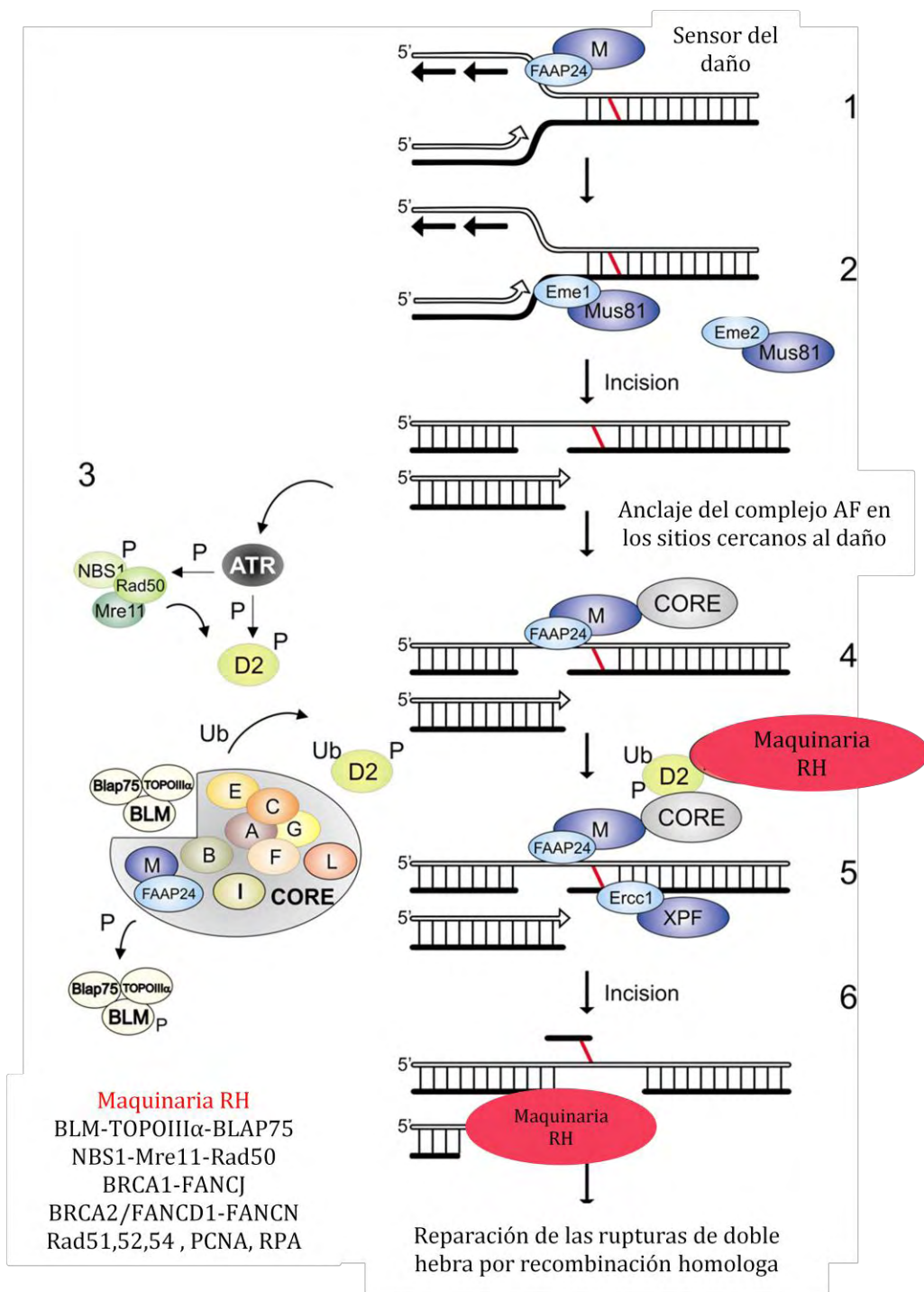


Figura 4. Modelo de replicación dependiente de la detección de enlaces cruzados en el ADN y reparación en células de mamíferos. (Mol Cel, 25, Niedernhofer, The Fanconi anemia signalosome anchor, 487-490,2007, con el permiso de Elsevier [1834341123924]).

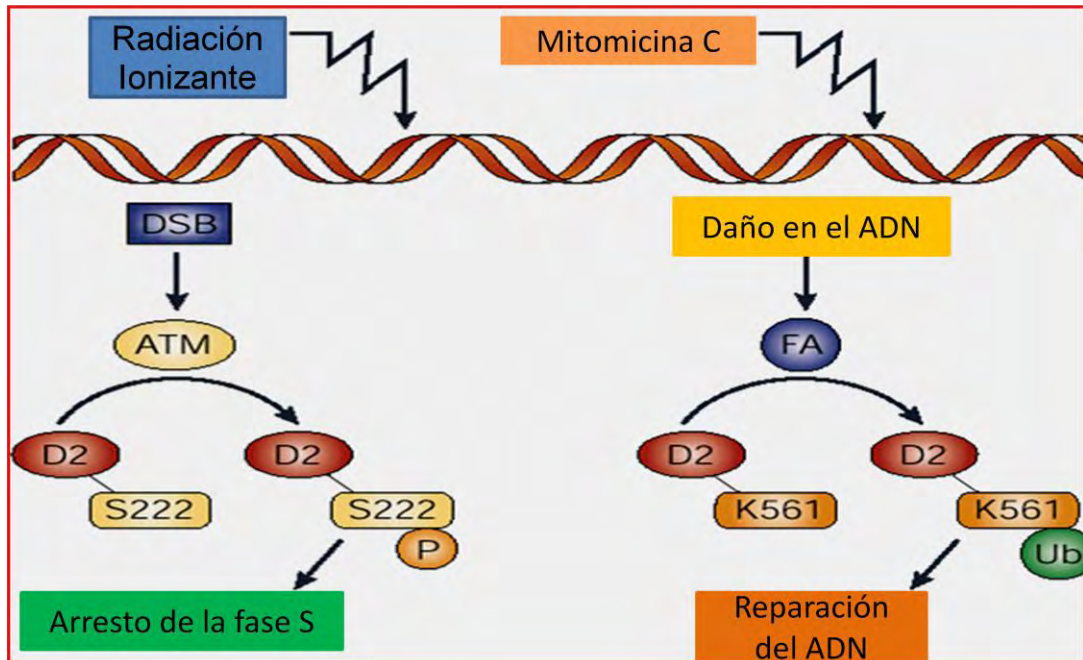


Figura 5. Doble función de la proteína FANCD2 después de un daño inducido por la mitomicina C o la radiación ionizante. (Permiso de Macmillan Publisher Ltd: Nature Rew, Nov. 22, 2007).

1.5 *TP53*

TP53 es un factor de transcripción que actúa como supresor de tumores y se encuentra mutado en el 50% de todos los tipos de cáncer, sugiriendo que la pérdida de *TP53* provee una ventaja selectiva a las células tumorales. Los estudios realizados en fibroblastos de pacientes con el síndrome de Li-Fraumeni demostraron, que la pérdida de la función de *TP53* induce anomalías cromosómicas, ya sea en número o estructura de los cromosomas. Otro estudio realizado en ratas carentes de la función de p53 demostró que estos animales desarrollaron tumores espontáneos, amplificaciones génicas y poliploidias; por lo que, se ha propuesto que p53 es una proteína clave en mantener la integridad genómica de la célula^{41,42}.

La proteína p53 está compuesta por 393 aminoácidos y tiene una masa molecular de aproximadamente 53,000 daltons. p53 tiene tres dominios funcionales: a) un dominio de transactivación (TAD), que se localiza en el extremo N terminal de la proteína y es el sitio donde p53 interactúa con otras proteínas, tales como, factores de transcripción, proteína de unión a la caja TATA (TBP) y factores asociados a TBP. También es el sitio donde interactúa con Mdm2 (Mouse double minute 2), un importante regulador negativo de p53, b) un dominio de unión al ADN (DBD), que se localiza en la región central de la proteína (102-292 aminoácidos) y contiene 4 regiones conservadas, las cuales se han visto mutadas en el 95% de los tipos cáncer humanos y c) el tercer dominio es de oligomerización, que se localiza en el extremo carboxilo terminal de la proteína y es una región importante para su función y regulación⁴³. La proteína p53 se une específicamente al ADN en una secuencia repetida de 10 nucleótidos que contiene una secuencia consenso 5'- PuPuPuC(A/TA/T)GPyPyPy-3'⁴⁴.

En condiciones normales, los niveles de la proteína P53 se encuentran bajos, con una vida media corta. HDM2 (Homologo humano de Mdm2), actúa como regulador negativo, ya que al unirse a P53, impide la interacción con otras proteínas necesarias para la regulación génica. Mdm2 es fosforilado por Akt en al menos dos residuos (serina 166 y 186), lo que permite a Mdm2 movilizarse del citoplasma al núcleo y unirse a P53. Mdm2, juega un papel crítico en la degradación proteosomal de P53, ya que actúa como una ubiquitina ligasa E3 específica, promoviendo la ubiquitinización y la rápida degradación proteosomal (Figura 6)^{42,45}.

El daño al ADN, así como la activación oncogénica, hipoxia, privación de nutrientes, AC y acortamiento de los telómeros, activan y estabilizan a la proteína P53, fosforilando a las serinas 15 y 20, lo que provoca la separación de Mdm2-P53^{42,45}. Después de la activación, P53 se acumula en el núcleo y regula la transcripción de genes involucrados en la respuesta al daño al ADN, promoviendo el arresto del cc, la reparación del ADN, la apoptosis, la senescencia y la diferenciación (Figura 7)^{41,42}.

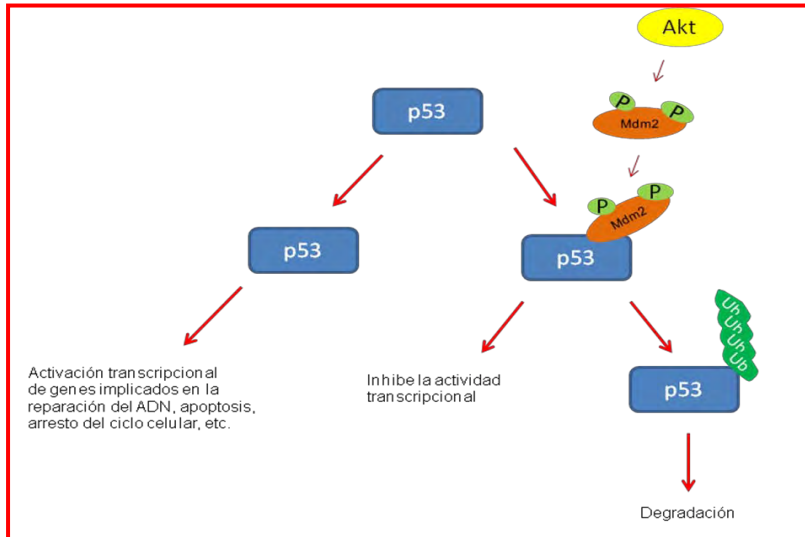


Figura 6. Autorregulación de p53 a través de Mdm2. Mdm2 se une a p53 y la inactiva a través de dos mecanismos diferentes. 1) El bloqueo físico de la actividad transcripcional de p53 y 2) Promover la ubiquitinización y la subsecuente degradación proteosomal.

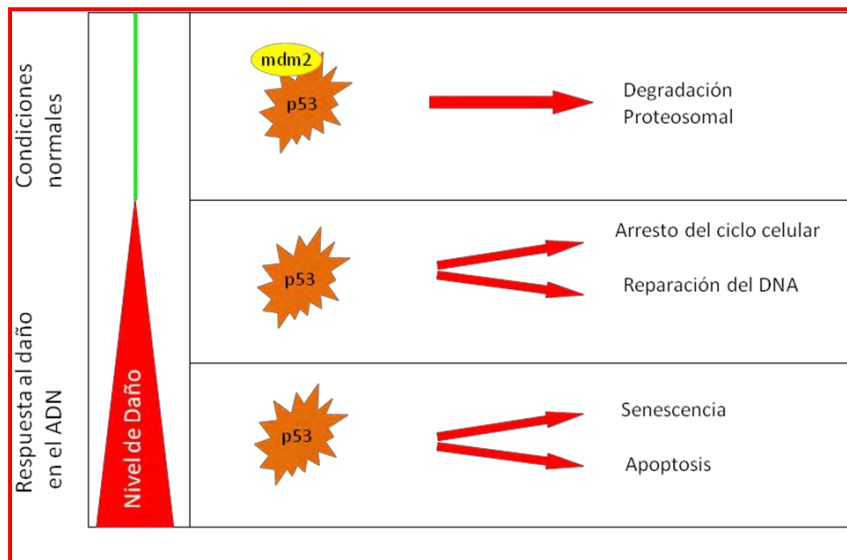


Figura 7. Respuesta de p53.

a) Arresto del ciclo celular

El arresto en la fase G_1 del cc es un punto crítico en la estabilidad genómica, ya que impide el tránsito a la fase S y previene la replicación de un ADN con daño. En condiciones normales, la progresión a través de G_1 se lleva a cabo por las ciclinas D y E en asociación con cinasas dependientes de ciclinas (cdk2, cdk4 y cdk6). El complejo D/cdk4/6 hiperfosforila a la proteína de retinoblastoma (pRB), la cual, libera del factor de transcripción E2F y esta liberación promueve la activación de E2F, que a su vez, promueve la expresión de genes necesarios para que la célula transite a fase S⁴¹. Después de un daño en el ADN, P53 se activa, e induce la expresión de *P21* (inhibidor de cinasas dependientes de ciclinas), que inhibe las actividades de cdk2 y cdk4 arrojando a las células en G_1 . *P21* o *CDKN1A* es el primer gen blanco de P53 en el detenimiento del CC, sin embargo existen otros genes, tales como *BTG2* (inhibe a las ciclinas D y E) y *GADD45* (se une a *PCNA* e inhibe la entrada a fase S) que ayudan al mantenimiento del arresto⁴².

La detención de la fase G_2/M ayuda a prevenir la segregación de los cromosomas con daño y es necesaria la inhibición del complejo cdc2-ciclinaB, lo cual se lleva a cabo por la interacción física de *P21* en este complejo, bloqueando la entrada a mitosis⁴². *GADD45* también participa en el arresto en G_2/M , uniéndose a cdc2 para prevenir la formación del complejo ciclina B/cdc2. Otro gen importante en esta fase del cc es 14-3-3 σ cuya función es la separación física del complejo ciclina B/cdc2 y removerlo del núcleo⁴¹.

b) Reparación del ADN.

Las drogas quimioterapéuticas, carcinógenos, radiación gamma, radiación UV y ROS, inducen daño en el ADN, que es reparado por diversos mecanismos, tales como: a) reparación por escisión de nucleótidos (NER), b) por escisión de bases (BER), c) por mal apareamiento (MMR), d) síntesis de translesión (TLS), e) recombinación homóloga (RH) y f) reunión de extremos no homólogos (NHEJ). Diversos estudios han demostrado que P53 promueve la integridad genómica, debido a la activación

transcripcional de diversos genes involucrados en cada una de estas vías de reparación⁴².

P53 participa en NER induciendo la expresión de *GADD45*, *XPE (DDB2)* y *XPC*. La función de *GADD45* en NER es interaccionar con el núcleo de histonas y facilita la relajación de la cromatina. Por otro lado, *XPE (DDB2)* y *XPC* son proteínas que pertenecen al síndrome de "Xeroderma Pigmentosum" (XP), un síndrome autosómico recesivo caracterizado por la elevada incidencia de cáncer de piel causado por una excesiva sensibilidad a la radiación UV. La función de *DDB2* y *XPC* es localizar y reconocer el daño en el ADN inducido por la luz UV^{41,42}. En BER, P53 participa por medio de la interacción con la ADN pol β , con el fin de estabilizar el ADN dañado con la maquinaria BER⁴¹.

En la reparación MMR, P53 induce la expresión del *P53R2*, la cual tiene un 80% de identidad con la subunidad R2 de la ribonucleótido reductasa (RNR); la función de *P53R2* es incrementar la cantidad de desoxiribunucleótidos (dNTPS) libres necesarios para la reparación. Otros genes que también son estimulados por P53 son *hMSH2* (human MutS homologue 2), que reconoce el mal apareamiento de las bases y, *PCNA* (antígeno de proliferación nuclear), un cofactor de las ADN polimerasas δ y ϵ , el cual interacciona con *hMSH2* y, es esencial en el reclutamiento de las proteínas necesarias para llevar a cabo la reparación MMR^{41,42}.

En la RH, P53 interacciona directamente con RPA, proteínas necesarias para estabilizar las cadenas sencillas (ssADN) producidas a partir de rupturas en la doble hebra (DSB) al inicio de la RH. También, P53 interacciona con *RAD51* con el fin de inhibir el intercambio de cromátidas hermanas y prevenir un exceso de recombinación y, finalmente con las helicasas *BLM* (Síndrome de Bloom) y *WRN* (Síndrome de Werner), las cuales asisten la restauración de la horquilla de replicación⁴².

c) Especies reactivas de oxígeno (ROS):

Las ROS, tales como los aniones superóxido, los radicales y los peróxidos de hidrógeno, son moléculas altamente reactivas que modifican proteínas e inducen daño en el ADN; con el fin de prevenir este daño, las células cuentan con mecanismos de detoxificación o antioxidantes, en los cuales P53 también está involucrado⁴². P53 induce la expresión de genes asociados con la defensa antioxidante, por ejemplo, el de la glutatión (GSH) por medio de la enzima glutatión peroxidasa, la cual recientemente se ha observado que su expresión es inducida por P53. P53 también es responsable de la activación de la superóxido dismutasa 2 (*SOD2*), cuyo producto del gen es necesario para disminuir el superóxido generado por la mitocondria, durante el proceso de respiración^{41,42}.

d) Apoptosis:

La apoptosis o muerte celular programada depende de la activación de caspasas y dependiendo de las señales de activación, esta puede ser intrínseca o extrínseca. Brevemente la vía extrínseca se activa, cuando los ligandos se unen a receptores de muerte celular y proporcionan la señal para iniciar la cascada de eventos a través de la caspasa 8. En esta vía, P53 estimula la expresión de genes tales como *TRAIL*, *DR4*, *DR5*, *FAS* y *FAS/APO-1* (miembro de la superfamilia de factores de necrosis tumoral TNFR). El mecanismo intrínseco, involucra la alteración del potencial de membrana en la mitocondria, facilitando la liberación del citocromo c y la activación de la caspasa 9. En este mecanismo participan los genes *Bcl-2*, *Bax*, *PUMA* y *NOXA*, todos ellos regulados por P53^{41,42}.

1.6 Anemia de Fanconi y *TP53*

Los estudios en AF y P53 son escasos y controversiales. Krutz F y cols en 1996, estudiaron los niveles de expresión de los genes p53 y Bcl-2 (proto oncogen, inhibidor de la apoptosis) y la inducción de apoptosis después de un tratamiento con MMC en líneas linfoblastoides de pacientes AF. Estos autores encontraron, que una continua exposición a MMC [3 ó 10 nmol/L] indujo una clara expresión de p53 en líneas linfoblastoides de los grupos de complementación A, C y D. Altas dosis de MMC [1 a

10µmol/L x 1h] indujeron una acumulación de p53, 8 horas después del tratamiento y alcanzó su pico máximo a las 24 horas. Respecto a la expresión del gen Bcl-2, se observaron niveles de expresión similares en las células normales y AF, y sugieren que la apoptosis inducida por la MMC no es ocasionada por niveles alterados en la expresión del inhibidor de muerte celular, bcl-2⁴⁶. En un trabajo posterior, se mostró que en células mutantes *Fancc*, la RI también induce un incremento en los niveles de la proteína p53 y observaron que después del tratamiento con bajas dosis de MMC, estas células presentan apoptosis por mecanismos parcialmente dependientes de p53; por el contrario, elevadas concentraciones de MMC no indujeron el mismo efecto.

Los autores proponen que la apoptosis observada en células mutantes de *Fancc* después de la exposición a elevadas dosis de MMC, puede ser mediada por una proteína relacionada a p53, tal como p73, la cual activa la transcripción de promotores dependientes de p53 y que promueve apoptosis en ausencia de p53²³.

Recientemente, se estudiaron los niveles de expresión p53, p73, p21, Bax y Hdm2 en células AF-A. Los niveles de expresión del RNAm de p53 es similar a lo observado en células normales, pero los niveles de la proteína p53 disminuyeron, sugiriendo una inestabilidad de la proteína. Los niveles de RNAm y de la proteína p73 y p21 estuvieron incrementados en AF-A a diferencia de las células normales. Respecto a la expresión de los genes Bax y Hdm2, se demostró, que las células AF-A tienen una mayor expresión de estos genes, y ya que el incremento de p73 se correlaciona con el incremento de Hdm2 y bajos niveles de la proteína p53, los autores sugieren que p73 contribuye al incremento de apoptosis en las células AF-A⁴⁷.

En embriones de “zebrafish” deficientes en *Fancd2* (homologo del gen *FANCD2* en humanos), también se han estudiado los niveles de expresión de *p53*, *p21*, *mdm2*, *bax*, *ciclina D1* y *ciclina E* y se demostró, que los niveles de RNAm de *p53* y blancos transcripcionales de p53, tales como *p21* y *mdm2* incrementaron los niveles de expresión en relación a los embriones controles. Por el contrario, los niveles de las *ciclinas D1* y *E*, disminuyeron, sugiriendo un retraso en el cc en el tránsito de G₁/S.

