

Universidad Aut3noma de Barcelona  
Departamento de Gen3tica y Microbiolog3a

**Gen3tica y biolog3a molecular de la  
anemia de Fanconi**

Tesis Doctoral

Elsa Call3n Mor3u

## **ÍNDICE**

<b>I. <u>INTRODUCCIÓN</u></b>	<b>1</b>
<b>1. EL DAÑO EN EL DNA</b>	<b>1</b>
1.1. Tipos de lesiones	1
1.2. Mecanismos de reparación	3
1.2.1. Reversión directa	4
1.2.2. Reparación por escisión	4
1.2.2.1. Reparación de apareamientos erróneos (MMR)	4
1.2.2.2. Reparación por escisión de bases (BER)	4
1.2.2.3. Reparación por escisión de nucleótidos (NER)	5
1.2.3. Reparación de roturas de doble cadena	7
1.2.3.1. Recombinación homóloga (HR)	7
1.2.3.2. Unión de extremos no homólogos (NHEJ)	8
<b>2. INESTABILIDAD GENÓMICA</b>	<b>10</b>
2.1. Causas y consecuencias	10
2.2. Síndromes de inestabilidad genómica	11
2.2.1. Ataxia Telangiectasia	11
2.2.2. Síndrome de Seckel	12
2.2.3. Síndrome de Nijmegen	12
2.2.4. Síndrome de Bloom	13
2.2.5. Síndrome de Werner	14
2.2.6. Xeroderma Pigmentosum	15
2.2.7. Cáncer de mama hereditario	15
2.2.8. Anemia de Fanconi	17
<b>3. LA ANEMIA DE FANCONI</b>	<b>18</b>
3.1. Rasgos clínicos	18
3.2. Base genética/ molecular	19
3.2.1. Genes FA	19

---

3.2.2. La ruta Fanconi/ BRCA	21
3.3. Otras alteraciones del fenotipo celular en FA	23
3.3.1. Estrés oxidativo	23
3.3.2. Regulación del ciclo celular	24
3.3.3. Remodelación de la cromatina y regulación transcripcional	25
3.3.4. Alteraciones en el telómero	26
4. LA DISFUNCIÓN TELOMÉRICA	27
4.1. Estructura del telómero y proteínas teloméricas	27
4.2. El acortamiento telomérico	29
4.3. El mantenimiento del telómero	31
4.3.1. Telomerasa	31
4.3.2. Alargamiento telomérico alternativo (ALT)	32
<b>II. <u>OBJETIVOS</u></b>	<b>35</b>
<b>III. <u>ARTÍCULOS</u></b>	
Artículo 1: <u>Callén E</u> , Ramirez MJ, Creus A, Marcos R, Frias S, Molina B, Badell I, Olivé T, Ortega JJ, Surrallés J. The clastogenic response of the 1q12 heterochromatic region to DNA cross-linking agents is independent of the Fanconi anaemia pathway. <i>Carcinogenesis</i> 23, 1267-1271 (2002).	<b>36</b>
Artículo 2: <u>Callén E</u> , Surrallés J. Telomere dysfunction in genome instability syndromes. <i>Mutat Res.</i> 567, 85-104 (2004).	<b>41</b>
Artículo 3: <u>Callén E</u> , Samper E, Ramirez MJ, Creus A, Marcos R, Ortega JJ, Olivé T, Badell I, Blasco MA, Surrallés J. Breaks at telomeres and TRF2-independent end fusions in Fanconi anemia. <i>Hum. Mol. Genet.</i> 11, 439-444 (2002).	<b>61</b>
Artículo 4: <u>Callén E</u> , Ramírez MJ, Creus A, Marcos R, Ortega JJ, Olivé T, Badell I, Surrallés J. Relationship between chromosome fragility, aneuploidy and	

---

severity of the haematological disease in Fanconi anaemia. *Mutat. Res.* 504, 75-83 (2002). **67**

Artículo 5: Callén E, Tischkowitz MD, Creus A, Marcos R, Bueren JA, Casado JA, Mathew CG, Surrallés J. Quantitative PCR analysis reveals a high incidence of large intragenic deletions in the FANCA gene in Spanish Fanconi anemia patients. *Cytogenet. Genome Res.* 104, 341-345 (2004). **76**

Artículo 6: Callén E, Casado JA, Tischkowitz MD, Bueren JA, Creus A, Marcos R, Dasí A, Estella JM, Muñoz A, Ortega JA, de Winter JP, Joenje H, Schindler D, Hanenberg H, Hodgson SV, Mathew CG, Surrallés J. A common founder mutation in FANCA underlies the world highest prevalence of Fanconi anemia in Gypsy families from Spain. *Blood* (in press). **81**

**IV. DISCUSIÓN** **95**

**V. CONCLUSIONES** **109**

**VI. BIBLIOGRAFÍA** **111**

**VII. ANEXOS**

Anexo 1 **132**

Anexo 2 **174**

Anexo 3 **176**

Anexo 4 **179**

Anexo 5 **182**

## **I. INTRODUCCIÓN**

### **1. EL DAÑO EN EL DNA**

El DNA celular está continuamente expuesto a unos niveles elevados de estrés genotóxico, calculándose en torno a 10.000 las modificaciones que ocurren cada hora en el material genético de cada una de nuestras células. Este estrés puede ser causado tanto por agentes ambientales externos como la luz ultravioleta, los compuestos químicos y las radiaciones ionizantes, como por mecanismos endógenos del propio metabolismo celular debido a problemas en la replicación del DNA, la acumulación de especies reactivas del oxígeno, hidrólisis de nucleótidos del DNA, etc.