Estos autores también demostraron, que los defectos en el desarrollo y el incremento de apoptosis en embriones de “zebrafish” deficientes de *fancd2*, fueron corregidos por la inyección del gen *FANCD2* o de RNAm de *bcl-2*, sugiriendo que la apoptosis espontánea que sufren los tejidos en desarrollo es dependiente de p53⁴⁸.

Un estudio relacionado con senescencia celular y *TP53* en células hematopoyéticas deficientes del gen *Fancc*, demostró, que la re-oxigenación a la cual están expuestas en condiciones normales las células hematopoyéticas durante su desarrollo, produce estrés oxidativo y senescencia. Este incremento en la senescencia se lleva a cabo a través de la vía celular ATM-p53-p21, sugiriendo la importancia de esta vía celular para el mantenimiento y supervivencia de las células progenitoras hematopoyéticas⁴⁹.

Por otra parte, diversos trabajos han sugerido una relación entre la función de p53 y el desarrollo de tumores en AF; ya que, se ha demostrado, que en ausencia de p53, los pacientes AF presentan una mayor proporción de carcinomas de células escamosas positivas para papiloma humano, en comparación con individuos controles, indicando que la pérdida funcional de p53 facilita el desarrollo de tumores en AF⁵⁰.

En ratones mutantes para *Fancc* y heterocigotos para *Trp53* se observó el desarrollo de anomalías en la sangre y tumores sólidos a una edad más temprana, en comparación a los ratones que únicamente tienen mutaciones en *Trp53*⁵⁰. Finalmente, en ratones con mutaciones en *Fancd2* y *Trp53* (*Fancd2*^{-/-}/*Trp53*^{+/-}) se observó el desarrollo de sarcomas, anomalía observada solo para heterocigotos de *Trp53* y, adenocarcinomas mamarios y de pulmón, raramente observadas en heterocigotos *Trp53*⁵⁰.

Aunado a todo lo anterior, en 1997, se demostró, que el gen FANCC es un blanco transcripcional de p53, ya que se une a dos sitios en el gen; uno de estos sitios es en la región promotora (-1295 a -1266) y el otro en la región codificante (+1828 a +1848)⁵¹ y además se ha demostrado la interacción física de p53 con BRCA1 y BRCA2⁵², por lo que no cabe duda, de la existencia de una relación entre la vía AF y la vía p53, en el mantenimiento y estabilidad de la integridad genómica de las células.

1.7 Hidroxiurea (HU)

La HU es una droga citostática mielosupresiva, aislada por primera vez en 1869, ampliamente utilizada en el tratamiento de la leucemia mieloide crónica, trombocitopenia y con menor efectividad en algunos carcinomas^{53,54}.

La HU entra en la célula por difusión pasiva; es un potente inhibidor de la ribonucleótido reductasa (RR), enzima responsable de convertir los ribonucleótidos difosfatos a 2' desoxiribonucleótidos difosfatos (dNTP), esenciales para la síntesis y la reparación del ADN⁵⁵. El tratamiento con HU previene la acumulación de dNTP y afecta directamente a la reserva de purinas, lo que induce un colapso reversible en la horquilla de replicación y el arresto de las células en fase S temprana del cc^{56,57}.

Los estudios referentes a la toxicidad de la HU y la inducción de aberraciones cromosómicas son escasos. Lima P y cols (2003), demostraron que la HU induce citotoxicidad en linfocitos de individuos sanos y no observaron un incremento en las ACs⁵⁸. Ho y cols (2006), encontraron que la HU incrementa el número de DSB en el ADN, sin embargo la inducción es menor en comparación al número de rupturas que inducen los agentes que dañan directamente al ADN⁵⁹. Recientemente, Molina B y cols (en proceso), demostraron que la HU induce una disminución significativa del índice mitótico y de la supervivencia celular en líneas linfoblastoides de los grupos de complementación A,B,C, D1 y E, así como un incremento en la frecuencia de ACs, sugiriendo que las células AF son hipersensibilidad a la HU⁶⁰.

También se ha demostrado que linfocitos de pacientes AF sin clasificar fueron hipersensibles a la HU; ya que encontraron que el tratamiento con este agente, disminuye significativamente la síntesis del ADN y el número de células en esta etapa¹². Por el contrario, en otro estudio se demostró que el tratamiento con HU induce niveles similares de arresto del cc tanto en linfocitos FA-C⁻, como en células normales y en linfoblastos corregidos con el gen *FANCC*¹³.

La HU es un agente comúnmente utilizado para inducir un estrés replicativo en la célula e inhibir la replicación del ADN, la cual está asociada con un aumento en la RH y la formación de un *focus* celular que contiene a Rad51, proteína clave para llevar a cabo la RH. Un incremento en la recombinación homologa induce un aumento en las rupturas de DSB y es el principal evento de reparación de estas rupturas, no es sorprendente que células deficientes en RH sean sensibles a la HU⁶¹. Estudios relacionados con la expresión de genes dependientes de *TP53* y HU han mostrado resultados controversiales. Nayak BK y Das GM (2002), demostraron que después de un estrés replicativo inducido por la HU (1.5 mM) o por la afidicolina (5µg/ml), la cual bloquea a la ADN polimerasa α , y promueve un arresto reversible en G₁/S, P53 se acumula e induce la expresión de *P21*, *GADD45* y *BAX* en células normales y en células de cáncer de mama y colorectal, sugiriendo una clara relación entre el colapso de la horquilla de replicación y P53⁶². Por el contrario, en otro estudio se observó, que células tratadas con HU durante 48 h, inducen una ligera expresión de p21, Mdm2, ciclina G y Gadd45 y únicamente el gen *PIG3* mostró un aumento significativo en los niveles de expresión⁶¹.

a) Ribonucleótido reductasa y TP53:

La ribonucleótido reductasa (RR) es una enzima responsable de la conversión de los ribonucleótidos difosfatos a 2' deoxiribonucleotidos difosfatos (dNTP), esenciales para llevar a cabo la síntesis y reparación del ADN. La concentración de cada uno de los nucleótidos es importante, ya que un desbalance puede causar muerte celular. La actividad de la RR es altamente regulada en células de mamíferos, específicamente en la fase S por los genes *R1* y *R2*, los cuales se unen a la proteína *R1* y por un complejo

promotor de anafase que promueve la degradación de la proteína R2 al final de la mitosis⁶³. Los niveles de la RR varían en las diferentes etapas del CC y se ha observado que estos niveles están incrementados en tejidos con una gran proliferación celular⁶⁴.

En humanos, la RR está compuesta de una subunidad grande (M1) y dos subunidades pequeñas (hRRM2 y p53R2). La M1 contiene los sitios que controlan la actividad de la holoenzima y su especificidad por el sustrato y las subunidades pequeñas contienen centros de hierro esenciales para estabilizar a los radicales libres tirosil requeridos para la reducción de los nucleótidos difosfatos⁶⁵; los cuales son esenciales para la función de las subunidades y pueden ser destruidos por la HU, lo que induce la inactivación de la enzima⁶³. La subunidad de p53R2, fue localizada por hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH) en 8p23.1 y ha sido identificada como un blanco transcripcional de p53⁶⁵.

Diversos trabajos han demostrado que después de un daño en el ADN, los niveles de p53R2 aumentan y la proteína se acumula en el núcleo, con la finalidad de llevar a cabo la reparación del ADN^{55,63}, por lo que se ha sugerido que p53R2 es fundamental para proveer los nucleótidos requeridos en la reparación⁶⁵. También se ha sugerido que la actividad de p53R2 está directamente relacionada con la inestabilidad genómica observada en células tumorales deficientes de p53, ya que si la función de la p53R2 es inadecuada, puede existir un error en la incorporación de dNTPs y por lo tanto una reparación del ADN defectuosa, incrementando la frecuencia de mutaciones y la inestabilidad genómica⁶⁵. Por otra parte, p53R2 es capaz de suprimir la invasión en células de cáncer de colon, orofaríngeo, próstata y páncreas, sugiriendo que los niveles de expresión de p53R2 juegan un papel importante en la invasión y metástasis de las células cancerosas y puede ser utilizado como un biomarcador con la finalidad de predecir el potencial de metástasis⁵⁵.

1.8 Mitomicina C (MMC)

La MMC es un antibiótico natural, aislado por primera vez en 1958, del microorganismo *Streptomyces caespitosus*, es un agente anticancerígeno, utilizado ampliamente en combinación con otras drogas para el tratamiento de diferentes cánceres entre los que se pueden mencionar: vejiga, mama, cabeza⁶⁶.

La MMC, es un agente alquilante bifuncional, con tres grupos citotóxicos: quinona, aziridina y carbamato⁶⁷. La aziridina y el carbamato alquilan, es decir, inducen enlaces cruzados en los grupos aminos de las dos guaninas del ADN, en las secuencias CpG localizadas en el surco menor del ADN⁶⁸. La alquilación se lleva a cabo por la reductasa NADPH-citocromo p450 (oxido), que produce un radical anión de semiquinona, el cual puede re-oxidarse generando radicales aniones superóxidos⁶⁶.

La MMC para ser funcional, debe reducirse por medio de un sistema reductasa dependiente de NADPH a semiquinona, la cual, se une no covalentemente al ADN y al perder una molécula de metanol, se transforma en hidroquinona aziridimitoseno y es capaz de unirse covalentemente al ADN. La aziridina queda como un anillo abierto en el carbono 1 y pierde un sustituyente carbamoiloxi del carbono 10, que es el sitio en el cual ocurre el enlace cruzado. En cada sitio, el residuo de guanina en la posición 0⁶ puede ser alquilado y formar enlaces cruzados de residuos de guanina en el ADN.

El número de enlaces cruzados es proporcional al contenido de guaninas-citosinas⁶⁹ y se ha reportado que el tratamiento con MMC induce una sobre producción de radicales libres¹⁴. Los efectos que provocan los dos centros alquilantes de la MMC en las células de AF son mutagénicos, clastogénicos y letales⁷⁰.

En las células AF, la MMC induce un incremento de AC. El tipo de AC que se observan frecuentemente son figuras radiales, rupturas cromatídicas, cromosómicas y con menor frecuencia translocaciones, cromosomas en anillo, cromosomas dicéntricos y fragmentos^{32,33} (Figura 8). Las figuras radiales, típicas de los células AF son generadas cuando dos o más cromátidas de cromosomas no homólogos se rompen y fusionan⁷¹, lo que ha sugerido, que la producción de este tipo de AC está estrechamente relacionada con un defecto en la RH. La elevada sensibilidad de las células AF a la MMC, es una característica patognomónica de la enfermedad y en la actualidad se utiliza como prueba diagnóstica de AF.

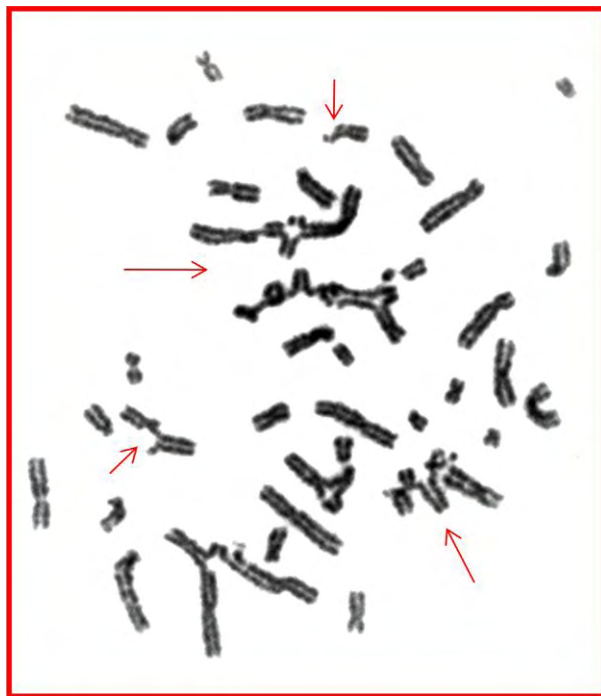


Figura 8. Cromosomas de un paciente AF tratados con MMC, se observan rupturas cromosómicas, cromatídicas y figuras radiales.

2. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

El genoma está continuamente expuesto a agentes que lo dañan, tanto internos (metabolitos de la célula, radicales libres, hidrólisis, oxidación) como externos (luz UV, radiación ionizante, toxinas, agentes químicos) por lo que la maquinaria de vigilancia y reparación debe funcionar eficientemente o de lo contrario, el daño permanece en la célula y ocasiona eventos catastróficos, tales como cáncer e inestabilidad cromosómica. Los síndromes de inestabilidad cromosómica y en especial a la AF, son excelentes modelos naturales para estudiar los mecanismos normales de reparación y vigilancia del ADN. Estudios en células AF han demostrado, que después de la exposición a HU, estas células, presentan una reducción de la proporción de células en fase G₂/M, inhibición de la síntesis del ADN y un aumento de aberraciones cromosómicas en relación a la respuesta de las células normales^{12,60}. Adicionalmente, cuando la HU se adiciona en fase G₂ del cc sobre un ADN dañado, el número de aberraciones se eleva hasta en un 100%⁶⁰. Hasta la fecha se conoce que la HU inhibe a la ribonucleótido reductasa, enzima necesaria para síntesis de los dNTPs, precursores del ADN, por lo que se considera que la HU activa una vía diferente a la que despiertan los agentes alquilantes. Por lo tanto, conocer la respuesta de genes que participan en la principal vía de vigilancia del genoma, como la vía P53, puede proporcionar información sobre el mecanismo de acción de la HU.

3. HIPOTESIS

Las células de anemia de Fanconi del grupo de complementación A (AF-A), activan la expresión de genes regulados por la vía P53 en respuesta al tratamiento con hidroxiurea en condiciones basales y de daño inducido por la mitomicina C.

OBJETIVOS

1. Cuantificar mediante la metodología de PCR cuantitativa relativa (QRT-PCR), los niveles de expresión de *TP53* y 12 genes relacionados con la vía P53 después del tratamiento con mitomicina C en células AF-A y en células normales (NL).
2. Cuantificar mediante la metodología de PCR cuantitativa relativa (QRT-PCR), los niveles de expresión de *TP53* y 12 genes relacionados con la vía P53 después del tratamiento con hidroxiurea en células AF-A y en células NL.
3. Comparar los niveles de expresión de las células AF-A tratadas con ambos agentes (MMC+HU) respecto a los niveles de expresión de cada uno de ellos.

TIPO DE ESTUDIO

Estudio prospectivo, transversal, comparativo y experimental

4. MATERIAL Y METODOS

6.1 DISEÑO EXPERIMENTAL

Se utilizaron dos líneas linfoblastoides provenientes de individuos AF que pertenecen al grupo de complementación A (AF-A: HSC72 y VU817), por ser el grupo de complementación más común entre la población AF y dos líneas linfoblastoides derivadas de individuos normales (NI6846 y NL_1 INP), utilizadas como control.

Los cultivos celulares fueron mantenidos en medio RPMI suplementado y se cuantificó la presencia de micoplasma, ya que es una bacteria muy común y afecta el crecimiento de las células. También se verificó la sensibilidad de las células AF a la MMC, mediante el análisis de AC, para asegurar que las células conservaran el fenotipo celular característico AF (Figura 8).

Posterior a la verificación de micoplasma y de sensibilidad a la MMC, las células fueron expuestas a MMC e HU de la siguiente manera: por cada línea celular y repetición biológica (total 3 replicas biológicas), se sembraron al mismo tiempo 4 tipos de cultivo (Figura 9):

- 1) Células sin tratamiento o control (ST): Incubadas únicamente en medio RPMI 1640 suplementado por 24 horas, 2 horas antes de terminar el tiempo de incubación, se tomó una alícuota de 5 ml y se adicionó colchicina para obtener cromosomas en metafases.

- 2) Células con MMC (+MMC): Células incubadas durante 24 horas con MMC (10 ng/ml), pasado este tiempo se lavaron dos veces con solución salina de Hanks estéril. Dos horas antes de finalizar el tratamiento, se tomó una alícuota de 5 ml para el análisis cromosómico. Este tratamiento se utilizó con la finalidad de comparar la expresión génica por tratamiento individual.

3) Células con HU (+HU): Las células fueron incubadas por 21 horas y se adicionó HU (2 mM) por 3 horas (24 horas totales de cultivo). Posteriormente, se lavaron dos veces con solución salina de Hanks estéril y de la misma manera que con el tratamiento de MMC, estas células se utilizaron para comparar la expresión génica por tratamiento individual. También se tomó un alícuota para el análisis de aberraciones cromosómicas.

4) Células con MMC e HU (MMC+HU): Las células fueron incubadas por 24 horas con MMC (10 ng/ml), se lavaron dos veces con solución salina de Hanks estéril y se re-incubaron 21 horas en medio RPMI fresco. Debido a que la MMC es un agente S dependiente, este periodo de re-incubación permitió asegurar que la MMC indujo un daño en el ADN. Después de la re-incubación, se adicionó HU por 3 horas (Figura 8 y 9) y al finalizar las tres horas se lavaron dos veces con solución salina de Hanks estéril. De la misma manera que los tratamientos anteriores, se tomó un alícuota de 5 ml y se adicionó colchicina para obtener cromosomas en metafase.

En todos los tratamientos, el análisis de AC se realizó en tres cultivos independientes, con la finalidad de cuantificar y verificar el tipo de AC que induce cada agente. Se obtuvo el promedio de la frecuencia de AC y se utilizó la prueba estadística de t student para muestras independientes y apareadas para realizar las comparaciones entre los tratamientos.

Al finalizar cada tratamiento, se cuantificó la densidad celular y se extrajo el RNA por medio de la metodología de trizol. Para conocer los cambios en los niveles de expresión después de cada tratamiento, se utilizó la metodología de PCR cuantitativa relativa en tiempo real (QRT-PCR), que ha demostrado ser un método sensible para cuantificar los niveles de expresión de un gen determinado en relación a un grupo control sin tratamiento⁷². Los cambios de expresión de cada gen fueron obtenidos de tres replicas técnicas y dos replicas biológicas.

Los genes analizados en el estudio se seleccionaron en base a tres criterios: a) Porque se ha demostrado la respuesta de estos genes en diferentes células, incluyendo AF, después de daño al ADN inducido por la RI, la MMC, el cisplatino^{42,73} y por agentes que inhiben la síntesis del ADN^{61,62}, b) debido a la relación de algunos de ellos con la vía AF y c) porque las vías celulares en las cuales participan están afectadas en AF. Estos genes fueron: *TP53* y 12 genes relacionados con P53, tales como: *BLM*, *CDKN1A* o *P21*, *DDB2* o *XPE*, *GADD45A*, *MDM2*, *PCNA*, *RRM2B*, *SGK*, *TP53I3* o *PIG3*, *TRIAP1*, *TNFRS10B* y *XPC*, que participan en apoptosis, reparación y replicación del ADN, cc y estrés oxidativo (Tabla 1). También se seleccionaron 8 genes (*CCNB1*, *HSPA8*, *RB1*, *ABCB1*, *MYC*, *NFKB1*, *NFKB1A* y *SOD1*), involucrados en cc, apoptosis y respuesta a estrés, que responden al daño inducido por agentes que dañan al ADN y que no son regulados directamente con P53.

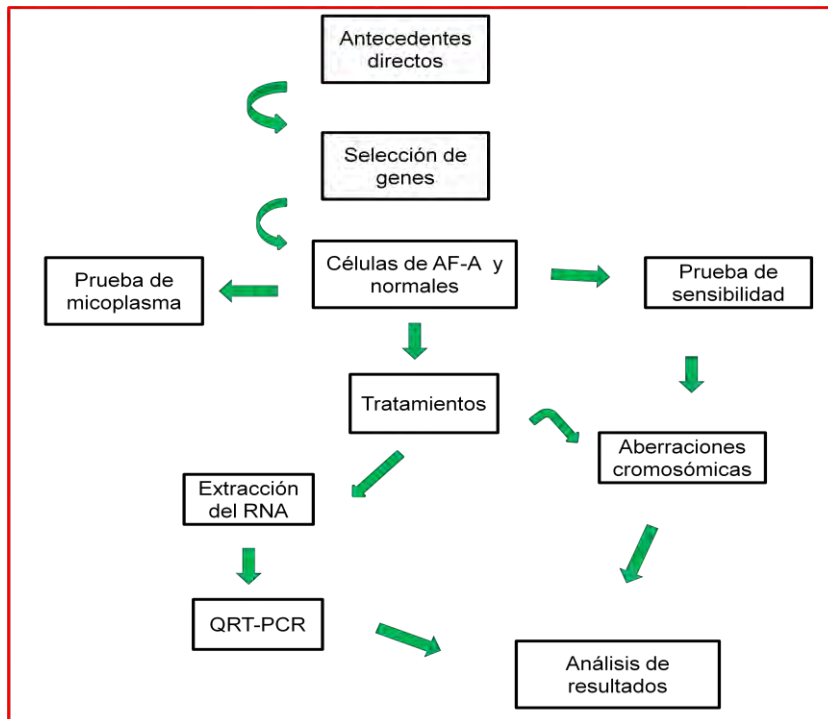


Figura 8. Diagrama general del diseño experimental.