Con el fin de mantener la información genética intacta, nuestro organismo ha desarrollado toda una serie de estrategias que actúan en respuesta a este daño con el objetivo de repararlo. Si estas lesiones en el DNA permanecen sin reparar, los efectos derivados de ello pueden llegar a ser realmente adversos para la célula y provocar el bloqueo de las funciones normales, el envejecimiento celular, la muerte celular o, en el peor de los casos, contribuir a la oncogénesis (Hoeijmakers, 2001).

#### **1.1 Tipos de lesiones**

Existen distintos tipos de lesiones, resultado de la acción de diferentes compuestos o mecanismos sobre el DNA.

Las **alquilaciones** son un tipo de daño producido como su propio nombre indica, por compuestos químicos alquilantes que sustituyen un grupo alquilo, amino o ceto por un átomo de hidrógeno en compuestos orgánicos, preferiblemente DNA. El principal efecto es el de un incorrecto apareamiento entre las bases o la producción de roturas espontáneas. Cuando se trata de agentes alquilantes multifuncionales, provocan la aparición de uniones cruzadas entre las dos cadenas de DNA, lo cual impide que se separen correctamente durante la replicación o la transcripción. Algunos ejemplos bien

estudiados de agentes alquilantes son el busulfán, la ciclofosfamida y la carmustina.

Una de las principales fuentes de daño en el DNA es la radiación ultravioleta (UV) de la luz solar. El efecto básico que causa la luz UV es la **formación de dímeros de timina** entre bases adyacentes dando lugar a dímeros de ciclobutano (CPDs) y fotoproductos 6-4. Estas lesiones interfieren en el apareamiento normal de las bases, pueden causar la distorsión de la hélice de DNA, el bloqueo de la replicación y transcripción, *gaps* e incorporaciones erróneas de bases.

El **estrés oxidativo** generado durante la reducción del O<sub>2</sub> y por la acción de las radiaciones ionizantes (IR) puede causar mutaciones al atacar indirectamente a través de las especies reactivas de oxígeno las bases del DNA, formando aductos o produciendo roturas en la cadena (Marnett, 2000; Slupphaug et al., 2003). Entre las bases modificadas por estos radicales, la 7,8-dihidro-8-oxoguanina (8-oxodG) es la más abundante, provoca un mal apareamiento de bases y posee un conocido papel en mutagénesis y carcinogénesis (Fortini et al., 2003a).

Los **enlaces cruzados** (ICLs) son lesiones en el DNA provocadas, entre otros, por fármacos ampliamente utilizados en quimioterapia. Estos compuestos forman aductos que unen covalentemente las dos cadenas complementarias del DNA, aunque esta interacción puede darse dentro de la misma cadena de DNA o entre DNA y proteínas. Esta unión covalente de ambas cadenas impide su separación en procesos tan críticos como la replicación o la transcripción, con lo que los efectos de estas lesiones pueden ser letales si permanecen sin reparar (Dronkert y Kanaar, 2001; McHugh et al., 2001). Algunos de los agentes inductores de enlaces cruzados más ampliamente estudiados son la mitomicina C (MMC), el cis-platino, la nitrosourea y el diepoxibutano (DEB). No hay que perder de vista que los ICLs son sólo una parte de los efectos de estos agentes (aunque son los más tóxicos), la mayoría de los cuales producen otros aductos en el DNA producto de su metabolismo intracelular (Pristos et al., 1986).

Las **roturas de simple cadena** (SSBs) del DNA son lesiones que se producen continuamente en nuestras células y que aunque se pueden reparar muy eficientemente, si el sistema de reparación falla, durante la replicación se

pueden convertir en roturas de doble cadena, cuyos efectos son mucho más graves. Las principales fuentes causantes de SSBs son las especies reactivas de oxígeno, la propia inestabilidad de la molécula del DNA, la radiación UV y la radiación ionizante. Otra vía de producción de SSBs es mediante el proceso enzimático que se lleva a cabo durante la reparación por escisión de bases (Caldecott et al., 2001)

Las **roturas de doble cadena** (DSBs) del DNA están consideradas como el daño más letal de cuantos puede sufrir esta molécula. La fuente principal de DSBs son las IR (Olive, 2000) y algunos radicales libres, aunque también se pueden producir por estrés mecánico en la molécula de DNA o durante procesos intermedios en la reparación de otras lesiones. También pueden originarse DSBs durante la replicación del DNA cuando hay presentes SSBs, en el proceso de la recombinación V(D)J durante la formación de inmunoglobulinas y de los receptores de células T (TCR) y el entrecruzamiento meiótico o mitótico. Las DSBs aparecen cuando las dos cadenas de la hélice de DNA se rompen simultáneamente por dos lugares físicamente cercanos (Figura 1). Una corrección deficiente de estas lesiones puede provocar la delección o inserción de material genético, fragmentación cromosómica, translocaciones y pérdidas cromosómicas (Morgan et al., 1998). Por este motivo, la célula ha desarrollado toda una serie de sofisticados sistemas de detección, señalización y reparación de estas lesiones que detallaremos más adelante.



**Figura 1:** Representaciones de distintos tipos de daño en el DNA. A) Simple rotura; B) Doble rotura; C) Cruzamiento intercatenario; D) Mal apareamiento de bases; E) Alquilación

## 1.2 Mecanismos de reparación

Como mecanismo de defensa frente a los ataques externos o de naturaleza endógena, el organismo hace uso de un número de rutas que previenen los errores que se hayan podido originar durante las funciones

celulares básicas, reparan las lesiones producidas en nuestro material genético o minimizan el efecto de las mismas. Las anomalías en estos procesos están asociadas al desarrollo tumoral y el envejecimiento y pueden ser responsables de distintos síndromes de mayor o menor gravedad.

### **1.2.1 Reversión directa**

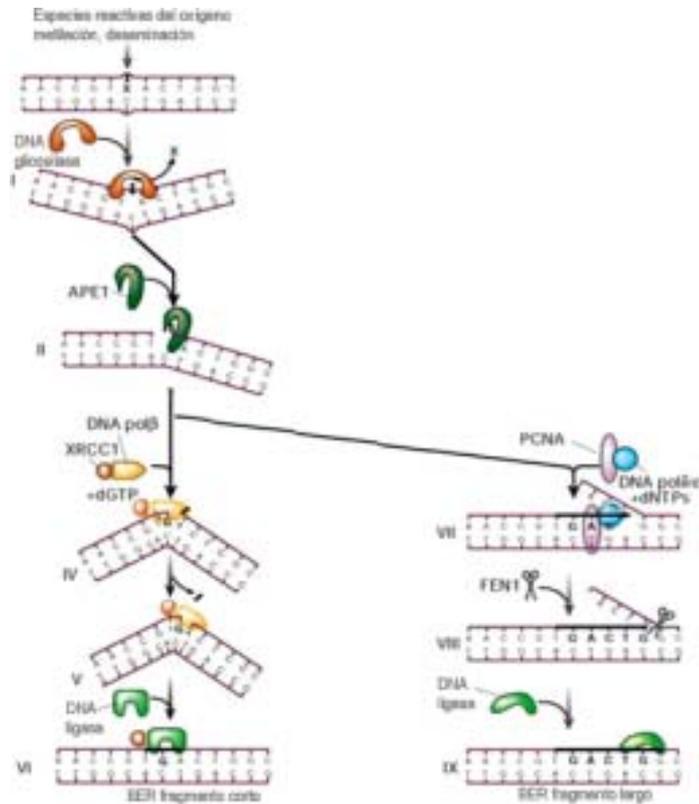
La manera más simple de reparar una lesión una vez que ha ocurrido, es eliminándola directamente. La reversión se encarga de reparar alteraciones puntuales, en su mayor parte alquilaciones. Estas lesiones son revertidas por las transferasa de grupos alquilo que son enzimas que, sin necesidad de alterar el esqueleto de DNA, eliminan la base dañada sustituyéndola por la correcta. Aunque éste es un sistema de reparación bastante limpio y eficaz, es muy costoso ya que cada tipo de alteración requiere su propio mecanismo de reparación.

### **1.2.2 Reparación por escisión**

**1.2.2.1 Reparación de apareamientos erróneos (MMR):** La principal función de este sistema es corregir los apareamientos erróneos entre bases que no mantengan el acoplamiento normal establecido por Watson y Crick. A través del MMR se eliminan nucleótidos no dañados pero que están mal apareados y se corrigen estructuras secundarias del DNA tales como pequeños bucles y regiones no apareadas, consecuencia del deslizamiento de la polimerasa durante la síntesis de DNA (Schofield y Hsieh, 2003). En enfermedades como el cáncer de colon hereditario, un defecto en este sistema provoca una elevada inestabilidad de los microsatélites (Lahue y Slater, 2003).

**1.2.2.2 Reparación por escisión de bases (BER):** La reparación BER es un mecanismo ubicuo que elimina del genoma las bases erróneas o dañadas a causa de reacciones químicas espontáneas, de la acción de especies reactivas de oxígeno y numerosos agentes genotóxicos ambientales (Krokan et al., 2000, Wilson et al., 2003). En resumen, el sistema BER se da en diversas etapas: escisión de la base dañada por parte de una glicosilasa, a continuación una endonucleasa crea una incisión en el esqueleto de DNA en el sitio abásico, se elimina este fragmento abásico, se lleva a cabo la síntesis de

DNA para rellenar el hueco originado y, finalmente, se produce la ligación de la cadena (Fortini et al., 2003b). Estos últimos pasos difieren según se trate de reparar un pequeño fragmento de una sola base o un fragmento más largo, de 2-8 bases (Figura 2). Según el tipo de daño detectado, son distintas las glicosilasas que actúan en el procesamiento inicial (Mol et al., 1999).