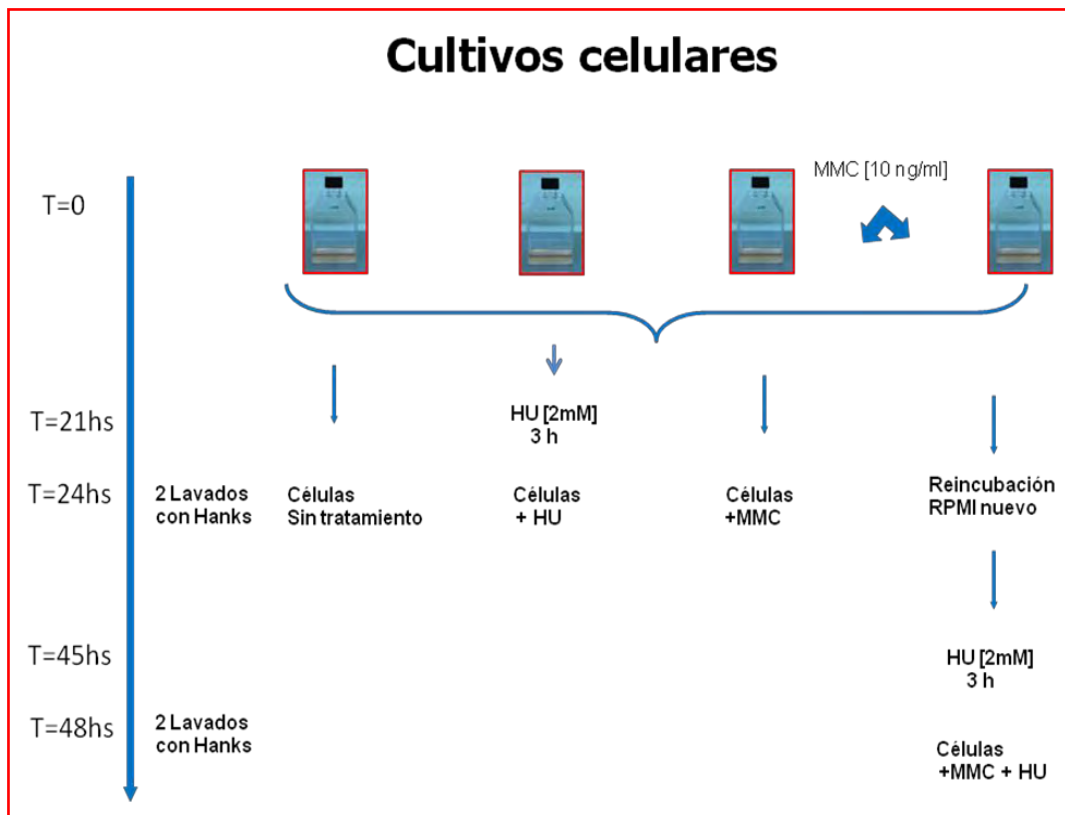


Figura 9. Esquema de los cultivos celulares y tratamientos.

Tabla 1. Símbolo oficial, nombre, número de identificación (ID), número Unigen y vía celular en la que participan los genes estudiados.

| Símbolo | Nombre | ID gen | # Unigen | Vía implicada |
|---|--|--------|------------|---|
| <i>TP53</i> | Tumor protein p53 | 7157 | Hs.408312 | Ciclo celular, reparación, replicación, apoptosis |
| Genes regulados por <i>TP53</i> | | | | |
| <i>CDKN1A (P21)</i> | Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A | 1026 | Hs.370771 | Ciclo celular |
| <i>GADD45A</i> | Growth arrest and DNA-damage-inducible, alpha | 1647 | Hs.80409 | Ciclo celular, reparación ADN |
| <i>BLM</i> | Bloom syndrome | 641 | Hs.169348 | Reparación del ADN |
| <i>DDB2 (XPE)</i> | Damage-specific DNA binding protein 2 | 1643 | Hs.6453356 | Reparación, replicación del ADN, |
| <i>XPC</i> | Xeroderma Pigmentosum grupo C | 7508 | Hs.475538 | Reparación del ADN |
| <i>MDM2</i> | Transformed 3T3 cell double minute 2, p53 binding protein | 4193 | Hs.567303 | Proliferación celular y diferenciación |
| <i>PCNA</i> | Proliferating cell nuclear antigen | 511 | Hs.147433 | Replicación, reparación del ADN |
| <i>RRM2B</i> | Ribonucleotide reductase M2 B | 50484 | Hs.512592 | Replicación, reparación del ADN |
| <i>SGK</i> | Serum glucocorticoide regulated kinase | 6446 | Hs.510078 | Respuesta a estrés , apoptosis |
| <i>TP53I3 (PIG3)</i> | Tumor protein p53 inducible protein 3 | 9540 | Hs.50649 | Estrés oxidativo, apoptosis |
| <i>TRIAP1 (p53CSV)</i> | TP53 regulated Inhibitor apoptosis 1 | 51499 | Hs.69499 | Apoptosis |
| <i>TNFRS10B</i> | Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10b | 8795 | Hs.521456 | Apoptosis |
| Genes indirectamente regulados por <i>TP53</i> | | | | |
| <i>CCNB1</i> | Cyclin B1 | 891 | Hs.23960 | Ciclo celular |
| <i>HSPA8</i> | Heat shock 70KDa protein 8 | 3312 | Hs.180414 | Respuesta a estrés |
| <i>RB1</i> | Retinoblastoma 1 | 5925 | Hs.408528 | Ciclo celular |
| Genes no regulados por <i>TP53</i> | | | | |
| <i>ABCB1</i> | ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 1 | 5243 | Hs.489033 | Resistencia a drogas |
| <i>MYC</i> | v-myc myelocytomatosis viral oncogen homolog | 4609 | Hs.202453 | Ciclo celular, apoptosis |
| <i>NFKBIA</i> | Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells, inhibitor, alpha | 4792 | Hs.81328 | Apoptosis |
| <i>NFKB1</i> | Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1 | 4790 | Hs.431926 | Apoptosis |
| <i>SOD1</i> | Superoxide dismutase 1, soluble | 6647 | Hs.443914 | Estrés oxidativo |

5. RESULTADOS

7.1 Aberraciones cromosómicas (AC)

El análisis de las AC se realizó en dos líneas linfoblastoides derivadas de individuos normales y dos líneas linfoblastoides de AF del grupo de complementación A. Las líneas celulares normales presentaron un promedio en la frecuencia de aberraciones espontáneas de 0.03 aberraciones por célula (ab/cel). Después de la exposición a MMC (10 ng/ml), las células normales presentaron un ligero incremento no significativo de AC ($p > 0.05$), y al ser expuestas a HU (2 mM) y a MMC+HU, presentaron un incremento significativo de 6.6 y 10.3 veces más de AC en relación a las células sin tratamiento (0.2 y 0.31 ab/cel, respectivamente, $p < 0.05$) (Tabla 2). Es importante mencionar que las células normales tratadas con MMC+HU presentaron una frecuencia de AC de aproximadamente la sumatoria de los tratamientos individuales (MMC=0.12 e HU=0.2).

En las células AF-A, se observó una frecuencia de AC espontáneas de 0.22 ab/cel y después de la exposición a MMC, las AC incrementaron 8.2 veces en relación a las células AF-A sin tratamiento (1.8 ab/cel, $p < 0.05$) (Tabla 2); el tipo de AC observadas con MMC, fueron rupturas cromosómicas, cromatídicas y figuras radiales (Figura 11). La HU adicionada a las células AF-A, tres horas antes de entrar a mitosis, es decir en G_2 , indujo un incremento de 3.2 veces la frecuencia de AC (0.7ab/cel, $p < 0.05$) en relación a las células sin tratamiento (Tabla 2) y se observaron exclusivamente rupturas de tipo cromatídico (Figura 12). Cuando las células AF-A, fueron expuestas a ambos tratamientos (MMC+HU), se observó un aumento de AC de 24 veces más en relación a las células sin tratamiento (5.3 ab/cel, $p < 0.05$). Este incremento fue mayor a lo encontrado con los tratamientos solos, es decir, se observó un incremento de 7.6 veces de AC en relación a la HU sola y de 2.9 en relación al tratamiento con MMC (Tabla 2).

Tabla 2. Frecuencia de aberraciones cromosómicas en líneas linfoblastoides de individuos normales y de pacientes con anemia de Fanconi del grupo de complementación A.

| Línea celular | Sin tratamiento | MMC (10 ng/ml) | HU (2mM) | MMC+HU |
|----------------------|------------------------|-----------------------|-----------------|---------------|
| Normal-1 | 0.03±0.03 | 0.08±0.05 | 0.25±0.08 | 0.42±0.07 |
| Normal 6846 | 0.03±0.01 | 0.16±0.02 | 0.16±0.0 | 0.21±0.4 |
| Promedio NL | 0.03±0.02 | 0.12±0.03 | 0.2±0.04* | 0.31±0.23* |
| AF-A (HSC72N) | 0.28±0.1 | 2.3±0.1 | 1.0±0.1 | 6.8±0.3 |
| AF-A (VU817) | 0.16±0.5 | 1.3±0.5 | 0.4±0.1 | 3.8±0.3 |
| Promedio AF-A | 0.22±0.3 | 1.8±0.3* | 0.7±0.05* | 5.3±0.3* |

Las frecuencias de AC son un promedio de tres replicas biológicas ± error estándar. * Prueba de t student, diferencia significativa (p<0.05) respecto a las células sin tratamiento.

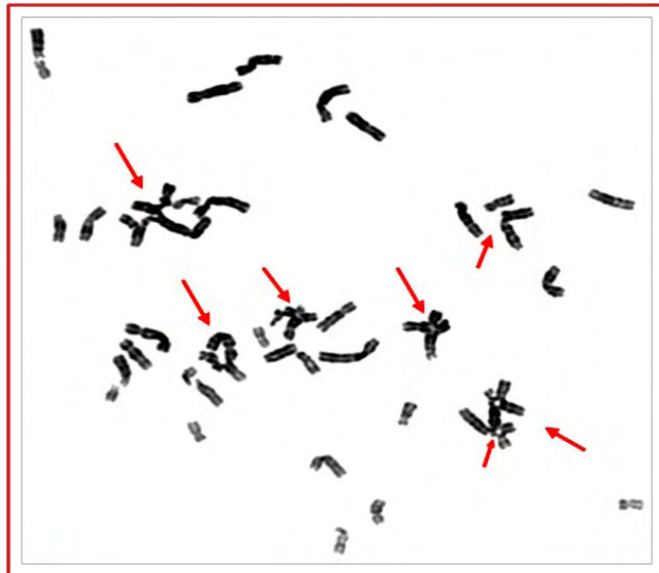
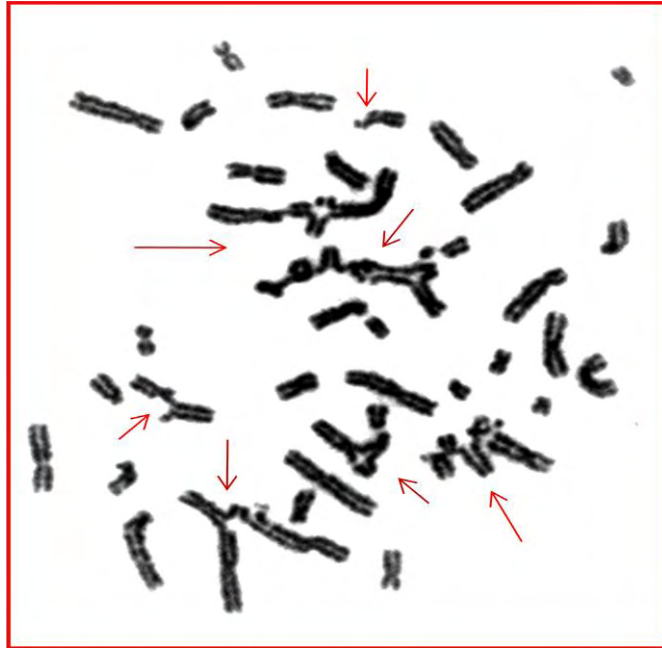


Figura 11. Células AF-A en metafase después del tratamiento con MMC (10 ng/ml) por 24 h. Las flechas indican rupturas cromatídicas, cromosómicas y figuras radiales.

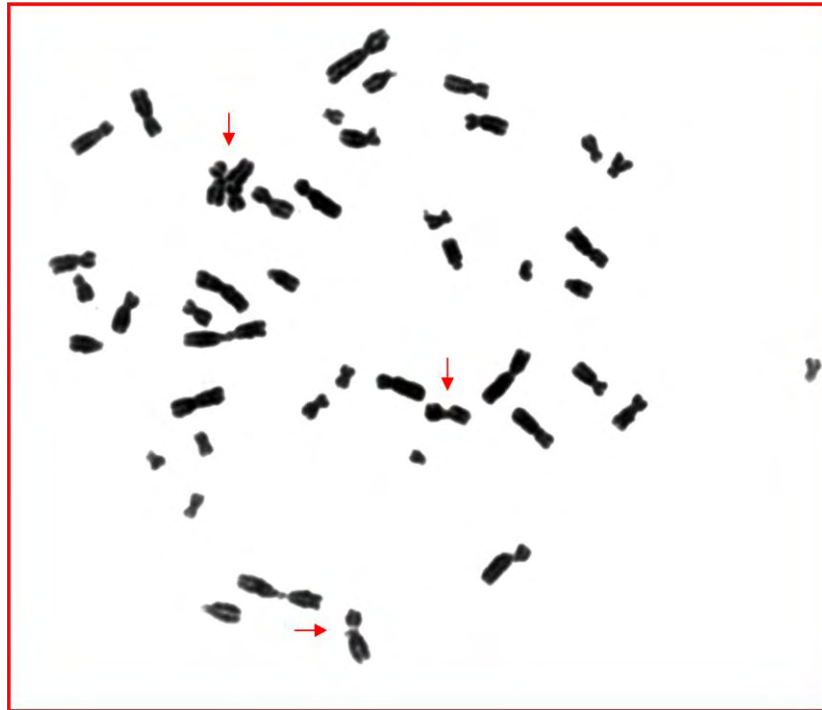


Figura 12. Células AF-A en metafase después del tratamiento con HU (2 mM) por 3 h. Las flechas señalan rupturas del tipo cromatídico.

7.2 Niveles de expresión (NE) después del tratamiento con MMC en células normales y AF-A.

Las células normales tratadas con MMC (10 ng/ml) durante 24 horas, mostraron NE entre 0.8 y 1.5 (Tabla 3); en todos los genes, los cambios no fueron significativos en relación a las células sin tratamiento. Por el contrario, la MMC en AF-A indujo un aumento significativo en la expresión de *TP53* y 7 genes de la vía P53 ($p < 0.05$ ó ≥ 0.6 , Tabla 3). Estos genes fueron: *CDKN1A*, *DDB2*, *GADD45A*, *PCNA*, *SGK*, *TP53I3* y *TRIAP1*; relacionados con cc, respuesta a estrés, replicación del ADN y apoptosis (Tabla 1). Dos genes indirectamente relacionados con P53: *CCNB1* y *HSPA8* y un gen involucrado en estrés oxidativo y no relacionado con P53 (*SOD1*), también mostraron un incremento significativo (Tabla 3).

Las comparaciones de los cambios de expresión de las células normales *versus* las AF-A expuestas al mismo tratamiento (MMC), mostraron, que en las células AF-A, 14 de los 21 genes (incluyendo *TP53*), presentaron un incremento en los NE (Tabla 3).

7.3 Niveles de expresión después del tratamiento con HU en células normales y AF-A.

La HU adicionada a las células normales indujo la expresión de 10 genes de la vía P53 (*BLM*, *CDKN1A*, *DDB2*, *GADD45A*, *MDM2*, *PCNA*, *SGK*, *TRIAP1*, *TNFRSF10B* y *XPC*) (Tabla 4); mientras que en las células AF-A, se observaron cambios en 9 genes (*CDKN1A*, *DDB2*, *GADD45A*, *MDM2*, *PCNA*, *SGK*, *TRIAP1*, *TNFRSF10B* y *XPC*). Adicionalmente, en las células AF-A, se observó un incremento en la expresión de *NFKB1A* (no regulado por P53 e involucrado en apoptosis) (Tabla 4).

Debido a que el tratamiento con HU indujo cambios en la expresión génica tanto en células normales y como en AF-A; la comparación entre ambas células, mostró, que únicamente los genes *BLM* y *CDKN1A*, presentaron una disminución en los NE en AF-A (Tabla 4).

7.4 Niveles de expresión después del tratamiento con MMC+HU en células normales y AF-A.

Las células normales incrementaron la expresión de 9 genes regulados por P53 ($p < 0.05$ o ≥ 0.6 , Tabla 5). Estos genes fueron: *BLM*, *CDKN1A*, *DDB2*, *GADD45A*, *MDM2*, *PCNA*, *RRM2*, *SGK* y *XPC* y que participan en reparación y replicación del ADN, CC, respuesta a estrés, proliferación y diferenciación celular (Tabla 5). Se puede observar, que la adición de HU sobre un ADN previamente dañado con MMC (MMC+HU), induce la expresión de genes, los cuales únicamente presentaron cambios en el tratamiento con HU sola (Tablas 3, 4 y 5).

En AF-A, se encontraron cambios de expresión en 7 genes de la vía P53 (*CDKN1A*, *GADD45A*, *PCNA*, *SGK*, *TP53I3*, *TRIAP1* y *XPC*), los cuales participan en cc, respuesta a estrés, replicación y reparación del ADN (Tablas 1 y 5). Adicionalmente, 3 genes no regulados directamente por P53, también mostraron cambios en los NE (*HSPA8*, *RB1* y *NFKB1*). Es interesante observar, que a diferencia de las células normales, los genes que presentaron cambios en la expresión con el tratamiento MMC+HU en células AF-A, también incrementaron sus NE en los tratamientos individuales, a excepción de *RB1*, que únicamente se encontró incrementado en las células expuestas a los dos agentes.

En relación a las células normales expuestas al mismo tratamiento (MMC+HU), las células AF-A incrementaron los NE de dos genes regulados por P53 (*TP53I3* y *XPC*) y de 3 genes que no pertenecen directamente a la vía P53 (*HSPA8*, *RB1* y *NFKB1*) (Tabla 5).

Es interesante observar que en las células AF-A el tratamiento con MMC+HU presenta dos diferencias importantes en relación a los tratamientos individuales; a) induce la expresión de *RB1* y *NFKB1* genes importante en el CC y apoptosis y, b) Los valores de los niveles de expresión de *CDKN1A*, *GADD45A*, *PCNA*, *SGK*, *TP53I3*, *TRIAP1* y *XPC* fueron mayores con este tratamiento (Tablas 4 y 5).

Tabla 3. Niveles de expresión de los genes estudiados en células de individuos normales y de anemia de Fanconi del grupo de complementación A después de un tratamiento con MMC.

| GEN | MMC | | Cambios de expresión entre NL y AF-A |
|--|----------|------------|--------------------------------------|
| | NL (n=2) | AF-A (n=2) | |
| TP53 | 1.1±0.1 | 1.9±0.5* | + |
| Genes regulados por TP53 | | | |
| BLM | 1.3±0.4 | 3.5±2.0 | + |
| CDKN1A | 1.4±0.3 | 2.7±0.3* | + |
| DDB2 | 1.5±0.4 | 2.3±0.8* | + |
| GADD45A | 1.1±0.1 | 2.0±0.4* | + |
| MDM2 | 1.3±0.2 | 1.8±0.6 | NC |
| PCNA | 1.2±0.2 | 2.5±0.3* | + |
| RRM2B | 1.4±0.4 | 1.6±0.5 | NC |
| SGK | 1.2±0.2 | 2.2±0.7* | + |
| TP53I3 | 1.4±0.3 | 2.8±0.7* | + |
| TRIAP1 | 1.1±0.2 | 3.7±0.9* | + |
| TNFRSF10B | 1.1±0.2 | 2.2±1.0 | + |
| XPC | 1.1±0.2 | 3.0±1.6 | + |
| Genes indirectamente regulados por TP53 | | | |
| CCNB1 | 1.0±0.1 | 2.8±1.0* | + |
| HSPA8 | 1.1±0.2 | 2.6±0.7* | + |
| RB1 | 1.3±0.4 | 1.9±0.9 | NC |
| Genes no regulados por TP53 | | | |
| ABCB1 | 1.0±0.3 | 1.7±1.0 | NC |
| MYC | 0.8±0.1 | 1.2±0.2 | NC |
| NFKB1 | 1.1±0.2 | 1.4±0.3 | NC |
| NFKBIA | 1.0±0.1 | 1.0±0.2 | NC |
| SOD1 | 0.9±0.1 | 1.9±0.4* | + |

NL=células normales. Los niveles de expresión ± error estándar, son el resultado de dos repeticiones biológicas y tres replicas técnicas en dos líneas linfoblastoides normales y dos líneas linfoblastoides de AF-A. MMC= Mitomicina C (10 ng/ml, 24h). * p<0.05 o valores ≥0.06. Niveles de expresión: +=incremento, NC= sin cambios.