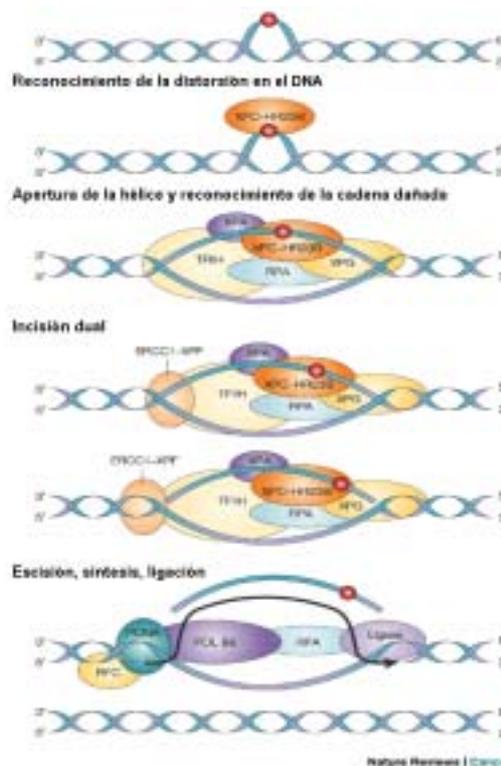
**Figura 2:** Modelo de reparación por escisión de bases (adaptado de Hoeijmakers, 2001)

**1.2.2.3 Reparación por escisión de nucleótidos (NER):** Esta vía de reparación actúa en respuesta a la mayoría de grandes distorsiones del DNA que bloquean su correcta replicación y transcripción. Estas lesiones incluyen principalmente los fotoproductos inducidos por la luz UV y los aductos derivados de productos químicos inductores de enlaces cruzados (McHugh, et al., 2001).

Un rasgo esencial de la ruta de reparación NER es que actúa de manera distinta en las diferentes partes del genoma: la reparación de los genes que se están transcribiendo activamente ocurre de manera preferente frente a aquellos

que permanecen inactivos (Balajee et al., 2000; Surralles et al., 2002). Así pues, podemos hablar de una reparación global del genoma y una reparación acoplada a la transcripción.

Los pasos de los que consta NER son el reconocimiento de la lesión, incisión a ambos lados del daño, degradación de la cadena dañada por parte de una endonucleasa seguido de la eliminación del fragmento lesionado por una exonucleasa, polimerización de la nueva cadena y ligación del fragmento recién sintetizado (Volker et al., 2001) (Figura 3). Todo este proceso es llevado a cabo por una serie de proteínas, la mayoría de las cuales se hallan mutadas en las personas que presentan el síndrome denominado Xeroderma Pigmentosum (XP) y que se caracteriza por una gran sensibilidad a la radiación UV del sol, además de un elevado riesgo a padecer cáncer de piel, y degeneración neurológica (Bootsma et al., 1998).



**Figura 3:** Modelo de reparación por escisión de nucleótidos (Adaptado de Masters y Koberle, 2003)

### 1.2.3 Reparación de roturas de doble cadena

#### 1.2.3.1 Recombinación homóloga (HR)

Este es un sistema de reparación muy preciso, conservado evolutivamente y que, al contrario de lo que ocurre en mamíferos, en levaduras se da de manera preferente frente a otros sistemas.

Esta vía actúa de manera postreplicativa durante las fases S y G<sub>2</sub> (Johnson y Jasin 2000), ya que precisa de una segunda copia de DNA idéntica que actúe como molde para restaurar la información genética perdida en la cadena dañada. La HR engloba distintos mecanismos de actuación, los cuales comparten el primer paso del proceso consistente en la erosión de los extremos de la doble rotura a cargo de exonucleasas 5'→3' para producir un extremo de cadena sencilla en 3'. Estos mecanismos son el apareamiento de cadena simple, la conversión génica y la replicación inducida por roturas (Haber, 2000). De entre todos ellos, el más común es la conversión génica.

Aparte de su papel en la reparación de roturas de doble cadena, la HR también desempeña un papel importante durante la replicación, en la reparación de algunos de los errores que pudieran surgir de este proceso, cuando la horquilla de replicación encuentra un SSB que no ha sido reparado, o en la generación de diversidad genética y en la segregación cromosómica durante la meiosis (Haber, 1999). Merece la pena señalar que la HR está involucrada en el mantenimiento telomérico en aquellas células que no poseen telomerasa y elongan los telómeros por un mecanismo alternativo (ALT).

A partir de los estudios llevados a cabo en *Saccharomyces cerevisiae*, se identificaron un grupo de genes con importantes funciones en HR, todos ellos pertenecientes al grupo de epístasis de *RAD52* y cuyo defecto causa una elevada sensibilidad a la radiación ionizante (Wolner et al., 2003; Dudas y Chovanec, 2004). Entre ellos destacan *RAD51*, *RAD52* y *RAD54* y el complejo formado por los productos de *MRE11*, *RAD50* y *NBS1* (MRN). Dentro de este proceso intervienen otras proteínas exclusivas de eucariotas superiores como son *BRCA1* y *BRCA2* (Venkitaraman, 2002), de gran importancia no sólo por su función en la ruta de HR (Moynahan et al., 1999; 2001) sino también por su repercusión clínica, ya que determinadas mutaciones en los genes codificantes de estas proteínas provocan una elevada predisposición al cáncer de mama

(Nathanson et al., 2001 ; King et al., 2003). Aunque existen mutantes con mutaciones hipomórficas viables o con alelos condicionales de los mencionados genes, el hecho de que no se hayan identificado organismos viables con mutaciones dobles en estos genes, podría ser debido a la función que tienen en HR y a las graves consecuencias que se derivan cuando esta ruta no es funcional, ya que no se puede superar la fase S debido al estancamiento de las horquillas de replicación en los lugares lesionados (Luo et al., 1999; Tsuzuki et al., 1999).

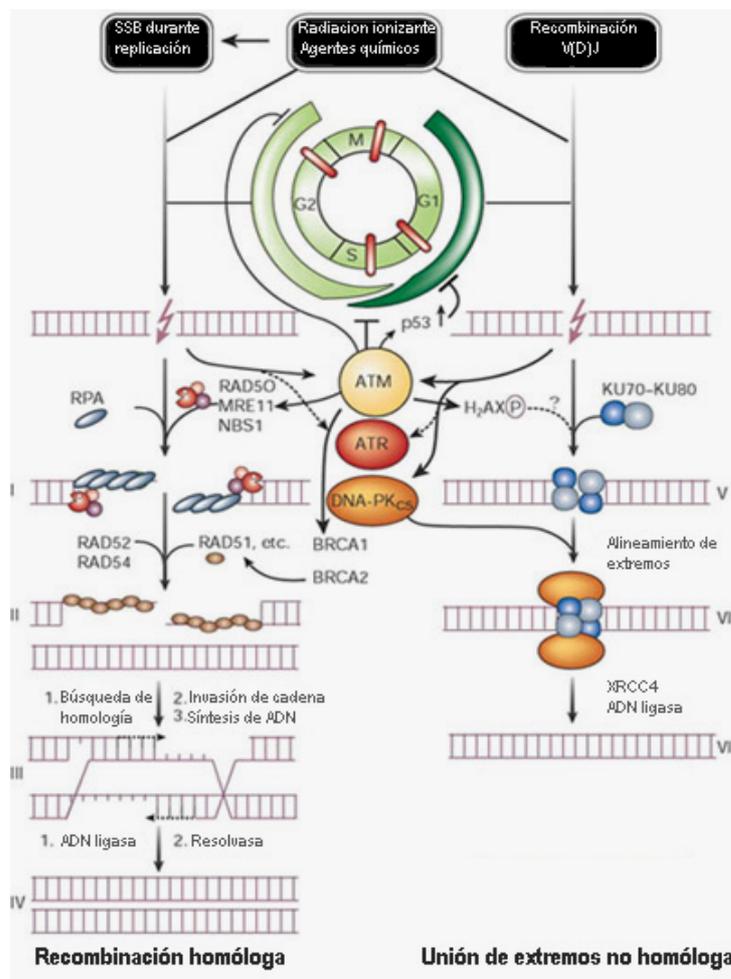
En la figura 4 se representa un esquema del proceso de reparación de DSBs por HR. Brevemente, las etapas de las que consta son las siguientes: un primer paso en el que la actividad exonucleasa 5'-3' del complejo MRN degrada los extremos del DSB para dejar expuestos los extremos 3' en forma de simple cadena. A continuación, RPA y RAD52 facilitan la formación de un filamento nucleoproteico de RAD51 (cuya translocación nuclear depende de BRCA2) en el que también pueden estar incluidos algunos de sus parálogos. Con ayuda de RAD54, este filamento de cadena simple invade la hélice homóloga que servirá como molde para la correcta resíntesis del fragmento dañado. Finalmente, el entrecruzamiento generado (*Holliday junction*) es resuelto por unas resolvasas (Hoeijmakers 2001).

### **1.2.3.2 Unión de extremos no homólogos (NHEJ)**

El proceso de NHEJ (*Non Homologous End Joining*) es mucho más robusto que el de HR, pero en cambio forma parte de los procesos tendentes a error, ya que simplemente se reúnen los extremos rotos, independientemente de su homología, con la consiguiente pérdida de algunos nucleótidos en el punto de unión (Barnes et al., 2001; Lieber et al., 2003). Al igual que la vía de HR, la NHEJ está conservada evolutivamente, aunque ambas difieren en la importancia relativa que adquieren en cada organismo. La NHEJ es la predominante en mamíferos en la mayoría de fases del ciclo celular, sobre todo en G<sub>0</sub>-G<sub>1</sub> (Jeggo, 1998).