Tabla 4. Niveles de expresión de los genes estudiados en células de individuos normales y de individuos AF del grupo de complementación A después de un tratamiento con HU.

| GEN | HU | | Cambios de expresión entre NL y AF-A |
|--|----------|------------|--------------------------------------|
| | NL (n=2) | AF-A (n=2) | |
| TP53 | 1.1±0.2 | 1.4±0.2 | NC |
| Genes regulados por TP53 | | | |
| BLM | 2.0±0.4* | 1.4±0.3 | - |
| CDKN1A | 5.0±1.9* | 2.8±0.4* | - |
| DDB2 | 1.6±0.5* | 1.6±0.3* | NC |
| GADD45A | 3.3±0.5* | 2.8±0.3* | NC |
| MDM2 | 1.7±0.3* | 1.6±0.1* | NC |
| PCNA | 1.7±0.2* | 2.1±0.5* | NC |
| RRM2B | 1.6±0.4 | 1.7±0.6 | NC |
| SGK | 1.7±0.2* | 1.8±0.3* | NC |
| TP53I3 | 1.5±0.3 | 1.5±0.2 | NC |
| TRIAP1 | 1.9±0.4* | 2.1±0.3* | NC |
| TNFRSF10B | 1.6±0.2* | 2.1±0.3* | NC |
| XPC | 2.0±0.4* | 1.9±0.3* | NC |
| Genes indirectamente regulados por TP53 | | | |
| CCNB1 | 0.5±0.1 | 0.9±0.2 | NC |
| HSPA8 | 1.1±0.01 | 1.6±0.3 | NC |
| RB1 | 1.2±0.5 | 1.5±0.4 | NC |
| Genes no regulados por TP53 | | | |
| ABCB1 | 1.1±0.1 | 1.5±0.5 | NC |
| MYC | 0.7±0.1 | 1.3±0.3 | NC |
| NFKB1 | 1.2±0.1 | 1.7±0.4 | NC |
| NFKBIA | 1.4±0.2 | 1.8±0.2* | NC |
| SOD1 | 1.2±0.1 | 1.1±0.5 | NC |

NL=células normales. Los niveles de expresión ± error estándar son el resultado de dos repeticiones biológicas y tres replicas técnicas en dos individuos normales y dos individuos AF-A. HU= Hidroxiurea (2 mM, 3h). * p<0.05 o valores ≥0.06. Niveles de expresión: NC=sin cambios, -= disminución.

Tabla 5. Niveles de expresión de los genes estudiados en células de individuos normales y de individuos AF del grupo de complementación A después de un tratamiento con MMC+HU.

| GENE | MMC+ HU | | |
|--|----------|------------|--------------------------------------|
| | NL (n=2) | AF-A (n=2) | Cambios de expresión entre NL y AF-A |
| TP53 | 0.9±0.2 | 1.5±0.3 | NC |
| Genes regulados por TP53 | | | |
| BLM | 2.3±0.4* | 2.6±1.7 | NC |
| CDKN1A | 4.5±1.0* | 4.7±0.9* | NC |
| DDB2 | 2.3±0.4* | 1.7±0.4 | NC |
| GADD45A | 3.4±1.0* | 3.7±0.9* | NC |
| MDM2 | 2.0±0.4* | 1.4±0.6 | NC |
| PCNA | 2.1±0.5* | 3.3±0.6* | NC |
| RRM2B | 2.3±0.5* | 1.6±0.5 | NC |
| SGK | 2.8±0.8* | 3.0±1.1* | NC |
| TP53I3 | 3.2±1.7 | 4.7±1.3* | NC |
| TRIAP1 | 1.1±0.5 | 6.2±1.9* | + |
| TNFRSF10L | 1.8±0.5 | 2.5±1.0 | NC |
| XPC | 2.2±0.5* | 6.6±4.8* | + |
| Genes indirectamente regulados por TP53 | | | |
| CCNB1 | 0.6±0.1 | 2.2±0.9 | + |
| HSPA8 | 1.2±0.2 | 2.4±0.6* | + |
| RB1 | 2.0±0.6 | 3.0±1.3* | NC |
| Genes no regulados por TP53 | | | |
| ABCB1 | 1.3±0.3 | 2.3±1.6 | NC |
| MYC | 0.6±0.1 | 1.3±0.4 | NC |
| NFKB1 | 1.3±0.1 | 3.1±1.4* | + |
| NFKBIA | 1.3±0.2 | 1.9±0.5 | NC |
| SOD1 | 1.0±0.2 | 1.4±0.5 | NC |

Los niveles de expresión ± error estándar son el resultado de dos repeticiones biológicas y tres replicas técnicas en dos células de individuos normales y dos individuos AF-A. MMC=Mitomomicina C (10 ng/ml por 24 hs) HU= Hidroxiurea (2 mM, 3h).

* p<0.05 o valores ≥0.06. Niveles de expresión:+=incremento, NC=sin cambios.

6. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

8.1 Aberraciones cromosómicas (AC)

La AF se considera como un síndrome de inestabilidad cromosómica, por presentar hipersensibilidad a los agentes que inducen enlaces cruzados (MMC o DEB) en el ADN, incremento en la fragilidad cromosómica y predisposición a cáncer⁷¹. Los enlaces cruzados inducidos por estos agentes son deletéreos para la célula, porque se unen covalentemente a las hebras del ADN e impiden su separación, requisito vital para los procesos de replicación y transcripción. Este tipo de daño se repara normalmente durante la fase S, por RH, por lo que se ha propuesto que las células AF son deficientes en este tipo de reparación⁷¹.

El análisis de las AC después del tratamiento con MMC, mostró que las células AF-A son hipersensibles a la MMC, ya que se observó un elevado número de rupturas cromosómicas, cromatídicas y figuras radiales. Este resultado es lo esperado, ya que está demostrada la hipersensibilidad de las células AF a estos agentes^{36,60} y con esto se asegura que las líneas celulares mantienen el fenotipo AF responsivo a MMC y que no son revertantes.

La HU indujo un incremento de AC tanto en células normales como en AF-A, en relación a las células sin tratamiento. Los estudios referentes al daño cromosómico que induce la HU en las células son diversos y controversiales, por un lado Lima y cols (2003), encontraron que en linfocitos de individuos normales, la HU induce citotoxicidad y no induce un incremento de AC⁵⁸. Por el contrario, en otro estudio utilizando el ensayo cometa, se demostró que la HU (1.5 mM) aplicada a células de carcinoma colorectal, induce rupturas en el ADN e inhibe la entrada a mitosis⁵⁹.

Los resultados son consistentes con lo encontrado por Molina B y cols. ya que también observaron un incremento de AC en células AF de los grupos de complementación A, B, C, D1 y E, después de la exposición a la HU⁶⁰.

El daño cromosómico observado en el presente trabajo después del tratamiento con HU, puede ser explicado parcialmente por la producción de radicales libres generados durante la activación de la HU como lo proponen Molina y cols. o bien, por un mecanismo diferente que con este trabajo no podemos dilucidar.

Cuando las células fueron expuestas a la HU sobre un ADN previamente dañado (MMC+HU), se observó, que en las células normales, este incremento es la suma de los dos tratamientos individuales (MMC ó HU); por el contrario, en AF-A, el incremento fue el doble de la sumatoria de los tratamientos individuales. Los resultados son similares a lo reportado por Molina B y cols. y debido a que la HU se adicionó tres horas antes de obtener cromosomas en metafase, es decir en la fase G₂, los autores sugieren, que la HU puede estar participando en un mecanismo post-replicativo⁶⁰. Con base a todo lo anterior, se puede concluir que la HU que se aplica en la fase G₂ del cc tanto en células normales, como en células AF-A incrementa las AC por un mecanismo que hasta el momento no ha sido descrito en la literatura y es necesario realizar estudios con la finalidad de ampliar el conocimiento que se tiene actualmente sobre la respuesta celular a la HU, por lo que se considera que el primer paso es conocer, si la función está relacionada con genes encargados de la vigilancia de la integridad genómica de los cuales la vía más conocida es la P53.

8.2 Incremento en los niveles de expresión después del tratamiento con MMC.

TP53 es un factor de transcripción responsable de activar un gran número de señales en respuesta a un daño en el ADN o a estrés replicativo. En condiciones normales, la proteína P53 se encuentra en niveles bajos, sin embargo, en respuesta a estrés, la proteína se activa, estabiliza y los niveles incrementan, lo que induce la activación o represión de múltiples genes involucrados en el mantenimiento de la integridad genómica, activando vías tales como, arresto del cc, reparación, replicación del ADN y apoptosis^{42,57,74}.

Los resultados del presente trabajo mostraron, que en las células normales expuestas a una baja concentración de MMC (10 ng/ml), los niveles de expresión *TP53* y de blancos transcripcionales de este gene no cambiaron en relación a las células sin tratamiento. Estos resultados eran de esperarse, ya que por una parte, la dosis de MMC a la cual fueron expuestas las células, no indujo un daño cromosómico y por lo tanto no es necesario activar a P53 para impedir una inestabilidad genómica en la células normales y por otra parte, de acuerdo a la literatura, las células normales a diferencia de las células AF, requieren una dosis más elevada de MMC (aproximadamente 10 veces) para activar a P53⁴⁶.

La concentración de MMC empleada (10 ng/ml) fue capaz de generar considerable daño cromosómico en las células AF-A en las cuales sí se encontró un incremento en los NE de *TP53*. En un estudio previo se demostró que las células AF activan P53 a concentraciones de MMC de 3 ó 10 nmol/L⁴⁶; en este trabajo se utilizó una dosis más baja, lo que demuestra que a concentraciones muy bajas de MMC, la células AF-A también activan a P53, lo cual también se observó con el aumento de expresión de 7 genes blancos de P53, tales como: *CDKN1A (P21)*, *DDB2*, *GADD45A*, *PCNA*, *SGK*, *TP53I3 (PIG3)* y *TRIAP1 (p53CSV)*. Hasta el momento existen pocos estudios sobre daño al ADN y la vía P53 en células AF. Freie B y cols., en células AF-C expuestas a radiación ionizante demostraron que los niveles de P53 se incrementaron modestamente. En otro estudio realizado por Waisfisz y cols. (2002), en células AF de los grupos de complementación A y C, expuestas a cisplatino (otro agente que induce enlaces cruzados en el ADN), se encontró que los genes *GADD45* y *PCNA* que son blancos transcripcionales de P53 no responden al tratamiento y únicamente observaron cambios en la expresión del gen *P21*⁷³. Nuestros resultados mostraron que la MMC además de inducir elevados niveles de expresión de *P21*, también incrementó los NE de *PCNA* y *GADD45A*. Es probable, que las diferencias observadas en ambos trabajos sean ocasionadas por el tipo de agente inductor del daño al ADN y es consistente con lo ya demostrado, en relación a que los blancos transcripcionales de *TP53* responden de manera diferencial dependiendo el tipo de células o el tipo de agente inductor del daño⁷⁵.

Como se mencionó, los estudios referentes a P53 en AF son escasos, sin embargo, en relación con otras células, los resultados están de acuerdo con diversos trabajos en los que se ha demostrado la inducción de la expresión de genes a través de la vía P53 después de un estrés genotóxico^{41,42}. *CDKN1A* o *P21*, es un inhibidor de ciclinas dependientes de cinasas y participa de manera activa en la detención del CC en las fases G_1 y G_2 . En G_1 , inhibe la formación del complejo *cdk2/cdk4* indispensable para la progresión de G_1 y, en G_2/M , inhibe la formación del complejo *cdc2/ciclina B*, arrojando a las células en esta fase⁴², de tal manera que un aumento en la expresión de este gen detendrá a las células en cualquiera de estas fases del cc. Otro gen importante en el mantenimiento de la detención del cc es *GADD45A*, el cual también incrementó sus NE después de la exposición a MMC. *GADD45A* coopera en la detección del cc, específicamente en el tránsito de G_2 a Mitosis, ya que al asociarse físicamente con la cinasa *cdc2*, disocia el complejo *cdc2/ciclina B1* y la célula no transita a mitosis⁴⁹. Sin embargo, *GADD45A*, no solo interviene en cc; también participa en reparación, al interactuar con el núcleo de histonas facilitando la relajación de la cromatina y permitiendo la accesibilidad de otras proteínas necesarias para la reparación^{41,49} y a pesar de que el mecanismo es desconocido, se ha encontrado que una elevada expresión de *GADD45A* induce apoptosis⁴⁹.

Por todo lo anterior, es posible concluir, que el daño cromosómico inducido por la MMC en AF-A, incrementa los niveles de *TP53* y la proteína se activa, lo que conduce a un incremento en la expresión de *P21* y *GADD45A*, con la finalidad de promover la detención del cc en G_1 y G_2/M , así como, la relajación de la cromatina, para reparar las lesiones en el ADN y/o impedir que las células con daño transiten a mitosis; sin embargo, por un mecanismo desconocido, las células están escapando a esta detención, ya que se observaron cromosomas en metafase con un elevado número de aberraciones cromosómicas.

PCNA es otro blanco transcripcional de P53, participa activamente en los procesos de replicación y reparación del ADN, ya que es un factor de procesividad de las ADN polimerasas e interactúa con otras proteínas de reparación del ADN, como la ADN

ligasa 1 y XPG, por lo que se ha sugerido que sirve como acoplador de otras proteínas que participan en los procesos de replicación y reparación del ADN⁴⁴. Nuestros resultados referentes a los niveles de expresión de *PCNA* son consistentes con lo reportado anteriormente por Xu y Morris (1999), quienes observaron después de un estrés genotóxico inducido por la radiación ionizante, que los niveles del RNAm de *PCNA* se incrementan en fibroblastos de embriones de rata⁴⁴. El incremento en la expresión de *PCNA* en cooperación con proteínas de reparación tales como *DDBE* o *XPE* y *XPC*, sugiere, que las células AF-A reconocen el daño cromosómico inducido por la MMC⁴¹ y promueven el acceso de otras proteínas de reparación, sin embargo, al estar alterada la vía AF esta reparación no es eficiente. Por otra parte, la MMC al activarse produce ROS, tales como oxígeno molecular, peróxido de hidrógeno y grupos hidroxilos⁷⁶, por lo que es de esperarse el incremento observado en los NE de *PIG3* (*TP53I3*) y *SOD1*. *PIG3* es un gen que comparte homología con las oxidoreductasas y es responsable de catalizar las reacciones de oxido-reducción y la formación de las ROS⁴¹ y *SOD1*, es responsable de destruir los radicales super oxido libres. Por otro lado, se sabe que la MMC induce apoptosis en AF, por lo que es de esperarse el incremento observado en la expresión de *TRIAP1*, el cual es un gen inhibidor de la apoptosis a través de P53.

8.3 Incremento en los niveles expresión después del tratamiento con HU.

Hasta la fecha, la HU es considerada como un inhibidor de la ribonucleótido reductasa, enzima responsable de la conversión de ribonucleótidos (rNTPs) a dNTPs y se utiliza con la finalidad de disminuirlos e inducir un colapso en la horquilla de replicación y un arresto reversible de la fase S del cc⁵⁷; sin embargo no existen reportes en donde se analice el efecto de la HU en la fase G₂ del cc. En el presente trabajo se mostró que las células normales y AF-A expuestas a la HU en la fase G₂ presentaron un daño cromosómico de tipo cromatídico, el cual fue más evidente en las células AF-A.

En los cultivos asincrónicos, se observó que la HU no induce el incremento de *TP53*; sin embargo, si se observó el incremento de expresión de genes relacionados con P53 en ambos tipos celulares. Estos resultados son consistentes con estudios en donde se ha demostrado, que agentes que inducen la inhibición de la síntesis del ADN activan a P53; en particular, se ha observado, que la HU promueve la acetilación de p53 en la lisina 382 y la fosforilación de las serinas 15 y 20, modificaciones postraduccionales que promueven la activación de la proteína^{59,61,77}.

En la actualidad, no existen reportes en donde se cuantifiquen los NE de genes relacionados con P53 después de la exposición a HU en células AF, por lo que no es posible comparar nuestros resultados con reportes previos, sin embargo, en relación con otras células, Nayak BK y Das GM, demostraron que en células normales y cancerosas, el tratamiento con HU activa genes relacionados con P53, tales como *P21*, *GADD45*, *BAX* y *PCNA*⁶². En células fetales de cerebro de ratón y de cáncer colorectal humano, la HU induce cambios en la expresión de la proteína p53 y en blancos transcripcionales, tales como *mdm2* y *p21*⁷⁸.

Nuestros resultados, son consistentes con los reportes anteriores, ya que también se observaron cambios en la expresión de *P21*, *GADD45A*, *MDM2* y *PCNA* tanto en células normales como en células AF-A. Es evidente, que la HU adicionada a cultivos asincrónicos normales y AF-A, activa genes de la vía P53 que son claves para llevar a cabo la detención del cc e impedir el tránsito a mitosis y la replicación de cromosomas con daño, tales como *P21* y *GADD45A*; sin embargo, debido a que en este trabajo se observó, daño cromosómico en metafase por exposición a la HU en fase G₂, es posible sugerir que una proporción de células escaparon del arresto del cc y lograron transitar a mitosis.

PCNA es otro gen que presentó niveles elevados de expresión en células normales y AF-A. Como ya se mencionó anteriormente *PCNA* participa activamente en el proceso de replicación del ADN e interacciona con proteínas de reparación del ADN⁴⁴. Nuestros resultados referentes a los niveles de expresión de *PCNA*, son consistentes

con lo reportado por Kurki y cols. (1987); ya que los autores demuestran, que la HU no bloquea la expresión de PCNA⁷⁹; por el contrario, en este trabajo se mostró que la exposición de las células a HU incrementa los NE de PCNA tanto en células normales y como en AF-A. Este incremento en los NE de PCNA en cooperación con otros genes, en los que también se observó un incremento de expresión (*DDB2* o *XPE* y *XPC*), sugiere que tanto las células normales y como las AF-A, detectan el estrés inducido por la HU y promueven el acceso de otras proteínas de reparación.

Una diferencia notable entre las células normales y las AF-A, fue la disminución de los NE de *BLM* (2.0 y 1.4, respectivamente) y *P21* (5.0 y 2.8, respectivamente) como respuesta a la HU. La proteína BLM juega un papel importante en la respuesta al daño al ADN durante la replicación, ya que localiza las rupturas de doble cadena en la horquilla de replicación y coordina la reparación del daño durante este proceso⁸⁰.

La disminución de la expresión de *P21* y *BLM* en células AF-A comparada con las normales, sugieren que las células AF-A responden pobremente al arresto del cc y a la identificación de las rupturas en el ADN, lo que puede en parte contribuir al incremento de AC observadas en AF-A (AC=0.7) en comparación a las células normales (AC=0.2).

En este trabajo, también se observó que en los dos tipos de células, la HU incrementa la expresión de *TNFRSF10B*, gen mediado por P53, que activa al factor de necrosis tumoral relacionado con apoptosis; lo que es consistente con reportes anteriores, en donde se ha observado que la HU induce apoptosis y activa genes transcripcionales de P53 relacionados a este mecanismo^{78,81}. En células AF-A a diferencia de las células normales, también se encontró, que la HU activa genes apoptóticos no relacionados con P53 (*NFKBIA*). Con nuestros resultados y los reportes de la literatura, se puede inferir que la HU induce apoptosis a través de la activación genes dependientes e independientes de P53. En relación a este proceso, se observó un incremento en la expresión de *TRIAP1*, gen inhibidor de la apoptosis regulado por P53 y mediador de sobrevivencia celular después de un daño al ADN⁸². El incremento en la expresión de este

gen en cultivos asincrónicos y su relación con la supervivencia celular, indica que una población de células del cultivo, sobrevive al daño inducido por la HU por un mecanismo dependiente de P53, lo que puede contribuir a la explicación de la existencia de metafases con daño observadas en ambos tipos celulares.

Leong y cols. (2003), demostraron que una gran variedad de estímulos, tales como un choque térmico, radiación UV y estrés oxidativo induce la expresión de SGK, componente clave en la respuesta a estrés celular⁸³. En este trabajo se observó un incremento en los niveles de expresión de SGK tanto en células normales y como en AF-A después de la exposición a HU; lo que está dentro de lo esperado ya que se sabe que la HU genera estrés oxidativo⁸⁴.

En resumen, en cultivos asincrónicos normales y de AF-A expuestos a la HU, se activan genes relacionados con P53 con la finalidad de detener a las células en G₁ y G₂ del cc, identificar e iniciar la reparación del ADN o bien si la célula está muy dañada, inducir apoptosis. Los resultados de este trabajo, sugieren que algunos productos génicos no están llevando a cabo su función de manera eficiente, ya que observamos metafases con daño cromosómico, por lo que es necesario estudiar la integridad y funcionalidad de las proteínas de los genes estudiados, con la finalidad de corroborar los hallazgos antes mencionados.

8.4 Niveles de expresión después del tratamiento con HU sobre un ADN dañado con MMC (MMC+HU).

Los niveles de expresión de los diferentes genes cuando las células fueron expuestas a la HU sobre ADN previamente con daño, mostró que las células normales responden a la HU e incrementaron los niveles de expresión de genes regulados por P53, tales como *BLM*, *P21*, *GADD45A*, *DDB2*, *MDM2*, *PCNA*, *RRM2*, *SGK* y *XPC*, involucrados en arresto del cc, reparación y replicación del ADN.

Esta respuesta puede atribuirse a la HU ya que en estas mismas células la MMC sola no indujo un incremento significativo de AC y no activo la vía p53. El incremento en AC después de la exposición a los dos agentes indica que una proporción de células normales con daño en el ADN está transitando a mitosis, lo cual podría relacionarse con los bajos NE de genes relacionados con la apoptosis como el *TP53* y *TNFRSF10B*, en respuesta a este estrés celular. Aunado a esto, la progresión a mitosis pudo ser favorecida por el incremento en la expresión de *MDM2*, el cual se ha demostrado que por mecanismos independientes de P53, interactúa con proteínas relacionadas con la progresión del cc, tales como RB (retinoblastoma) y el factor de transcripción E2F1⁸⁵.

En las células AF-A, el tratamiento con MMC+HU incrementó las AC 24 veces más en relación a las células sin tratamiento. Este incremento fue mayor a lo observado con los tratamientos individuales, es decir, se observó un aumento de 7.6 veces de AC en relación a la HU sola y de 2.9 en relación al tratamiento con MMC. Es interesante observar, que los valores de los NE de genes involucrados en el arresto celular y reparación, tales como *CDKN1A*, *GADD45A*, *PCNA* y *XPC* también estuvieron incrementados en relación a las células expuestas a los tratamientos individuales, posiblemente porque las células tienen un daño previo, el cual induce la expresión de estos genes con la finalidad de reconocer, reparar e impedir que las células con daño transiten a mitosis, sin embargo, esta detención y reparación no se lleva a cabo eficientemente y es probable que las células al reconocer la existencia de daño al ADN, estén expresando continuamente estos genes y al ser expuestas a un segundo agente que también induce daño en el ADN, las células nuevamente responden a este daño incrementado la expresión de los genes.

Los niveles de expresión de *TP53* o *PIG3*, gen relacionado con el metabolismo de las ROS y la apoptosis⁴¹, también fueron incrementados en relación al tratamiento con MMC, lo que era de esperarse, debido al gran daño inducido por la MMC y a la acumulación de especies ROS, lo que conlleva a la inducción de apoptosis dependiente de P53. En relación con este mecanismo, se observó que las células AF-A

expuestas a MMC+HU incrementaron la expresión de *NFKB1*, lo que indica que los dos agentes también inducen apoptosis por mecanismos independientes de P53. Sin embargo, específicamente en las células AF-A, el incremento en la expresión de genes apoptóticos, se contrarresta con un incremento en la expresión de genes anti apoptosis, tales como *TRIAP1* que es uno de los genes con mayores NE y debido a que *TRIAP1* también está relacionado con sobrevida celular⁸², puede ser una explicación a la existencia de metafases con un gran daño cromosómico observadas en la población de células AF-A, ya que de manera normal las células con gran daño se eliminan por apoptosis.

Por otra parte, es interesante observar, que las células AF-A expuestas a los dos agentes (MMC+HU) incrementaron la expresión de *RB1*, gen relacionado con la progresión del cc de G₁ a S⁸⁵. Es probable, que este incremento permita que una parte de la población de células asincrónicas AF-A, escape del arresto de *P21* y *GADD45A* y que por un mecanismo indirecto de P53, logre progresar a través del cc.

En conclusión, la MMC+HU induce genes que detectan el daño cromosómico como *XPC*, otros que detienen el cc tanto en G₁ como en G₂ como *P21* y *GADD45A* y otros que contribuyen a la reparación del daño cromosómico como *PCNA*, sin embargo, debido a que la célula es incapaz de reparar este daño, induce mecanismos de apoptosis (*TP53/3*) para eliminar a las células con daño, pero también induce la expresión de genes anti- apoptóticos (*TRIAP1*), con los cuales es probable que las células escapen de la muerte celular y progresen a mitosis con un nivel de AC elevado.

Todo lo mencionado anteriormente se ha podido integrar por el comportamiento de los genes que se estudiaron en este trabajo, sin embargo se debe tomar en cuenta que existen una gran cantidad de genes conocidos y desconocidos que intervienen en los procesos de reconocimiento de lesiones, reparación de daño, control del cc y de la apoptosis (entre otras vías celulares), que no se estudiaron en este trabajo, por lo que no es posible hacer una integración mayor. Consideramos que esta es una aportación

al conocimiento de los mecanismos que pueden estar dando lugar a la generación de células con un gran daño cromosómico y se sugiere la realización de estudios que exploren a nivel genómico estas respuestas celulares, por ejemplo por medio de microarreglos de expresión con lo cual se podría conocer la respuesta de una gran cantidad de genes y entender a mayor profundidad los mecanismos de vigilancia y mantenimiento de la integridad genómica en el humano.

7. ANEXO

9.1 TÉCNICAS

Prueba de micoplasma: En esta prueba se utilizó el Kit de detección de micoplasma de Roche (# 11296744001). La prueba consiste en un ensayo de ELISA que contiene anticuerpos para detectar las especies más comunes de micoplasma en los cultivos celulares de mamíferos, como son: *Mycoplasma arginini*, *M. hyorhinitis*, *M. laidlawii* y *M. orale*. La detección y el marcaje se realizaron con estreptoavidina y biotina.

Transformación de línea celular: De un paquete de células blancas de un donador femenino sano proveniente del banco de sangre del Instituto Nacional de Pediatría, se realizaron 3 cultivos celulares con medio RPMI 1640 (invitrogen) suplementado con suero fetal bovino inactivado al 10% (Hyclone), L-glutamina (1%), piruvato de sodio 100 mM (1%), MEM aminoácidos no esenciales 10mM (1%), gentamicina al 0.5% (invitrogen) y fitohemaglutinina (Invitrogen) y se incubaron a una temperatura constante de 37°C y con una atmósfera de CO₂ al 5% durante 72 horas.

Pasado este tiempo, las células se lavaron dos veces con solución de Hanks estéril y a cada tubo se le adicionó una concentración diferente del sobrenadante del virus Epstein Barr (VEB) (50%, 75% y 100%) y se re-incubaron en medio RPMI 1640. Los cultivos fueron monitoreados constantemente en un microscopio óptico invertido, para observar la morfología de las células. Dependiendo el cultivo y por lo tanto la concentración del VEB, las células fueron resuspendidas y 1 hora después se les retiró el sobrenadante. Se consideró una línea celular inmortalizada cuando esta fue capaz de mantenerse en cultivo por 10 días.

Cultivos celulares y tratamientos con MMC e HU: Por cada línea celular y tratamiento se sembraron 4 cultivos con una densidad celular 45×10^6 células (300,000 cel/ml) y una viabilidad mayor al 90%. Las células fueron mantenidas en medio RPMI 1640 suplementado con suero fetal bovino inactivado al 10%, L-glutamina (1%), piruvato de sodio 100 mM (1%), MEM aminoácidos no esenciales 10mM (1%) y gentamicina al 0.5%.

Todos los cultivos fueron incubados a una temperatura constante de 37°C y con una atmósfera de CO₂ al 5%. Para cada línea celular y tratamiento se realizaron tres replicas biológicas.

Tratamientos con MMC e HU se describen a continuación:

- a) Células sin tratamiento o controles (ST); estas células fueron incubadas en medio RPMI1640 por 24 horas, posteriormente se lavaron dos veces con solución de Hanks estéril y se realizó la técnica de AC y la extracción de RNA.
- b) Células + HU (2 mM); el manejo fue igual a las células ST, excepto que la incubación se realizó por 21 horas y posteriormente se adicionó HU por tres horas. Pasado este tiempo, las células fueron procesadas para AC y extracción del RNA. El análisis de las AC, se realizó en la fase G₂ del CC, ya que dos horas antes de terminar el tratamiento se tomó un alícuota y se agregó colchicina para obtener cromosomas en metafase.
- c) Células + MMC (10 ng/ml); las células fueron incubadas por 24 horas con MMC, se lavaron dos veces con solución salina de Hanks y se procesaron para AC y extracción del RNA.
- d) Células +MMC+HU; al inicio del cultivo se adicionó MMC (10 ng/ml) por 24 horas, posteriormente se lavaron con solución de Hanks estéril y se re-incubaron 21 horas con medio RPMI nuevo, pasado este tiempo, se adicionó HU (2mM) por tres horas (Figura 9); debido a que dos horas antes de finalizar el tratamiento se adicionó colchicina, el análisis de las AC fue realizado en la fase G₂ del CC.

Aberraciones cromosómicas: Dos horas antes de finalizar cada tratamiento, a los cultivos se les adicionó colchicina (1mg/ml) por 2 horas para obtener células en metafase. Posteriormente los tubos fueron centrifugados a 1500rpm durante 10 min, se desechó el sobrenadante, se resuspendió el paquete celular y se agregaron 10 ml de solución hipotónica de KCL 0.075M a 37°C durante 15 minutos. Pasado este tiempo, las células se prefijaron con 1 mL de fijador Carnoy (Metanol/ácido acético glacial 3:1) y se realizaron 3 lavados con fijador carnoy nuevo y frío. Las laminillas fueron hechas por medio de la técnica de goteo del paquete celular en portaobjetos limpios, se fijaron en una plancha a 40°C, se tiñeron con Wright 40% (Merck) y Giemsa 20% (Merck) durante 3 minutos y fueron codificadas por una persona ajena al estudio con el fin de realizar el análisis cromosómico en ciego.

Se analizaron 25 metafases por cada tratamiento y se cuantificó la frecuencia de rupturas cromosómicas, cromatídicas, fragmentos céntricos, acéntricos, cromosomas dicéntricos, cromosomas en anillo y figuras radiales. El promedio de las tres replicas biológicas de las frecuencias de AC por tratamiento fue comparado con una t de student para muestras pareadas e independientes y se consideraron diferencias significativas, cuando $p < 0.05$.

Extracción y purificación de RNA: Después de cada tratamiento, se cuantificó la densidad celular con una solución de azul tripano en una cámara Neubauer, ya que para la extracción del RNA se utilizan 5×10^6 células por cada 1 ml de trizol. Las células fueron resuspendidas lentamente en trizol y posteriormente se adicionaron 200 μ l de cloroformo frío, se resuspendieron en un vortéx por 10 segundos y se centrifugaron a 11,000 rpm x 15 min a 4°C. Después de la centrifugación la fase acuosa fue retirada y colocada en tubos eppendorf nuevos, adicionando 500 μ l de isopropanol frío. Los tubos fueron resuspendidos por inversión y colocados a -80°C por 1h.

Pasado este tiempo, se centrifugaron a 10,000 rpm x 10 min a 4°C, se desechó el sobrenadante y el RNA se lavó con 1 ml de metanol frío al 75%, el cual posteriormente fue desechado. Finalmente el RNA se resuspendió en 100µl de agua libre de nucleasas y se guardó a -80°C hasta su utilización. La cantidad y pureza del RNA se cuantificó en un espectrofotómetro ND-1000 (NanoDrop, Technologies) y su integridad se verificó por electroforesis en geles de agarosa al 1% .

Con el fin de asegurar la pureza del RNA, se eliminó el ADN genómico, realizando la siguiente mezcla: 45µg de RNA + 2.5 µl de Dnasa 1 + 10 µl de buffer RDD y esta mezcla se incubó a temperatura ambiente por 15 minutos (Rnase-Free Dnase set, Qiagen). La función del buffer RDD es facilitar la acción de la enzima y permitir la unión del RNA a la columna en momento de la purificación. Posteriormente, el RNA se purificó para remover los restos de la enzima, residuos de trizol y/o alcohol, así como para concentrar la muestra (Rneasy MinElute cleanup kit, Qiagen) (Figura 10).

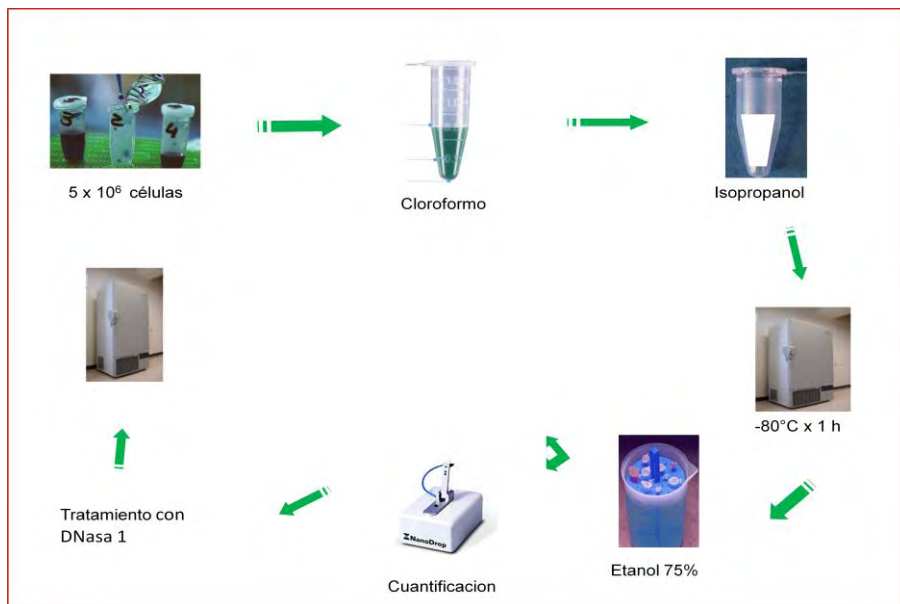


Figura 10. Diagrama general de la extracción del RNA

Reverso transcripción (RT) (High Capacity cDNA reverse Archive Kit, Applied Biosystems): 5 µg de RNA purificado fueron convertidos a cADN de cadena sencilla. En esta reacción se utilizaron dNTPs, oligonucleótidos al azar (la primera síntesis del ADN se produce eficientemente a partir de todos los tipos de RNA), buffer RT y la enzima reverso transcriptasa Multiscribe. El tiempo de incubación fue: 10 minutos a 25°C y 2 horas a 37°C, al finalizar este tiempo, se adicionaron 100 µl agua libre de nucleasas y se guardó el cADN a -20°C.

La mezcla de la reacción se describe a continuación:

| | |
|---|-------|
| * Buffer de transcripción reversa 10X | 10µl |
| * dNTPs 25X | 4µl |
| * "Primers al azar" 10X | 10µl |
| * Enzima Reverso transcriptasa Multiscribe [50U/µl] | 5µl |
| * Agua libre de nucleasas | 21µl |
| * RNA purificado [5µg] | 50µl. |
| Volumen Total = | 100µl |

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR cuantitativa, 2x universal master mix, Applied Biosystems): Se realizó la PCR cuantitativa para 21 genes, en todos los casos se realizaron tres replicas técnicas y dos replicas biológicas, utilizando al gen *GADPH* como control interno. El tipo de PCR cuantitativa que se analizó, fue relativo, es decir, se describieron los cambios de expresión en relación a un grupo de referencia (células control sin tratamiento) ⁷².

La reacción utilizada fue la siguiente:

| | |
|---|------------|
| * 2X master mix | 10 μ L |
| * Oligonucleótidos específicos a estudiar | 1 μ L |
| * cADN | 2 μ L |
| * Agua libre de nucleasas | 7 μ L |
| Volumen Total= | 20 μ L |

El termociclador y el analizador fue ABI Prism Sequence Detection System, Applied Biosystems, con las siguientes condiciones de incubación: Incubación con la enzima UNG* a 50°C por 2 min seguida de la activación de la enzima AmpliTaq Gold a 95°C por 10 min. Posteriormente se realizaron 40 ciclos de desnaturalización a 95°C por 15 seg y de alineamiento y extensión a 60°C por 1 min.

*AmpErase@uracil-N-glucosilase (UNG). Ayuda a prevenir la reamplificación de los productos de la PCR removiendo los uracil de las hebras del ADN.

Las sondas de los genes estudiados fueron de tipo taqman de Applied biosystems: *ABCB1* (Hs01070642_g1); *BLM* (Hs01119890_m1); *CCNB1* (Hs00259126_m1); *CDKN1A* o *P21* (Hs0035578_m1); *DDB2* o *XPE* (Hs00172068_m1); *GADD45A* (Hs00169255_m1); *GAPDH* (Hs99999905_m1); *HSPA8* (Hs01683591_g1); *MDM2* (Hs00234753_m1); *MYC* (Hs00153408_m1); *NFKB1* (Hs00765730_m1); *NFKB1A* (Hs00153283_m1); *TP53* (Hs001533349); *PCNA* (Hs00427214_g1); *RB1* (HS00153108_m1); *RRM2B* (Hs00394047_m1); *SGK* (Hs00178612_m1); *SOD1* (Hs005333490_m1); *TP5313* o *PIG3* (Hs00153208_m1); *TRIAP1* (Hs00429934_g1); *TNFRS10B* (Hs00366272_m1) y *XPC* (Hs00190295_m1).

En cada gen se determinó el punto de cruce (C_T), que es el número del ciclo en el cual la señal de fluorescencia se detecta. Los C_T fueron normalizados con el C_T del gen *GAPDH* (control interno) y los niveles de expresión después de cada tratamiento se obtuvieron comparando los C_T de las muestras sin tratamiento versus los valores de C_T de las muestras tratadas, aplicando las siguientes formulas⁷²:

- a) $\Delta C_T = C_T$ del gen de interés -- C_T de *GAPDH*
- b) $\Delta\Delta C_T = \Delta C_T$ del gen ST – ΔC_T del gen con tratamiento
- c) $2^{\Delta\Delta C_T} =$ Fold change o niveles de expresión.

De acuerdo con este método, el $\Delta\Delta C_T$ de las células sin tratamiento es 0, ya que en la formula b, los dos valores son iguales, es decir, $\Delta\Delta C_T = \Delta C_T$ ST - ΔC_T ST = 0 y aplicando la formula c, $2^0 = 1$, de tal manera, que el valor de expresión para las células sin tratamiento siempre es 1⁷².

Los cambios de expresión, se obtuvieron de los promedios de las dos replicas biológicas y tres replicas técnicas \pm error estándar y se compararon los niveles de expresión de las células sin tratamiento *versus* las células con tratamiento y de las células AF *versus* las células normales. Se consideró un gen con cambios de expresión significativos cuando $p < 0.05$ con la prueba de t-student o cuando el promedio de los valores de los niveles de expresión fueran ≥ 0.6 .

8. REFERENCIAS

1. D'Andrea AD y Grompe M. 2003. The Fanconi anemia/BRCA pathway. *Nat Rev* 3:23-34.
2. Joenje H y Patel KJ. 2001. The emerging genetic and molecular basis of Fanconi anemia. *Nat Rev Genet* 2:446-457.
3. Moustacchi E. 2003. Fanconi anemia. *Orphanet Encyclopedia*. October: 1-5
4. Fei P, Yin J y Wang W. 2005. New advances in the DNA damage response network of Fanconi anemia and BRCA proteins. *Cell Cycle* 4: e128-e134.
5. Meetei A, Levitus M, Xue Y, Medhurst A, Zwaan M, Ling Ch, Rooimans M, Bier P, Hoatlin M, Pals G, Winter J, Wang W y Joenje H. 2004. X-linked inheritance of Fanconi anemia complementation group B. *Nature Genet* 36:1219-1224.
6. Reid S, Schindler D, Hanenberg H, Barker K, Hanks S, Kalb R, Neveling K, Kelly P, Seal Sh, Freund M, Wurm M, Batish S, Lanch F, Yetgin S, Neitzel H, Ariffin H, Tischkowitz M, Mathew Ch, Auerbach A y Rahman N. 2007. Biallelic mutations in PALB2 cause Fanconi anemia subtype FA-N and predispose to childhood cancer. *Nature Genet* 39:162-4.
7. Alter BP. 2003. Cancer in Fanconi Anemia, 1927-2001. *Cancer* 97:425-440.
8. Mathew CG. 2006. Fanconi anemia genes and susceptibility to cancer. *Oncogene* 25:5875-5884.
9. Patel KJ y Joenje H. 2007. Fanconi anemia and DNA replication repair. *DNA repair (Amst)* 6:885-890.
10. Kennedy RD y D'Andrea AD. 2005. The Fanconi anemia /BRCA pathway new faces in the crowd. *Genes Dev* 19:2925-40.
11. Sala-Trepat M, Rouillard D, Escarceller M, Laquerbe A, Moustacchi E y Papadopoulo D. 2000. Arrest of S-phase progression is impaired in Fanconi anemia cells. *Exp Cell Res* 260:208-15.
12. Frias S, Gómez L, Molina B, Rojas E, Ostrosky P, y Carnevale A. 1996. Effect of hydroxyurea and normal plasma on DNA synthesis in lymphocytes from Fanconi anemia patients. *Mutat Res* 357:115-121.

13. Heinrich M, Hoatlin E, Zigler A, Silvey K, Bakke A, Keeble W, Zhi Y, Reifsteck C, Grompe M, Brown M, Megenis R, Olso S y Badby G. 1998. DNA Cross-linker induced G2/M arrest in group C Fanconi anemia lymphoblasts reflects normal checkpoint function. *Blood* 91:275-287.
14. Akkari YM, Beteman RL, Reifsteck CA, D`Andrea A, Olson S y Grompe M. 2001. The 4N cell cycle delay in Fanconi anemia reflects growth arrest in late S phase. *Mol Genet Metab* 74:403-412.
15. Rosselli F, Sanceau J, Wietzerbin J y Moustacchi F. 1992. Abnormal lymphokine production a novel feature of the genetic disease Fanconi anemia I. Involvement of interleukin 6. *Human Genet* 89:42-48.
16. Rosselli F, Sanceau J, Gluckman E, Wietzerbin J y Moustacchi E. 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 α *Blood* 83: 1216-1225.
17. Futaki M, Watanabe S, Kajigaya S y Lui J. 2001. Fanconi anemia protein, FANCG, is a phosphoprotein and is upregulated with FANCA after TNF- α treatment. *Biochem Biophys Res Commun* 218:347-351.
18. Rosselli F. 1998. Fanconi anaemia syndrome and apoptosis:state of the art. *Apoptosis* 3:229-236.
19. Pigullo S, Ferretti E, Lanciotti M, Bruschi M, Candiano G, Svahn J, Haneline L, Dufour C, Pistoia V y Corcione A. 2006. Human Fanconi A cells are susceptible to TRAIL-induce apoptosis. *British J Haematology* 1346:315-318.
20. Thompson LH. 2005. Unraveling the Fanconi anemia-DNA repair connection. *Nat Genet* 37:921-922.
21. Niedernhofer L. 2007. The Fanconi anemia signalosome anchor. *Moll Cel* 25:487-490.
22. Dunn J, Potter M, Rees A y Runger TM. 2006. Activation of Fanconi Anemia/BRCA pathway and recombination repair in the cellular response to solar ultraviolet light. *Cancer Res* 66:11140-11147.