Uno de los componentes principales del proceso NHEJ en eucariotas es la DNA-PK, que consta de tres subunidades: KU70, KU80 (que conforman el heterodímero KU) y la subunidad catalítica DNA-PKcs, la cual es reclutada al sitio del daño por KU, que gracias a su estructura tridimensional mantiene los extremos en proximidad para su posterior procesamiento y reunión (Waljer et

al., 2001). Dado que el alineamiento de los extremos ocurre cuando hay una microhomología de 1-4 nucleótidos entre ambos segmentos, en la mayoría de casos se hace necesario un procesamiento que lleva a cabo el complejo ARTEMIS/DNA-PKcs gracias a su actividad nucleasa (Ma et al., 2002) y donde también podría tener un papel el trímero MRN (Paull y Gellert, 1998), al igual que ocurre en levaduras. El complejo XRCC4/ligasaIV se encargará del paso final de ligación tal como se esquematiza en la figura 4 (Critchlow et al., 1997; Grawunder et al., 1997).



**Figura 4:** Modelo de reparación de DSBs (Modificado de Hoeijmakers, 2001)

Cabe destacar que algunas de las proteínas involucradas en NHEJ (p.ej. KU80, DNA-PKcs) tienen un papel adicional en el mantenimiento telomérico

(Hsu et al., 1999; Espejel et al., 2002a), a lo cual nos referiremos más adelante.

Aunque no se conoce con certeza qué factores son los que determinan la elección de un mecanismo u otro para la reparación de los DSBs, se cree que la fase del ciclo celular, la naturaleza de la rotura, así como la competencia que se establece entre RAD52 y KU80 por la unión a los extremos de la rotura, influyen en el mecanismo a seguir (Barnes, 2001).

## **2. INESTABILIDAD GENÓMICA**

### **2.1 Causas y consecuencias**

Como ya se ha comentado anteriormente, el mantenimiento de la integridad del genoma es de vital importancia para la supervivencia y transmisión intacta de la información genética ya que si a pesar de la existencia de fallos a lo largo de este proceso se consigue superar la división celular, las células hijas heredarán anomalías genéticas, algunas de las cuales con fatales consecuencias.

La mayoría de tumores muestran unos elevados niveles de anomalías cromosómicas incluyendo pérdida y ganancia de material genético, reorganizaciones cromosómicas, etc. (Lengauer et al., 1998), aunque no está claro si esta inestabilidad genética, es decir, el defecto inherente a la célula que la hace más susceptible de adquirir mutaciones y cambios genéticos, es la causa primera del cáncer o simplemente aparece cuando la célula ya se encuentra en un estado avanzado en la ruta tumoral y contribuye a su expansión (Marx, 2002). De todos modos, si revisamos la literatura especializada, podemos recopilar una serie de argumentos que apoyan el que la inestabilidad genómica sea el motor de la tumorigénesis: i) la mayoría de tumores presentan unos niveles tan elevados de mutaciones, que se hace difícil de explicar por otro mecanismo que no sea una inestabilidad genética subyacente; ii) la probabilidad de que las células adquieran las mutaciones necesarias para desarrollar un tumor es muy baja si nos fijamos en la tasa de mutación basal, a menos de que posean un genoma inestable; iii) en algunos

tumores existen evidencias de que algunas de las rutas que participan en el mantenimiento de esta estabilidad son defectuosos; iv) tanto los humanos como los modelos animales con una inestabilidad genética inherente son propensos a desarrollar tumores.

Es por todo esto que para mantener una estabilidad genética de una manera eficiente, la célula ha desarrollado una serie de mecanismos dedicados a la señalización y reparación del daño, así como a la detención del ciclo celular hasta que el daño ha sido reparado, o a la inducción de la apoptosis cuando este daño es muy extenso e irreversible (Motoyama y Naka, 2004). Estos procesos ya se han mencionado previamente y son, precisamente, los defectos o mutaciones en alguno de los elementos involucrados en estas rutas, lo que promueve la inestabilidad genética y puede causar una serie de enfermedades de síntomas diversos pero, al mismo tiempo, con ciertos rasgos comunes como la predisposición genética al cáncer (Charames y Bapay, 2003; Callén y Surrallés, 2004; Surrallés et al., 2004).

## **2.2 Síndromes de inestabilidad cromosómica**

### **2.2.1. Ataxia Telangiectasia**

La Ataxia Telangiectasia (AT) es un síndrome genético de herencia autosómica recesiva con un complejo fenotipo clínico. Los principales rasgos aparecen alrededor del segundo año de vida y destacan la degeneración neuronal progresiva, telangiectasia ocular, inmunodeficiencia, hipogonadismo, envejecimiento prematuro, inestabilidad genómica y predisposición al cáncer (Lavin y Shiloh, 1997; Khanna, 2000). A nivel celular, los rasgos asociados a la AT son la inestabilidad cromosómica, la hipersensibilidad a las radiaciones ionizantes, los defectos en los puntos de control del ciclo celular, el acortamiento telomérico y un nivel elevado de especies reactivas de oxígeno (Barzilai et al., 2002).