23. Freie B, Ciccone S, Li X, Plett P, Orschell Ch, Srour E, Henenberg H, Schindler D, Lee S y Clapp W. 2004. A role for the Fanconi anemia C protein in maintaining the DNA damage-induced G2 checkpoint. *J Biol Chem* 279:50986-50993.
24. Mirchandani K y D'Andrea AD. 2006. The Fanconi anemia/BCRA pathway: A coordinator of cross-link repair. *Exp Cell Res* 312:2647-2653.
25. Park WR y Nakamura Y. 2005. P53CSV, a novel p53-inducible gene involved in the p53-dependent cell-survival pathway. *Cancer Res* 65:1197-1206.
26. Ridet A, Guillouf C, Duchaud E, Cundari E, Fiore M, Moustacchi E y Filippo Rosselli. 1997. Deregulated apoptosis is a hallmark of the Fanconi anemia syndrome. *Cancer Res* 57:1722-1730.
27. Guillouf C, Wang TS, Liu J, Walsh CE, Poirier GG, Moustacchi E y Roselli F. 1999. Fanconi anemia C protein acts at a switch between apoptosis and necrosis in mitomycin C-induced cell death. *Experimental Cell Res* 246:384-394.
28. Clarke A, Gibson F, Scott J, Myatt N y Rutherford T . 2004. Fanconi's anemia cell lines show distinct mechanisms of cell death in response to mitomycin C or agonistic anti-Fas antibodies. *Haematologica* 89:11-20.
29. Joenje H, Arwet F, Eriksson A, de Koning J y Ostra A. 1981. Oxygen-dependence of chromosomal aberrations in Fanconi's anemia. *Nature* 290:142-143
30. Yoshimitsu K, Kobayashi Y y Usui T. 1984. Decreased superoxide dismutase activity of erythrocytes and leucocytes in Fanconi's anemia. *Acta Haematol* 72:208-210.
31. Mukhopadhyay SS, Leung KS, Hicks MJ, Hastings PJ, Youssoufian H y Plon SE. 2006. Defective mitochondrial peroxiredoxin-3 results in sensitivity to oxidative stress in Fanconi anemia. *J Cell Biol* 175:225-235.
32. Esmer C, Sánchez S, Ramos S, Molina B, Frias S y Carnevale M. 2004. DEB test for Fanconi anemia detection in patients with atypical phenotypes. *Am J Med Genet* 124A:35-39.

33. Auerbach AD, Rogatko A y Schroeder-Kurt TM. 1989. International Fanconi Anemia Registry: Relation of clinical symptoms to diepoxibutane sensitivity. *Blood* 73:391-396.
34. Gurtan AM y D'Andrea AD. 2006. Dedicated to the core: understanding the Fanconi anemia complex. *DNA repair (Amst)* 5:1119-25.
35. Taniguchi T y D'Andrea AD. 2006. Molecular pathogenesis of Fanconi anemia: recent progress. *Blood* 107:4223-4233.
36. Hinz JM, Nham PB, Salazar EP y Thompson LH. 2006. The Fanconi anemia pathways limits the severity of mutagenesis. *DNA repair (Amst)* 5:875-84.
37. Howlet NG, Taniguchi T, Durkin SG y D'Andrea AD. 2005. The Fanconi anemia pathway is required for the DNA replication stress response and for the regulation of common fragile site stability. *Human Mol Genet* 14:693-701.
38. Grompe M y van de Vrugt H. 2007. The Fanconi family adds a fraternal twin. *Cell* 12:661-662.
39. Sims A, Spiteri E, Sims III R, Arita A, Lach F, Landers T, Wurm M, Freund M, Noveling K, Hanenberg H, Auerbach A y Huang T . 2007. FANCI is a second monoubiquitinated member of the Fanconi anemia pathway. *Nat Struct Mol Biol* 14:564-567.
40. Wang X y D'Andrea A. 2004. The interplay of Fanconi anemia proteins in the DNA damage response. *DNA repair (Amst)* 3:1063-1069.
41. Harms K, Nozell S y Chen X. 2004. The common and distinct target genes of the p53 family transcription factors. *CMLS Cell Mol Life Sci* 61:822-842.
42. Helton ES y Chen X. 2007. P53 modulation of the DNA damage response. *J Cell Biochem* 100:883-896.
43. Vousden K y Lu X. 2002. Live or Let Die: the cells's response to p53. *Nat Rev Cancer* 2:594-604.
44. Xu J y Morris GF. 1999. P53-mediated regulation of proliferating cell nuclear antigen expression in cells exposed to ionizing radiation. *Mol Cel Biol* 19:12-20.
45. Oren M. 2003. Decision making by p53: life, death and cancer. *Cell Death Differ* 10:431-442.

46. Kruyt F, Dijkmans LM, Van den Berg TK y Joenje H. 1996. Fanconi anemia genes act to suppress a cross-linker-inducible p53-independent apoptosis pathway in lymphoblastoid cell lines. *Blood* 87:938-948.
47. Pipaon C, Real PJ y Fernández-Luna JL. 2005. Defective binding of transcriptional repressor ZEB via DNA methylation contributes to increased constitutive levels of p73 in Fanconi anemia cells. *FEBS Letters* 579:4610-4614.
48. Liu T, Howlett NG, Deng M, Langenau DM, Hsu K, Rhodes J, Kanki JP, D'Andrea AD y Look AT. 2003. Knockdown of zebrafish *Fancd2* cause developmental abnormalities via p53-dependent apoptosis. *Dev Cell* 5:903-914.
49. Zhan Q. 2005. *Gadd45a*, p53-and BRCA1-regulated stress protein, in cellular response to DNA damage. *Mutat Res* 569:133-143.
50. Houghtaling S, Granville L, Akkari Y, Torimaru Y, Olson S, Finegold M y Grompe M. 2005. Heterozygosity for p53 (*Trp53^{+/-}*) accelerates epithelial tumor formation in Fanconi anemia complementation group D2 (*Fancd2*) knockout mice. *Cancer Res* 65:85-91.
51. Liebetrau W, Budde A, Savoia A, Grummt F y Hoehn H. 1997. P53 activates Fanconi anemia group C gene expression. *Hum Mol Genet* 6:277-283.
52. Freie B, Li X, Ciccone S, Nawa K, Cooper S, Vogelweid C, Schantz L, Haneline L, Orazi A, Broxmeyer H, Lee S y Clapp DW. 2003. Fanconi anemia type C and p53 cooperate in apoptosis and tumorigenesis. *Blood* 102:4146-4151.
53. Yarbrow, JW. Mechanism of action of Hydroxyurea. *Seminars in Oncology* 19 (3) 1992: 1-14.
54. Blumenreich MS: Hydroxyurea in: Cuitkovic E, Droz JP, Armand JP y Koury S (eds) "handbook of chemotherapy in clinical oncology"., 1993, 359-360.
55. Liu X, Zhou B, Xue L, Shih J, Tye K, Lin W, Qi C, Chu P, Un F, Wen W y Yen Y. 2006. Metastasis-suppressing potential of ribonucleotide reductase small subunit p53R2 in human cancer cells. *Human Cancer Biol* 12:6337-6344.
56. Koc A, Wheeler LJ, Mathews CK y Merrill GF. 2004. Hydroxyurea arrests DNA replication by mechanism that preserves basal dNTP pools. *J Biol Chem* 279:223-230.

57. Mattia M, Gottifredi V, Mckinney K y Prives C. 2007. P53-dependent p21 mRNA elongation is impaired when DNA replication is stalled. *Mol Cell Biol* 27:1309-1320.
58. Lima P, Cardoso P, Khayat A, Oliveira M y Rodriguez R. 2003. Evaluation of the mutagenic activity of Hydroxyurea on the G1-S-G2 phases of the cell cycle: an in vitro study. *GMR* 2:328-333.
59. Ho Ch, Sui WY, Lau A, Chan WM, Arooz T y Poon R. 2006. Stalled replication induces p53 accumulation through distinct mechanisms from DNA damage checkpoint pathways. *Cancer Res* 66:2233-2240.
60. Molina B, Gómez L, Hernández-Jardines A, Ortiz R, Carnevale A, Altamirano-Lozano M y Frias S. Hydroxyurea produce chromosome damage in Fanconi anemia cells in A,B,C, D1 y E complementation groups. *En proceso*.
61. Marusyk A, Wheeler LJ, Mathews CK y DeGregori J. 2007. P53 mediates senescence-like arrest induced by chronic replication stress. *Mol Cell Biol* 27:5336-5351.
62. Nayak BK y Das GM. 2002. Stabilization of p53 and transactivation of its target genes in response to replication blockade. *Oncogene* 21:7226-7229.
63. Hakansson P, Hofer A y Thelander L. 2006. Regulation of mammalian ribonucleotide reduction and dNTP pools after DNA damage and in resting cells. *J Biol Chem* 281:7834-7841.
64. Cory JG y Sato A. 1983. Regulation of ribonucleotide reductase activity in mammalian cells. *Mol Cell Biochem* 53-54:257-266.
65. Tanaka H, Arakawa H, Yamaguchi T, Shiraishi K, Fukuda S, Matsui K, Takei Y y Nakamura Y. 2000. A ribonucleotide reductase gene involved in a p53' dependent cell-cycle checkpoint for DNA damage. *Nature* 404:42-49.
66. Wang S-L, Han J-F, He X-Y, Wang X-R y Hong J-Y. 2006. Genetic variation of human cytochrome p450 reductase as a potencial biomarker for Mitomycin C-induced cytotoxicity. *Drug Metab Dispos* 35:176179.
67. Beretta G, Cova B. Mitomycin C in: Couitkovic E, Droz JP, Armand JP, Koury S (8eds) "handbook of chemotherapy in clinical oncology"., 1993, 299-302.
68. Paz M, Kumar G, Glover M, Waring M y Tomasz M. 2004. Mitomycin Dimers: Polyfunctional cross-linkers of DNA. *J Med Chem* 47:3308-3319.

69. Matsumoto A, Vos J-M y Hanawalt PC. 1989. Repair analysis of mitomycin C-induced DNA crosslinking in ribosomal RNA genes in lymphoblastoid cells from Fanconi's anemia patients. *Mutat Res* 217:185-192.
70. Claassen E, Kortbeek H y Arwert F. 1986. Effects of mitomycin C on the rate of DNA synthesis in normal and Fanconi anemia cells. *Mutat Res* 165:15-19.
71. Niedernhofer L, Lalai A and Hoeijmakers. 2005. Fanconi anemia (cross)linked to DNA repair (Amst). *Cell* 123:1191-1198.
72. Livak K y Schmittgen T. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods* 25:402-408.
73. Waisfisz Q, Miyazato A, P de Winter J, Lui JM y Joenje H. 2002. Analysis of baseline and cisplatin-inducible gene expression in Fanconi anemia cells using oligonucleotide-based microarrays. *Blood* 2:1-9.
74. Rahman-Roblick R, Johannes U, Hellman U, Conrotto P, Lui T, Becker S, Hirschberg D, Jornvall H, Auer G y Wiman KG. 2007. P53 targets identified by protein expression profiling. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:5401-5406.
75. Zhao R, Gish K, Murphy M, Yin Y, Notterman D, Hoffman WH, Tom E, Mack D y Levine AJ. 2000. Analysis of p53-regulated gene expression patterns using oligonucleotide arrays. *Genes Dev* 14:981-993.
76. Joenje H y Oostra AB. 1983. Effect of oxygen tension on chromosomal aberrations in Fanconi anaemia. *Hum Genet* 65:99.
77. Gottifredi V, Shieh S, Taya Y y Prives C. 2001. P53 accumulates but is functionally impaired when DNA synthesis is blocked. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:1036-1041.
78. Woo GH, Bark EJ, Nakayama H y Doi K. 2006. Molecular mechanisms of Hydroxyurea (HU)-induced apoptosis in the mouse fetal brain. *Neurotoxicol Teratol* 28:125-34.
79. Kurki P, Lotz M, Ogata K y Tan EM. 1987. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA)/cyclin in activated human T lymphocytes. *J Immunol* 138:4114-4120.
80. Davalos AR y Campisi J. 2003. Bloom syndrome cells undergo p53-dependent apoptosis and delayed assembly of BRCA1 and NBS1 repair complex at stalled replication forks, *J Cell Biol* 162:1197-1209.

81. Huyghe P, Dassonneville L, Fenaux P y Bailly C. 2004. Hydroxyurea-induced apoptosis in an EBV-immortalized lymphoblastoid cell line. *Oncol Res* 14:235-245.
82. Woong-Ryeon P y Yusuke N. 2005. p53CSV, a Novel p53-Inducible Gene Involved in the p53-Dependent Cell-Survival Pathway. *Cancer Res* 65: 1197-1206.
83. Leong ML, Maiyar AC, Kim B, O'Keeffe BA y Firestone GL. 2003. Expression of the serum- and glucocorticoid-inducible protein kinase, Sgk, is a cell survival response to multiple types of environmental stress stimuli in mammary epithelial cells. *J Biol Chem* 278:5871-5882.
84. Sakano K, Oikawa S, Hasegawa K y Kawanishi S. 2001. Hydroxyurea induces site-specific DNA damage via formation of hydrogen peroxide and nitric oxide. *Jpn J Cancer Res* 99:1166-1174.
85. Sdek P, Ying H, Chang DLF, Qui W, Zheng H, Touitou R, Allday M y Xiao Z. 2005. MDM2 promotes proteasome-dependent ubiquitina-independent degradation of retinoblastoma protein. *Mol Cell* 20: 699-708.

Sitios web

www.ncbi.nlm.nih.gov

Accepted Manuscript

Title: Differential expression of *TP53* associated genes in Fanconi anemia cells after Mitomycin C and Hydroxyurea treatment.

Authors: Angélica Martínez, John M. Hinz, Laura Gómez, Bertha Molina, Hilda Acuña, Irene M. Jones, Sara Frias, Matthew A. Coleman



PII: S1383-5718(08)00177-0
DOI: doi:10.1016/j.mrgentox.2008.06.012
Reference: MUTGEN 401494

To appear in: *Mutation Research*

Received date: 15-11-2007
Revised date: 13-6-2008
Accepted date: 17-6-2008

Please cite this article as: A. Martínez, J.M. Hinz, L. Gómez, B. Molina, H. Acuña, I.M. Jones, S. Frias, M.A. Coleman, Differential expression of *TP53* associated genes in Fanconi anemia cells after Mitomycin C and Hydroxyurea treatment., *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* (2007), doi:10.1016/j.mrgentox.2008.06.012

This is a PDF file of an unedited manuscript that has been accepted for publication. As a service to our customers we are providing this early version of the manuscript. The manuscript will undergo copyediting, typesetting, and review of the resulting proof before it is published in its final form. Please note that during the production process errors may be discovered which could affect the content, and all legal disclaimers that apply to the journal pertain.

Differential expression of *TP53* associated genes in Fanconi anemia cells after Mitomycin C and Hydroxyurea treatment.

Angélica Martínez^{1,2}, John M. Hinz³, Laura Gómez¹, Bertha Molina¹, Hilda Acuña¹, Irene M. Jones⁴, Sara Frias^{1*} and Matthew A. Coleman^{4*}

1. Laboratorio de Citogenética, Instituto Nacional de Pediatría, México DF.
2. Posgrado en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico DF.
3. School of Molecular Biosciences, Washington State University, Pullman Washington, USA.
4. Chemical, Materials, Earth and Life Sciences Directorate, Lawrence Livermore National Laboratory, Livermore California, USA.

*S Frias and M.A. Coleman share equal corresponding authorship.

*Sara Frias

phone and fax (5255)10845533

e-mail sarafrias@yahoo.com

* Matthew A. Coleman.

phone: 925-423-7687

fax: 925-424-3130

email: coleman16@llnl.gov

Key words: Fanconi anemia, Hydroxyurea, Mitomycin C, *TP53*, gene expression, cell cycle arrest, apoptosis.

ABSTRACT

Fanconi anemia (FA) is a rare, heritable chromosomal instability disease characterized by several congenital defects and cancer predisposition. Functional interactions between specific FA proteins and DNA damage response and repair activities have been reported, but the interplay between these mechanisms for maintaining genomic stability are not well understood. Many DNA damage response proteins are transcriptionally regulated by the tumor suppressor protein p53 (TP53), suggesting an important regulatory role for the DNA damage and stress response pathway. To better understand the association between FA and the DNA damage stress response we analyzed the levels of chromosomal damage and damage mediated gene transcription responses in lymphoblastoid cells derived from normal individuals and patients carrying the most common FA complementation group (FA-A). Chromosomal aberrations were first measured after exposure to Mitomycin C (MMC) or Hydroxyurea (HU). Aliquots of the same cell were then assayed for the transcriptional response of 21 DNA damage and stress response genes using quantitative real-time PCR. The FA-A lymphoblastoid cells showed significant increases in the frequency of chromosome aberrations relative to non-FA-A lymphoblastoid lines after MMC treatment. The MMC induced damage was correlated with a general increase in expression of *TP53*-modulated DNA damage stress response genes involved in processes such as DNA repair, cell cycle progression, and apoptosis. Following HU treatment FA cells showed a

decreased induction of CAs with much less transcriptional differences between targeted genes. Overall, the differences between the normal and FA-A cells after genotoxic treatments imply an increased activation and reliance of FA cells on the down-stream activities of *TP53* for prevention of cell killing and chromosome damage from interstrand crosslinks but not for general replication arrest and double strand breaks. Furthermore, these results imply a regulatory connection between the FA pathway and activation of TP53 for responding to DNA damage. Alterations in the regulation of the DNA damage response may be related to the complex phenotypes seen in FA patients.

1. INTRODUCTION

Fanconi anemia (FA) is a rare recessive hereditary disease characterized by several congenital defects such as hyperpigmentation of the skin, retarded growth, pancytopenia, progressive bone marrow failure and increased risk of cancer including acute myeloid leukemia and squamous cell carcinomas [1-3]. Cells from FA patients have a high frequency of chromosomal aberrations (CA), including single- and double-strand breaks as well as tri- and quadri-radial chromosomes. FA cells also demonstrate a high sensitivity to induction of CAs with treatment of DNA inter-strand crosslinking agents such as mitomycin C (MMC) and diepoxybutane (DEB), which serves as a diagnostic “Gold Standard” test for the disease [4,5].

FA is genetically heterogeneous with at least 13 complementation groups: FA-A, B, C, D1 (BRCA2), D2, E, F, G, I, J (BRIP1), L (PHF9) M and N (PALB2) [6]. Complementation groups A, C, and G are the most common, representing 65%, 15% and 10% of the individuals with FA, respectively [7]. Interestingly, defects in any of the FA genes result in similar clinical and cellular phenotypes, suggesting a common functional “pathway” for the FA proteins [7]. After treatment of cells with DNA damage-inducing or replication-disrupting agents such as MMC, ionizing radiation (IR) or hydroxyurea (HU), eight of the FA proteins (FANCA, B, C, E, F, G, L, and M) form a nuclear complex [8-10]. Formation of this complex is essential for the monoubiquitylation of two other FA proteins, FANCD2 and FANCI, which may be critical for repair at double-strand

breaks (DSB) or stalled replication forks, where other repair related proteins including NBS1, BRCA2/FANCD1, PALB2/FANCN, BRCA1, RAD51, and PCNA are co-localized [5,7,11-14].

Though there are numerous studies assessing FA hypersensitivity to DNA cross-linking agents, few studies have explored the genotoxicity to FA cells of DNA replication inhibitors such as HU. HU is an inhibitor of the ribonucleotide reductase (RR), responsible for reduction of ribonucleotides to deoxyribonucleotides, and increasing the pools of deoxyribonucleotide triphosphates (dNTP) during the G1 and S phases of the cell cycle necessary for normal DNA replication [10,15]. Upon treatment with HU, the cell's limited supply of dNTP rapidly decreases, leading to stalled replication forks [16], and inducing low levels of DNA breaks [17]. Studies with normal and patient-derived FA lymphoblasts have shown that HU treatment inhibited DNA synthesis and caused activation of the FA pathway, as evidenced by ubiquitylation of specific proteins such as FANCD2 and the replication protein PCNA [10, 18].

The genomic instability and chemical sensitivity of FA cells suggest a defect in response to DNA damage or repair, likely forcing the cell to rely on other DNA damage responses to promote cell survival and genomic integrity. Understanding the damage-response mechanisms a cell employs in the absence of a functional FA pathway can help elucidate the role of the FA proteins after exposure to DNA damaging agents or replication inhibitors. The tumor suppressor protein p53 (TP53), which plays a crucial role in preventing genomic instability and inappropriate cell proliferation following genotoxic stress [19], is a

likely candidate for having a particularly critical role in maintaining the genetic integrity of an FA cell.

After DNA damage, nucleotide depletion, hypoxia, or oncogene overexpression, *TP53* acts as a transcription factor for close to 100 genes responsible for DNA damage signaling, repair, cell cycle checkpoint activation, and apoptosis, including *PCNA*, *BRACA1*, *p21*, *MDM2*, *PUMA*, and *TP53I3* (*PIG3*) [19]. Recent studies with mouse and zebrafish models of FA have implied that FA proteins and TP53 work cooperatively to maintain genomic stability for the prevention of tumorigenesis and apoptosis. Houghtaling *et al.* demonstrated that *Fancc* mutant mice heterozygous at *Trp53* developed blood and solid malignancies more rapidly than mice deficient in only one or the other gene [20]. Consistent with these findings, *Fancd2/Trp53* double knock-out mice showed an increased spectrum of tumors relative to parental controls, and cells from these mice exhibited increased aneuploidy and gross chromosomal rearrangements relative to cells from either of the single knock-outs [20]. In addition, Lui *et al.* demonstrated that a defect in *Fancd2* in developing zebrafish tissue induced inappropriate activation of Trp53-mediated programmed cell death [21], highlighting the relationship between TP53 and the FA pathway.

In this study we evaluated the changes in transcription of Tp53-mediated DNA damage genes in FA cells to potentially elucidate the nature of the increased cellular stresses associated with DNA damage in the absence of a functional FA pathway. We evaluated the induction of CAs after treatment with the interstrand crosslinking agent Mitomycin C (MMC) and the replication

inhibitor HU in two lymphoblastoid cell lines derived from Fanconi anemia complementation group-A patients and two lymphoblastoid cell lines from healthy individuals. In addition we used quantitative real-time PCR (QRT-PCR), the traditional and sensitive method for assessing gene expression at the mRNA level [22], in the same treated cells to assess the change in expression of 21 diverse genes associated with responses to DNA damage and cellular stress, most of which are under TP53 transcriptional regulation.

2. METHODS

2.1 Cell culture and drug treatment

Epstein-Barr virus (EBV) transformed normal lymphoblast cell lines (6846 and NL-1) and FA complementation group A lymphoblastoid cell lines (HSC72N and VU817) were grown in RPMI 1640 medium supplemented with 10% fetal bovine serum (HyClone, UT, USA), 1% L-glutamine (200mM), 1% MEM non essential amino acids (100 μ M), 1mM sodium pyruvate, and gentamicin 10mg/ml (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), and maintained at 37°C in 5% CO₂.

Drug treatments were performed on 4.5×10^7 exponentially growing cells with MMC at 10ng/ml, (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) for 24h, or HU at 2mM (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) for 3 h. After each treatment cells were washed twice with Hanks solution and the concentration and cell viability were determined with trypan blue stain (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). After each treatment, the cells were processed to assess chromosomal damage and to quantify the expression levels by RT PCR. Each experiment was done in triplicate for each of the two normal and FA-A cell lines.

2.2 Chromosome analysis

Colcemid (0.1 μ g/ml) was added to exponentially growing cultures for 120 min to obtain mitotic cells. Cells were treated with a hypotonic solution of 75 mM KCl for 20 min at 37°C, then fixed with cold 3:1 methanol/ glacial acetic acid. Cells were dropped onto glass slides to obtain metaphase spreads. Slides were

stained with Wright/Giemsa stain, and coded by an independent individual to ensure blind scoring. Twenty five metaphase spreads were analyzed for each condition and chromosomal aberrations scored, including single- and double-strand breaks, fragments, ring, tri- and, quadri-radial chromosomes. The average chromosomal aberrations per cell and standard errors were calculated from three biological replicates and statistical significance determined using student's t-test.

2.3 RNA extraction

Briefly, total RNA was extracted from 5×10^6 cells using Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) reagent and RNeasy columns (Qiagen, Valencia, CA, USA) following the manufacturer's instructions. RNA was resuspended in RNase-free water (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), and quantified using a Nanodrop ND 1000 spectrophotometer (Nanodrop Technologies, Wilmington, DE, USA). The quantity and quality was verified using a BioAnalyzer (Agilent Technologies, Sta Clara, CA, USA) or by agarose gel electrophoresis. RNA was stored at -80°C .

2.4 Quantitative Real-time PCR

For quantification using real-time PCR analysis, 5 μg of RNA was converted to single-strand cDNA using the High-Capacity cDNA archive kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The *GAPDH* and *ACTIN* genes were used as internal controls. The primers (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) for the selected genes of interest were as follows: *ABCB1*

(Hs01070642_g1); *ACTA* (Hs00426835_g1); *BLM* (Hs01119890_m1); *CCNB1* (Hs00259126_m1); *CDKN1A (P21)* (Hs0035578_m1); *DDB2 (XPE)* (Hs00172068_m1); *GADD45A* (Hs00169255_m1); *GAPDH* (Hs99999905_m1); *HSPA8* (Hs01683591_g1); *MDM2* (Hs00234753_m1); *MYC* (Hs00153408_m1); *NFKB1* (Hs00765730_m1); *NFKB1A* (Hs00153283_m1); *TP53* (Hs001533349); *PCNA* (Hs00427214_g1); *RB1* (Hs00153108_m1), *RRM2B* (Hs00394047_m1); *SGK* (Hs00178612_m1), *SOD1* (Hs005333490_m1); *TP53I3 (PIG3)* (Hs00153208_m1); *TRIAP1* (Hs00429934_g1); *TNFRS10B* (Hs00366272_m1) and *XPC* (Hs00190295_m1).

PCR was performed with thermal cycling parameters of 50°C for 2 min, 95°C for 10 min and 40 cycles of 95°C for 15 s, and 60°C for 1 min. Each PCR reaction was run in triplicate for two independent experiments to obtain the average and standard error. Relative gene expression levels after each treatment were obtained for comparison with the untreated cells using the modified CT method [22]. Briefly, the cycle number at which the fluorescent signal crosses the detection threshold was denoted the threshold cycle (C_T). The C_T values of the target genes of interest were normalized to the *GAPDH* gene (internal control) using the calculation $\Delta C_T = C_T^{\text{target gene}} - C_T^{\text{GAPDH}}$, then was applied in the formula $\Delta\Delta C_T = C_T^{\text{untreated cells}} - C_T^{\text{treated cells}}$ and the fold change was calculated as $2^{-\Delta\Delta C_T}$ [22]. We used the student t-test to determine the statistical significance when comparing the expression levels between control and MMC- or HU- treated normal and FA-A cells. A gene was considered to have a significant change in

expression level when the difference in fold change had a $p < 0.05$ or the mean fold change of the sample conditions had a difference ≥ 0.6 fold.

Accepted Manuscript

3. RESULTS

3.1 *FA-A cells are sensitive to chromosome aberration induction by MMC and HU .*

Table 1 shows the average frequencies and standard errors of the chromosomal aberrations from the two normal and two FA-A lymphoblast cell lines. Consistent with the previously reported hypersensitivity of FA cells to crosslinking agents [11,23], FA-A lymphoblasts treated with a low dose (10 ng/ml) of MMC for 24 hours showed significant increases in the frequency of chromosome breaks relative to untreated FA-A cells (1.8 versus 0.22 aberrations/cell $p < 0.05$). This increase is ~2-fold higher than the increase in normal cells (0.12 versus 0.03 aberrations/cell, an increase that was not significantly different). A variety of CAs was observed in the MMC-treated FA cells, including chromosome and chromatid breaks, fragments, and tri- and quadri-radial figures. As expected [24], the normal cells (0.2 versus 0.03 aberrations/cell) and FA cells (0.7 versus 0.22 aberrations/cell) both showed significant increases ($p < 0.05$) in the induction of CAs after a 3 hour treatment with 2 mM HU compared to untreated cells (Table 1). We observed that the HU-induced chromosomal damage consisted primarily of chromatid breaks (data not shown).

3.2 Gene expression analysis after MMC and HU exposure.

3.2.1 Selected gene expression targets represent a wide range cellular processes.

We evaluated the expression of genes previously demonstrated to be transcriptionally regulated by *TP53*, or associated with responses to cellular stress [25-27]. The 21 genes selected for evaluation and the pathways in which they act are listed in Table 2. The genes selected included *TP53* and 12 genes directly regulated by *TP53*: *BLM*, *CDKN1A* or *P21*, *DDB2* or *XPE*, *GADD45A*, *MDM2*, *PCNA*, *RRM2B*, *TP53I3* (*PIG3*), *SGK*, *TRIAP1*, *TNFRS10B*, and *XPC*; 3 genes indirectly related to *TP53* function (regulated by gene products under *TP53* regulation; *CCNB1*, *HSPA8*, and *RB1*) [28]; and 5 genes not directly associated with *TP53* regulation (*ABCB1*, *MYC*, *NFKB1*, *NFKB1A*, and *SOD1*). The overall set of 21 genes represents a wide range of cellular processes including drug resistance, DNA repair, cell cycle checkpoint regulation, DNA replication, cell stress response, proliferation, differentiation, and apoptosis.

3.2.2 FA-A cells, but not normal cells, show increased expression of *TP53*-associated genes after exposure to MMC.

We measured the fold change (relative to untreated cells) in expression level after treating the FA-A and normal cell lines with a low dose of MMC (10 ng/ml) for 24 hours.

After MMC exposure, the normal cell lines showed only modest changes in expression levels (0.8- to 1.5-fold change), none of which was found significant

($p > 0.05$) (Table 3). For example, the expression of *MYC* and *SOD1* genes showed no response (0.8- and 0.9-fold change, respectively), whereas *DDB2* (*XPE*), *CDKN1A* (*P21*), *RRM2B*, and *TP53I3* (*PIG3*) showed modest increases in expression levels (1.4- and 1.5-fold change).

In contrast, after treatment with MMC, FA-A cells showed a general increase in transcription for most of the genes selected for the study (ranging from 1.2 to 3.7 fold change) (Table 3). In total, 16 of the 21 genes screened showed an increase in the FA-A cells relative to the normal cells after exposure to MMC. Those with significantly increased expression levels ($p < 0.05$ or difference ≥ 0.6 fold) included *TP53* and 7 genes transcriptionally regulated by *TP53*: *TR1AP1*, *TP53I3*, *CDKN1A*, *PCNA*, *DDB2*, *SGK*, and *GADD45A* (3.7, 2.8, 2.7, 2.5, 2.3, 2.2, 2.0 fold increases, respectively). Two genes indirectly related to *TP53*, *CCNB1* and *HSPA8*, also had significant increased expression levels (2.8 and 2.6 fold change, respectively). *SOD1*, not regulated by *TP53*, but involved in oxidative stress, also showed increases in transcript levels (1.9 fold change, $p < 0.05$) (Table 3).

3.2.3 FA-A and normal cells showed similar changes in gene expression after exposure to HU.

To investigate the transcriptional activation of the 21 genes in response to HU exposure, we measured the fold change (relative to untreated cells) in expression levels after treating two different FA-A cell lines and two normal cell lines with HU (2mM) for 3 hours. The cells analyzed for gene expression levels

were from the same exposures as those used for the CA studies (described above).

HU exposure induced a clear transcriptional response in normal cells. Changes in expression ranged between 0.5- to 5.0-fold. *TP53* expression did not change after HU treatment, but 11 of the 12 genes regulated by *TP53* showed significant increases in expression levels ($p < 0.05$ or difference ≥ 0.6). Those genes were *CDKN1A* (5.0 fold change), *GADD45A* (3.3 fold change), *XPC*, *BLM* (2.0 fold change), *TRIAP1* (1.9 fold change), *MDM2*, *PCNA*, and *SGK* (1.7 fold change), *DDB2*, *RRM2*, and *TNFRS10B* (1.6 fold change) (Table 3). The remaining nine genes showed no significant change in their expression levels (Table 3).

After HU exposure FA-A cells showed a range of expression level differences from 0.9- to 2.8-fold. A total of 13 of the 21 genes showed a significant increase in expression when compared to the untreated FA-A cells, including 10 genes regulated by *TP53*: *CDKN1A*, *GADD45A* (2.8 fold change), *PCNA*, *TNFRS10B*, and *TRIPA1* (2.1 fold change), *XPC* and *RRM2B* (1.9 and 1.7 fold change, respectively), *SGK* (1.8 fold change), and *MDM2* and *DDB2* (1.6 fold change). Also responsive to HU in FA-A cells was one stress response gene indirectly associated with *TP53* (*HSPA8*, 1.6 fold change), and 2 genes not regulated by *TP53* (*NFKB1A* with 1.8 fold change and *NFKB1* with 1.7 fold change) (Table 3).

Interestingly, though the expression of most of the *TP53*-associated genes was increased in the FA-A cells after treatment with HU, the same genes

showed similar increased expression in the normal cells as well, with the exception of *BLM* and *CDKN1A*, which showed a reduced a level of expression induction relative to the normal cells.

Accepted Manuscript

4. DISCUSSION

In this study the induction of chromosome aberrations and gene transcription responses in Fanconi anemia cells after exposure to mutagens acting by different mechanisms (mitomycin C and hydroxyurea) were compared to those of normal cells. This approach was utilized to enable interpretation of the responses of 21 stress and DNA damage response genes in the context of the defined biological consequences of normal and FA-A deficient cells. Many of these transcriptional responses highlighted the importance of TP53 regulatory pathway.

Recent studies have demonstrated that FANC proteins and the TP53 pathway work cooperatively in the prevention of chromosomal aberrations and in maintaining genomic stability [20,29]. Increasing understanding of the ability of FA cells to initiate DNA damage responses that prevent such deleterious events, including cell cycle arrest, DNA repair and apoptosis, may provide valuable information regarding the impact of the FA deficiency on cell survival and genomic stabilization, as well as the cellular mechanisms necessary to mitigate damage in FA cells. TP53-regulated cellular functions have been previously shown to be important in the manifestations of the phenotype in FA cells [10, 20, 21, 29, 30]. In this study cells from FA-A patients and non-FA “normal” control cells both showed HU-induced CAs and similar increases in gene expression under conditions in which FA-A cells were hyposensitive to CA induction relative to normal cells. In contrast, we found clear differences in expression among *TP53* and 20 genes directly or indirectly regulated by *TP53* in FA-A cells relative

to control cells after exposure to a dose of MMC that demonstrated FA-A hypersensitivity to CA induction. Our assessment of the changes in expression among the genes examined allows us to probe the reliance of FA cells on a variety of TP53-associated cellular stress responses for prevention of CAs after exposure to these genotoxic agents.

4.1 Chromosomal aberrations are elevated in FA cells after treatment with MMC and HU.

The results of MMC-associated CA analyses in this study were consistent with those previously reported, where FA cells showed hypersensitivity to this interstrand crosslinking agent, including increases in single- and double-strand DNA breaks, and CAs such as radial figures [31], supporting the concept that FA cells have a defect in the response to, or repair of, this form of DNA damage.

Interestingly, there is disagreement among the few reports concerning the capacity of HU to induce the CAs found in this study. Though a previous study has shown evidence that the replication inhibitor HU is cytotoxic and does not cause CAs [32], a recent study has demonstrated increased CAs in FA cells after HU treatment in a number of complementation groups, including FA-A, B, C, E, and D1 cells [24]. Our observation of increased CAs in normal cells, relative to the FA-A, cells after HU exposure supports the idea that HU can effectively induce CAs in cells, and recovery of these events may be promoted by activity of the FANC pathway.

4.2 Increased transcription of cell cycle-, DNA repair-, and apoptosis-associated genes in FA-A cells relative to normal cells after treatment with MMC.

TP53 protein is a transcription factor responsible for integration of a large number of cell signals associated with various classes of DNA damage, ribonucleoside triphosphate pools levels, and viral infections [33]. Under normal conditions, the TP53 protein is present at low levels and has a high rate of turnover. However, in response to genotoxic stress (e.g. exposure to MMC), the levels of stable, active TP53 increase and act to induce or repress the transcription of multiple genes involved in maintaining the integrity of the genetic material in the cell, including cell cycle arrest, DNA repair, and apoptosis [16,27,34]. Due to the large numbers of TP53 responsive genes and the wide variety of signaling pathways, the precise nature and assembly of genes that are activated or inactivated by this protein is not completely characterized.

Our results clearly show that the absence of a functional Fanconi anemia “pathway” in cells stressed by exposure to MMC leads to increased expression of TP53 and a number of TP53-regulated genes after DNA damage. Following MMC treatment, we found that the expression of TP53 was increased in FA-A cells relative to changes in normal cells. In addition, expression of genes associated with three key TP53-associated cellular responses, including cell cycle arrest, repair and apoptosis, were elevated substantially in FA-A cells. Increased transcription of the *RB1* gene in the FA-A cells after MMC exposure supports a close association between a defect in the FA pathway and the necessity of activity for cell cycle control [35]. FA-A cells also showed a MMC-

dependent increase in expression of other genes involved in cell cycle progression including *CDKN1A* (*P21*), *CCNB1* (encoding Cyclin B1) and *GADD45A*. These results may indicate an increase in DNA breaks associated with treated FA-A cells that would trigger an attempt to arrest the cell cycle. Curiously, the increased Cyclin B1 expression is associated with promoting transition from G2 to mitosis. However, this cell cycle-advancing expression may be countered by the increased expression of *GADD45A*, which inhibits nuclear localization of cyclin B1 (*CCNB1*) [36], thus promoting a G2/M cell cycle arrest. We also observed an increase in expression levels of *TP53/3* (*PIG3*) gene and other genes involved in apoptosis such as *TNFRS10B* in the FA-A cells, suggesting activation of a TP53-dependent apoptosis mechanism. This is consistent with previous studies in which MMC-induced apoptosis is evident in *Fancc*-deficient lymphoblasts [29,37], a process in which the *TP53/3* (*PIG3*) gene has been previously shown to play a key role [38,39]. Thus, based on gene expression measurements, we see an indication of elevated *TP53* levels in addition to TP53 associated G1/S phase arrest and apoptosis induction in FA cells. Our transcript expression results are also consistent with previous studies demonstrating up-regulation of gene transcripts in *Fancd2*-defective zebrafish embryos [21], and increased *TP53* expression levels in FA lymphoblasts exposed to MMC or ionizing radiation [29,35]. Previous work with lymphoblastoid cell lines derived from FA-A and FA-C patients treated with cisplatin (another interstrand crosslinking agent) also showed increased levels of *CDKN1A* (*P21*) expression, but did not show changes in the expression levels of *PCNA* and

GADD45A [25] relative to normal cells, as we detected after MMC treatment.

These differences between studies may indicate that *TP53* induction of different genes depends on the type of damage or damaging agent, or that the responses may vary between cell types.

Increased expression of transcripts encoding DNA repair-associated proteins was also evident in the FA-A cells after treatment with MMC, including the BLM helicase and the nucleotide excision repair (NER) proteins XPC and DDB2 (XPE). The BLM protein, which has been shown previously to interact with FA proteins [40], plays an important role in the response to DNA damage during replication, localizing to DSBs at replication forks and possibly coordinating the repair of damage during DNA replication [41]. The protein products of *XPC* and *DDB2* (*XPE*) genes are associated with the syndrome Xeroderma Pigmentosum and play essential roles in NER, the DNA repair pathway responsible for recognition and removal of pyrimidine dimers and bulky DNA lesions [28], including those induced by interstrand crosslinking agents [42]. Increased expression of these repair-associated gene transcripts in the FA-A cells, as compared to normal cells, may reflect the response to an increased burden of MMC-dependent DNA breaks or replication-blocking lesions due to the FA-associated deficiency, implying a role for the FA pathway in prevention of such damage-associated and CA-inducing events.

After MMC treatment we also found FA-A cells to have increased expression levels of genes associated with redox metabolism, including *SOD1*, *ABCB1* and *HSPA8* genes. Previous studies have implicated roles for FA

proteins in monitoring, and even mitigating, levels of reactive oxygen species through interactions with a number of cytoplasmic proteins involved in redox metabolism, including GSTP1 and CYP2E1, and molecular chaperons such as GRP94 and HSP70 [43,44]. Increased expression of these genes is an indication that reactive oxygen species generated by exposure to MMC, in the absence of a functional FA pathway, is high enough to trigger cellular responses to oxygen stress. Thus the FA-A cells, besides being unable to cope with the DNA lesions associated with MMC, may have an additional oxidative stress burden associated with exposure to the drug, increasing the cellular responses to oxidative stress and potential for DNA damage and associated CAs.

4.3 Gene expression changes after HU treatment of FA-A cells are similar to those of normal cells.

HU exposure induced substantially fewer differences in expression of transcripts between the FA-A and normal cell types than MMC. We found that HU induced only modest increases in *TP53* expression levels in both cell types, and the expression of other genes associated with cell cycle control, such as *CDKN1A (P21)*, had lower levels of induced expression in the FA-A cells relative to the normal cells. Also neither *DDB2 (XPE)* nor *TP53I3 (PIG3)* showed changes in expression levels relative to those seen in the normal cell lines. These results are in agreement with a previous report showing no accumulation of TP53 expression-controlled proteins P21 (*CDKN1A*) and TP53I3 (*PIG3*) after cellular exposure to HU, despite an increase TP53 protein [16].

The lack of an HU-induced increase in *BLM* gene expression in FA-A cells, relative to normal cells, clearly distinguishes this transcriptional response from that after MMC treatment, and suggests the absence of BLM replication fork-associated DSB repair activity in FA cells after HU treatment. The NER-associated repair genes *DDB2* (*XPE*) and *XPC* showed a clear increase in transcription after HU exposure. The increase was equivalent in both FA-A and normal cell types, , revealing a DNA repair-associated response distinct from that seen after MMC exposure,. The apoptosis-associated transcripts of the *NFKB1*, *NFKB1A* and *TNFRS10B* genes all showed increased expression levels in FA-A, indicating that the apoptosis was enhanced or compromised in FA cells following HU treatment. However, it is not clear why *TRIAP1*, an antiapoptotic gene, showed increased expression in response to MMC and HU treatment in FA-A cells

4.4 Concluding remarks.

In this study an HU dose that induced greater increases of CAs in the normal cells than FA-A cells induced similar increases in expression of the genes examined in normal and FA-A cells. These results suggest that in response to HU, at doses that lead to the formation of detectable CAs, the cellular responses governed by the activity of TP53 as a transcription factor are activated independent of the status of the FA pathway in the cell. Thus, whereas the TP53 associated cellular responses after MMC exposure are due to the reduced capacity of the FA-A cells to mitigate the excess DNA damage, after HU

exposure the TP53 response occurs due to the effects of exposure to the drug, such as replication fork arrest, and deficiency in the FA pathway leads to a reduced recovery of these events.