Esta enfermedad está causada por defectos en el gen supresor de tumores *ATM*, identificado por primera vez en 1995 (Savitsky et al., 1995) y cuyo producto (*ATM*) pertenece a la familia de las PI 3-quinasas, proteínas

involucradas en la transducción de señales, la recombinación meiótica y el control del ciclo celular (Kastan y Lim, 2000).

En respuesta a las DSBs, ATM actúa rápidamente fosforilando una serie de proteínas involucradas en distintas vías de señalización como p53, ChK2 o Mdm2, así como otras proteínas de reparación directamente relacionadas con síndromes de inestabilidad genética (Kastan y Lim 2000; Shiloh 2001).

### **2.2.2. Síndrome de Seckel**

El síndrome de Seckel es un trastorno autosómico recesivo caracterizado por un enanismo proporcionado conocido también como enanismo de cabeza de pájaro. Este síndrome se manifiesta por microcefalia severa, retraso mental, ojos anormalmente grandes, cara estrecha, orejas malformadas con ausencia del lóbulo, paladar ojival y anomalías en las extremidades (Faivre et al., 2002). Recientemente, se han descrito varios pacientes que presentan inestabilidad cromosómica en respuesta a la MMC (Bobabilla-Morales et al., 2003).

El gen causante de esta enfermedad es el *ATR*, el cual codifica la proteína ATR (proteína relacionada con ataxia-telangiectasia y RAD3), perteneciente al igual que ATM a la familia de las PI 3-quinisas y con un papel esencial en la proliferación celular y estabilidad genómica (Brown y Baltimore, 2000 O'Driscoll et al., 2003). Aunque ambas quinisas comparten gran parte de sus sustratos, son activadas por señales distintas y sus respuestas al daño genómico son muy especializadas. Mientras que las células deficientes en ATM son específicamente sensibles a la IR, las células *ATR*<sup>-/-</sup> son también sensibles a la radiación UV y a los inhibidores de la replicación celular (Shiloh, 2001).

### **2.2.3. Síndrome de Nijmegen**

El síndrome de Nijmegen (NBS) posee un tipo de herencia autosómica recesiva y es provocado por mutaciones en el gen que codifica la nibrina, *NBS1* (Varon et al., 1998). Esta enfermedad cursa con microcefalia, facies característica, retraso en el crecimiento, inmunodeficiencia, retraso mental progresivo y una elevada predisposición a adquirir enfermedades linfoides y cáncer (van der Burgt et al., 1996; Digweed et al., 1999). Aunque las

características inmunológicas y cromosómicas son muy similares a las de los pacientes AT (inclusive la inestabilidad cromosómica, la sensibilidad a IR y radiomiméticos, fallos en el ciclo celular y síntesis de DNA radioresistente), los rasgos clínicos permiten diferenciar claramente ambos síndromes (Taalman et al., 1983; Young y Painter, 1989).

Esta superposición de rasgos con otros síndromes puede venir dada por el hecho de que NBS1 es fosforilada en respuesta a la IR por ATM para la activación del punto de control de la fase S o, en respuesta a luz UV, por ATR (Lim et al., 2000; Zhao et al., 2000; Abraham, 2001).

Junto con las proteínas MRE11 y RAD50, NBS1 forma el complejo MRN, siendo NBS1 esencial para la formación de este complejo en respuesta a la exposición a distintos agentes genotóxicos. Estas proteínas están involucradas en el procesamiento de DSBs, en la recombinación meiótica, las reorganizaciones de los segmentos V(D)J y en el mantenimiento telomérico (Carney et al., 1998; Haber, 1998). La no funcionalidad de estos procesos sería la causa de la inmunodeficiencia y la inestabilidad cromosómica descrita en estos pacientes.

### **2.2.4. Síndrome de Bloom**

Este síndrome se debe a una alteración autosómica recesiva y se caracteriza por eritema telangiectásico en la cara, antebrazos y dorso de las manos, fotosensibilidad y enanismo, manchas café con leche, alteraciones esqueléticas, e incremento de leucemias, linfomas y carcinomas (especialmente de los gastrointestinales) (German, 1993). A nivel celular, podemos destacar que aparecen elevados niveles de intercambios entre cromátidas hermanas, de roturas cromosómicas y reordenamientos (Traverso et al., 2003). Estas células son hipersensibles a la luz UV, la hidroxurea (HU), los agentes alquilantes y, hasta cierto punto, a la IR. (Kurihara, et al., 1987).

Este síndrome está causado por mutaciones en un único gen, *BLM*, el cual codifica una proteína perteneciente a la subfamilia RecQ de las DNA-helicinas dependientes de ATP (Ellis et al., 1995; Karow et al., 1997). Estas proteínas participan en la reparación, replicación y HR del DNA, aunque también poseen un papel como supresoras de la recombinación ilegítima

(Hanada et al., 1997; Mohaghegh y Hickson, 2001). BLM es miembro de un complejo denominado BASC (*BRCA-associated surveillance complex*), que contiene otros miembros de la maquinaria de reparación, replicación y recombinación del DNA como PCNA, RAD51, BRCA1, ATM, el complejo MRN y otros (Wang et al., 2000).