Our results looked at elucidating of the molecular mechanisms mostly associated with the DNA damage response pathway. Our results indicate that FA cells may impact processing of DNA repair as well as oxidative DNA damage. We found distinct differences in the expression of *TP53*-regulated genes between FA-A cells and control cell lines after treatment with the interstrand crosslinking agent MMC, whereas few differences were detected after exposure to the replication inhibitor HU. The generally increased expression of these genes in the MMC-treated FA-A cells, spanning roles in DNA repair, cell cycle progression, and apoptosis, implies an increased reliance for these cells on the activities of *TP53* for prevention of cell killing and tolerance of chromosome damage. This also further implicates FA-A in prevention or mitigation of the DNA damage associated with MMC exposure. Importantly, differences in the induction of gene expression between HU and MMC highlight the particular defects associated with FA-A cells in their ability to deal with different types of genotoxic stresses. Future experiments will need to focus on the relationship between molecular mechanisms and phenomenological differences.

ACKNOWLEDGMENTS: This work performed under the auspices of the U.S. Department of Energy by Lawrence Livermore National Laboratory under Contract DE-AC52-07NA27344, with funding from the Department of Energy, Office of Science and the Low Dose Radiation Research program grant KP110202, and by CONACYT project 44389, SEP-CONACYT. The authors declare that there is no financial or personal interests that might be viewed to inappropriately influence the work presented within this manuscript.

5. REFERENCES

- [1] CG. Mathew. Fanconi anemia genes and susceptibility to cancer, *Oncogene* 25 (2006) 5875-5884.
- [2] A. Gurtan, A. D'Andrea. Dedicated to the core: Understanding the Fanconi anemia complex, *DNA Repair (Amst)*. 5 (2006) 1119-25.
- [3] O. Cohen-Hagunauer, B. Peault, C. Bauche, MT. Daniel, I. Casa, V. Levy, J. Dausset, M. Boiron, Ch. Auclair, E. Gluckman, M. Marty. In vivo repopulation ability of genetically corrected bone marrow cells from Fanconi anemia patients, *PNAS* 103 (2006) 2340-2345.
- [4] MS. Sasaki, A. Tonomura. A high susceptibility of Fanconi's anemia to chromosome breakage by DNA cross-linking agents, *Cancer Res.* 8 (1973) 1829-36.
- [5] AL. Medhurts, H. Laghmani, J. Steltenpool, M. Ferrer, C. Fontaine, J. de Groot, M. Rooimans, RJ. Scheper, AR. Meetei, W. Wang, H. Joenje, JP. de Winter. Evidence for subcomplexes in the Fanconi anemia pathway, *Blood* 108 (2006) 2072-80.
- [6] S. Reid, D. Schindler, H. Hanenberg, K. Barker, S. Hanks, R. Kalb, K. Neveling, P. Kelly, S. Seal, M. Freund, M. Wurm, SD. Batish, FP Lanch, S Yetgin, H. Neitzel, H. Aniffin, M. Tischkowitz, CG Mathew, AD. Averbach, N. Rahman. Biallelic mutations in PALB2 cause Fanconi anemia subtype FA-N and predispose to childhood cancer, *Nature Genet.* 2 (2007) 162-4.
- [7] R. Kennedy R, AD. D'Andrea. The Fanconi anemia/BRCA pathway: new faces in the crowd, *Gene Dev.* 19 (2005) 2925-40.

- [8] A. Meetei, J. de Winter, A. Medhurst, M. Wallisch, Q. Waisfisz, H. Vrugt, A. Oostra, Ch. Yan, C. Bishop, M. Hoatlin, H. Joenje, W Wang. A novel ubiquitin ligase is Fanconi anemia, *Nature Genet.* 35 (2003)165-170.
- [9] I. Garcia-Higuera, Y. Kuang, D. Naf, J. Wasik, AD. D'Andrea. Fanconi anemia proteins FANCA, FANCC, and FANCG/XRCC9 interact in a functional nuclear complex, *Mol. Cell Biol.* 19 (1999) 4866-73.
- [10] NG. Howlet, T. Taniguchi, SG. Durkin, AD. D'Andrea, TW Glover. The Fanconi anemia pathway is required for the DNA replication stress response and for the regulation of common fragile site stability, *Human Mol. Genet.* 14 (2005) 693-701.
- [11] JM. Hinz, PB. Nham, EP.Salazar, LH.Thompson. The Fanconi anemia pathway limits the severity of mutagenesis, *DNA repair (Amst).* 5 (2006) 875-84.
- [12] N. Rahman, SH. Seal, D. Thompson, P. Kelly, A. Renwick, A. Elliott, S. Reid, K. Spanova, R. Barfoot, T. Chagtai, H. Jayatilake, L. McGuffog, S. Hanks, DG. Evans, D. Eccles, The Breast Cancer Susceptibility Collaboration (UK), D. Easton, M. Stratton. PALB2, which encodes a BRCA2-interacting protein, is a breast cancer susceptibility gen, *Nature Genet.* 39 (2007) 165-7.
- [13] T. Taniguchi, I. Garcia-Higuera, PR. Andreassen , RC. Gregory , M. Grompe, AD. D'Andrea, S-phase-specific interaction of the Fanconi anemia protein, FANCD2, with BRCA1 and RAD51. *Blood* 100 (2002) 2414-20.

- [14] A. Smogorzewska, S. Matsuoka, P. Vinciguerra, ER. McDonald, KE. Hurov, J. Luo, BA. Ballif, SP Gygi, K. Hofmann, AD. D'Andrea, SJ. Elledge. Identification of the FANCI protein, a monoubiquitinated FANCD2 paralog required for DNA repair. *Cell* 129 (2007) 289-301.
- [15] A. Koc, LJ. Wheeler, CK. Mathews, GF. Merrill. Hydroxyurea arrests DNA replication by mechanism that preserves basal dNTP pools, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 223-230.
- [16] M. Mattia M, V. Gottifredi, K. Mckinney and C. Prives. P53-Dependent p21 mRNA elongation is impaired when DNA replication is stalled. *Mol. Cell Biol.* 27 (2007)1309-1320.
- [17] CC. Ho, WY. Siu, A. Lau, WM. Chan, T. Arooz, R. Poon. Stalled replication induces p53 accumulation through distinct mechanisms from DNA damage checkpoint pathways, *Cancer Res.* 66 (2006) 2233-2241.
- [18] S. Frias, L. Gomez, B. Molina, E. Rojas, P. Ostrosky-Wegman, A. Carnevale. Effect of Hydroxyurea and normal plasma on DNA synthesis in Lymphocytes from Fanconi anemia patients, *Mutat. Res.* 357 (1996)115-21.
- [19] J Yu, L Zhang. The transcriptional targets of p53 in apoptosis control, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 331 (2005) 851-858. Review.
- [20] S. Houghtaling, L. Granville, Y. Akkari, Y. Torimaru, S. Olson, M. Finegold, M. Grompe. Heterozygosity for p53 (Trp53^{+/-}) accelerates epithelial tumor formation in Fanconi anemia complementation group D2 (Fancd2) knockout mice, *Cancer Res.* 65 (2005) 85-91.

- [21] TX. Lui, NG. Howlett, M. Deng, DM. Langenau, K. Hsu, J. Rhodes, JP. Kanki, AD. D'Andrea, AT. Look. Knockdown of Zebra fish Fancd2 causes developmental abnormalities via p53-dependent apoptosis, *Dev. Cell* 5 (2003) 903-914.
- [22] KJ. Livak, TD. Schmittgen. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method, *Methods* 25 (2001) 402-408.
- [23] C. Esmer, S. Sanchez, S. Ramos , B. Molina, S. Frias, A. Carnevale. DEB test for Fanconi anemia detection in patients with atypical phenotypes, *Am. J. Med. Genet. A* 124 (2004) 35-9.
- [24] B. Molina, L. Gómez, A. Hernández-Jardines, R. Ortiz, A.Carnevale, M. Altamirano-Lozano, S. Frias. Hydroxyurea produces chromosome damage in Fanconi anemia cells in A, B, C, D1 and E complementations groups. *in process*.
- [25] Q. Waisfisz, A. Miyazato, JP de Winter, JM. Lui, Joenje H. Analysis of baseline and cisplatin-inducible gene expression in Fanconi anemia cells using oligonucleotide-based microarrays, *BMC Blood Disord.* 2 (2002) 1-9.
- [26] K. Kannan, N. Amariglio, G. Rechavi, J. Jakob-Hirsch, I. Kela, N. Kaminski, G. Getz, E. Domanny, D. Givol D. DNA microarrays identification of primary and secondary target genes regulated by p53, *Oncogene* 20 (2001) 225-34.
- [27] ES. Helton, X. Chen. P53 modulation of the DNA damage response, *J. Cell Biochem.* 100 (2007) 883-896. Review

- [28] K. Harms, S. Nozell and X. Chen. The common and distinct target genes of the p53 family transcription factors, *Cell. Mol. Life Sci.* 61 (2004) 822-842. Review.
- [29] B. Freie, X. Li, SL. Ciccone, K. Nawa, S. Cooper, C. Vogelweid, L. Schantz, LS. Heneline, A. Orazi, H. Broxmeyer, S. Lee, DW. Clapp. Fanconi anemia type C and p53 cooperate in apoptosis and tumorigenesis, *Blood* 102 (2003) 4146-4152.
- [30] JM. Hinz, PB. Nham, SS. Urbin, IM Jones, LH. Thompson. Disparate contributions of the Fanconi anemia pathway and homologous recombination in preventing spontaneous mutagenesis, *Nucleic Acids Res.* 35 (2007) 3733-40.
- [31] H. Joenje, KJ. Patel. The emerging genetic and molecular basis of Fanconi anaemia, *Nat. Rev. Genet.* 6 (2001) 446-57. Review.
- [32] PD. Lima, P. Cerqueira dos Santos, A. Salim, M. De Olivera, R. Rodriguez. Evaluation of the mutagenic activity of hydroxyurea on the G1-S-G2 phases of the cell cycle: an in vitro study, *Genetic. Mol. Res.* 2 (2003) 328-333.
- [33] R. Zhao, K. Gish, M. Murphy, Y. Yin, D. Notterman, WH. Hoffman, E. Tom, D. Mack, AJ. Levine. Analysis of p53-regulated gene expression patterns using oligonucleotide arrays, *Genes Dev.* 14 (2000) 981-993.
- [34] R. Rahman-Roblick , UJ Roblick , U. Hellman, P. Conrotto P, T. Lui, S. Becker, D. Hirschberg, H. Jornvall, G. Auer, KG. Wiman. p53 targets identified by protein expression profiling, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104 (2007) 104:5401-5406.

- [35] LJ. Niedernhofer. The Fanconi anemia signalosome anchor, *Mol Cell* 25 (2007) 487-90.
- [36] MC. Hollander, RT. Philburn, AD. Patterson, MA. Wyatt, and AJ Fornace Jr. Genomic instability in *Gadd45a*^{-/-} cells is couple with S phase checkpoint defects, *Cell cycle* 4 (2005) 704-709.
- [37] FA. Kruyt, LM. Dijkmans, TK. van de Berg , H. Joenje. Fanconi anemia genes act to suppress a cross-linker-inducible p53-independet apoptosis pathway in lymphoblastoid cell lines, *Blood* 87 (1996) 938-948.
- [38] CD. Nicolls, MA. Shields, PW Lee, SM Robbins, TL Beattie. UV-dependent alternative splicing uncouples p53 activity and PIG3 gene function through rapid proteolytic degradation, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 24171-8.
- [39] MA. Coleman, E. Yin, LE. Peterson, D. Nelson, K. Sorensen, JD Tucker, AJ Wyrobek. Low response irradiation alters the transcript profiles of human lymphoblastoid cells including genes associated with cytogenetic radioadaptative response, *Radiation Res.* 164 (2005) 369-82.
- [40] AR. Meetie, S. Sechi, M. wallisch, D. Yang, MK. Young, H.Joenje, ME. Hoatlin, W. Wang. A multiplotein nuclear complex connects Fanconi anemia and Bloom syndrome, *Mol. Cell Biol.* 23 (2003) 3417-26.
- [41] AR. Davalos, J. Campisi. Bloom syndrome cells undergo p53-dependent apoptosis and delayed assembly of BRCA1 and NBS1 repair complex at stalled replication forks, *J. Cell Biol.* 162 (2003) 1197-209.

- [42] LJ. Niedernhofer, H. Odijk, M. Budzowska, E. van Drunen, A. Maas, AF Theil, NG. de wit Jaspers, HB. Beverloo, JH Hoeijmaker, R. Kanaar. The streuture specific endonuclease Ercc1-Xpf required to resolve DNA interstrand cross-link induced double-strand breaks. *Mol. Cell Biol.* 24 (2004) 5776-87.
- [43] M. Futaki, T. Igarashi, S. Watanabes, S. Kajigaya, A. Tatsuguchi, J. Wang, JM Lui. The FACNG Fanconi anemia protein interacts with CYP2EY: possible role in protection against oxidative DNA damage, *Carcinogenesis* 23 (2002) 67-72.
- [44] SS. Mukhopadhyay, KS. Leung, MJ Hicks, PJ Hasting, H. Youssoufian, SE Plon. Detective mitochondrial peroxiredoxin-3 results in sensitivity to oxidative stress in Fanconi anemia, *J.Cell Biol.* 175 (2006) 225-35.

Table 1. Frequencies of chromosomal aberrations^a for normal and FA-A lymphoblasts cells after mitomycin C (MMC) and hydroxyurea (HU) exposures.

| Cell line | Untreated | MMC (10 ng/mL) | HU (2 mM) |
|---------------|------------------------|----------------|-----------|
| Normal_1 | 0.03±0.03 ^b | 0.08±0.05 | 0.25±0.08 |
| Normal 6846 | 0.03±0.01 | 0.16±0.02 | 0.16±0.0 |
| Average (n=2) | 0.03±0.02 | 0.12±0.03 | 0.2±0.04* |
| FA-A (HSC72N) | 0.28±0.1 | 2.3±0.1 | 1.0±0.1 |
| FA-A (VU817) | 0.16±0.5 | 1.3±0.5 | 0.4±0.1 |
| Average (n=2) | 0.22±0.1 | 1.8±0.3* | 0.7±0.1* |

^a Aberrations include chromosome and chromatid breaks, fragments and tri- and quadri-radial figures.

^b Values represent average chromosomal aberrations/cell ± Standard error.

*Statistically significant differences between average measurements in untreated versus treated cells ($p < 0.05$).

Table 2. Genes selected for evaluation of expression after cellular treatment with mitomycin C (MMC) and hydroxyurea (HU).

| Symbol | Name | Gene ID | Unigen # | Pathway |
|--|--|---------|------------|--|
| TP53 | Tumor protein p53 inducible protein 3 | 7157 | Hs.408312 | Cell cycle / repair/apoptosis |
| Genes transcriptionally regulated by TP53 | | | | |
| BLM | Bloom Syndrome | 641 | Hs.169348 | DNA repair |
| CDKN1A (P21) | Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A | 1026 | Hs.370771 | Cell cycle |
| DDB2 (XPE) | Damage-specific DNA binding protein | 1643 | Hs.6453356 | DNA repair/replication |
| GADD45A | Growth arrest and DNA damage-inducible alpha | 1647 | Hs.80409 | Stress response/cell cycle/DNA repair |
| MDM2 | Transformed 3T3 cell double minut 2 | 4193 | Hs.567303 | Cell proliferation /differentiation |
| PCNA | Proliferating cell nuclear antigen | 511 | Hs.147433 | DNA replication |
| RRM2B | Ribonucleotide reductasa M2B | 50484 | Hs.512592 | DNA replication/repair |
| SGK | Serum/glucocorticoid regulated kinase | 6446 | Hs.510078 | Stress response |
| TP53I3 (PIG3) | Tumor protein p53 inducible protein 3 | 9540 | Hs.50649 | Response to oxidative stress/apoptosis |
| TRIAP1 | TP53 regulated inhibitor of apoptosis | 51499 | Hs.69499 | Apoptosis |
| TNFRS10B | Tumor necrosis factor receptor superfamily member 10b | 8795 | Hs.521456 | Apoptosis |
| XPC | Xeroderma Pigmentosum complementation group C | 7508 | Hs.475538 | DNA repair |
| Genes indirectly regulated by TP53 | | | | |
| CCNB1 | Cyclin B1 | 891 | Hs.23960 | Cell cycle |
| HSPA8 | Heat shock 70KDa protein 8 | 3312 | Hs.180414 | Stress response |
| RB1 | Retinoblastoma 1 | 5925 | Hs.408528 | Cell cycle |
| Genes not regulated by TP53 | | | | |
| ABCB1 | ATP binding cassette sub-family B | 5243 | Hs.489033 | Multidrug resistance |
| MYC | V-myc myelocytomatosis viral oncogen homolog | 4609 | Hs.202453 | Cell cycle/apoptosis |
| NFKB1 | Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells | 4790 | Hs.431926 | Apoptosis |
| NFKB1A | Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor alpha | 4792 | Hs.81328 | Apoptosis |
| SOD1 | Superoxide dismutase 1, soluble | 6647 | Hs.443914 | Response to oxidative stress |

Table 3. Fold change in gene expression levels between normal and FA-A lymphoblastoid cells exposed to mitomicyn C or hydroxyurea

| GENE | Mitomicyn C | | | Hydroxyurea | | | Ref ^b |
|--|-----------------------|------------|-------------------------|-------------|------------|------------|------------------|
| | NL (n=2) ^c | FA-A (n=2) | Expression ^a | NL (n=2) | FA-A (n=2) | Expression | |
| TP53 | 1.1±0.1 ^c | 1.9±0.5* | + | 1.1±0.2 | 1.4±0.2 | ND | 21,29,35 |
| Genes transcriptionally regulated by TP53 | | | | | | | |
| BLM | 1.3±0.4 | 3.5±2.0 | + | 2.0±0.4* | 1.4±0.3 | - | |
| CDKN1A | 1.4±0.3 | 2.7±0.3* | + | 5.0±1.9* | 2.8±0.4* | - | 25 |
| DDB2 | 1.5±0.4 | 2.3±0.8* | + | 1.6±0.5* | 1.6±0.3* | ND | |
| GADD45A | 1.1±0.1 | 2.0±0.4* | + | 3.3±0.5* | 2.8±0.3* | ND | 25 |
| MDM2 | 1.3±0.2 | 1.8±0.6 | ND | 1.7±0.3* | 1.6±0.1* | ND | |
| PCNA | 1.2±0.2 | 2.5±0.3* | + | 1.7±0.2* | 2.1±0.5* | ND | |
| RRM2B | 1.4±0.4 | 1.6±0.5 | ND | 1.6±0.4* | 1.7±0.6* | ND | |
| SGK | 1.2±0.2 | 2.2±0.7* | + | 1.7±0.2* | 1.8±0.3* | ND | |
| TP53I3 | 1.4±0.3 | 2.8±0.7* | + | 1.5±0.3 | 1.5±0.2 | ND | |
| TR1AP1 | 1.1±0.2 | 3.7±0.9* | + | 1.9±0.4* | 2.1±0.3* | ND | |
| TNFRSF10B | 1.1±0.2 | 2.2±1.0 | + | 1.6±0.2* | 2.1±0.3* | ND | |
| XPC | 1.1±0.2 | 3.0±1.6 | + | 2.0±0.4* | 1.9±0.3* | ND | |
| Genes indirectly regulated by TP53 | | | | | | | |
| CCNB1 | 1.0±0.1 | 2.8±1.0* | + | 0.5±0.1 | 0.9±0.2 | ND | |
| HSPA8 | 1.1±0.2 | 2.6±0.7* | + | 1.1±0.01 | 1.6±0.3* | ND | |
| RB1 | 1.3±0.4 | 1.9±0.9 | + | 1.2±0.5 | 1.5±0.4 | ND | |
| Genes not regulated by TP53 | | | | | | | |
| ABCB1 | 1.0±0.3 | 1.7±1.0 | + | 1.1±0.1 | 1.5±0.5 | ND | |
| MYC | 0.8±0.1 | 1.2±0.2 | ND | 0.7±0.1 | 1.3±0.3 | ND | |
| NFKB1 | 1.1±0.2 | 1.4±0.3 | ND | 1.2±0.1 | 1.7±0.4* | ND | |
| NFKB1A | 1.0±0.1 | 1.0±0.2 | ND | 1.4±0.2 | 1.8±0.2* | ND | |
| SOD1 | 0.9±0.1 | 1.9±0.4* | + | 1.2±0.1 | 1.1±0.5 | ND | |

^a Expression levels: + = increased expression, - = decreased expression, and ND = no difference, in transcript for FA-A cells relative to normal cells. ^b Published studies with gene expression data in FA cells from mice or human models. *Genes showing statistically significant changes in expression relative to untreated cells based on criteria stated in text. ^c Values represent Average fold change in expression level relative to untreated cells of the same cell type.