Las funciones celulares de BLM son muy abundantes y diversas. Por una parte, BLM puede catalizar la migración de las *Holliday junctions* para prevenir el colapso de las horquillas de replicación (Karow et al., 2000), también colocaliza con los telómeros en las células ALT y se acumula durante la fase S del ciclo celular (Ishov et al., 1999; Dutertre et al., 2000). Además, se requiere para la localización nuclear del complejo MRN tras la detención de la horquilla de replicación (Franchitto y Pichierri, 2002) y, junto con p53 y RAD51, colocaliza en las horquillas de replicación estancadas. Así pues, podría decirse que BLM actúa en la respuesta temprana al daño celular y promueve el posterior reclutamiento de proteínas de reparación a las horquillas de replicación (Davalos y Campisi, 2003).

Recientemente se ha descrito que BLM colabora con las proteínas Fanconi en la resolución de las horquillas de replicación estancadas (Pichierri et al., 2004), lo cual es coherente con el hecho de que BLM forma parte del complejo FA tal como veremos más adelante (Meetei et al., 2003a).

### **2.2.5. Síndrome de Werner**

El síndrome de Werner (WS) es una enfermedad genética caracterizada por envejecimiento prematuro y síntomas asociados como arteriosclerosis, osteoporosis, debilitamiento del cabello, diabetes mellitus, cataratas y una elevada incidencia de tumores, particularmente sarcomas (Salk, 1982; Goto et al., 1996). Los rasgos más particulares de las células derivadas de estos pacientes incluyen la inestabilidad genómica e hipersensibilidad a agentes que inducen la interrupción de la replicación o la aparición de DSBs en la horquilla de replicación (Salk et al., 1985; Pichierri et al., 2000).

El gen defectuoso en WS (*WRN*), codifica una proteína, WRN, con actividad helicasa 3'→5' y homología con otras helicasas de la subfamilia RecQ, aunque también tiene actividad exonucleasa 3'→5' (Shen et al., 1998). Esta proteína se localiza predominantemente en el nucleolo, aunque durante la

fase S del ciclo celular relocaliza a focos de replicación y a lugares de daño en el DNA. De acuerdo con esto, se ha propuesto que WRN participa en los procesos de replicación, reparación, recombinación y transcripción (Marciniak et al., 1998; Bohr et al., 2002).

### **2.2.6. Xeroderma Pigmentosum**

El Xeroderma Pigmentosum (XP) es un desorden cutáneo de origen genético caracterizado por una elevada sensibilidad a todas las fuentes de radiación UV, en especial a la luz solar. Los afectados padecen de envejecimiento prematuro, lesiones oculares, trastornos neurológicos progresivos y una elevada predisposición a desarrollar cáncer de piel (Kraemer et al., 1997).

XP es una enfermedad multigénica en el sentido de que puede estar causada por 8 genes distintos (y por tanto se distingue a los pacientes en 8 grupos de complementación diferentes), denominados XPA-XPG más una variante, XPV. De entre ellos, el grupo XPA es el más abundante y el que cursa con los síntomas más agudos (Norgauer et al., 2003).

Las proteínas responsables del XP forman todas ellas parte del mecanismo de reparación NER, dedicado principalmente a la reparación de los fotoproductos derivados de la exposición a la radiación UV (Friedberg, 2004) y las mutaciones en los genes que los codifican son las responsables de la inestabilidad genómica que se observa en estos pacientes (Lanza et al., 1997).

### **2.2.7. Cáncer de mama hereditario**

Aunque mutaciones en varios genes distintos pueden predisponer a padecer de cáncer de mama y ovario, nos centraremos en los casos provocados por mutaciones en los genes *BRCA1* y *BRCA2*, debido a su relación con la anemia de Fanconi. Estos dos genes son supresores de tumores y su inactivación en la línea germinal supone la mayoría de casos con susceptibilidad hereditaria a tumores de mama y ovario (Miki et al., 1994; Wooster et al., 1995), aunque la aparición del tumor en sí requiere la inactivación somática del alelo que permanece normal (Smith et al., 1992). Se estima que el riesgo de padecer cáncer de mama dentro de los portadores de

mutaciones en uno de estos genes ronda alrededor del 70-80% y que en el 5-10% de cánceres de mama hay mutado uno de estos genes, aunque estas cifras varían dependiendo del número de casos con cáncer de mama u ovario en cada familia y del sexo de los afectados (Ford et al., 1998; The New York Breast Cancer Study Collaborative Group, 2001). Por lo tanto, el estudio, desciframiento y comprensión de las rutas en que participan, así como las funciones concretas de las proteínas codificadas por estos genes, ha adquirido gran importancia en los últimos años.

Ambos genes codifican proteínas de gran tamaño, BRCA1 y BRCA2, que se expresan en una gran variedad de tejidos durante las fases S y G2 del ciclo celular (Wang et al., 1997; Venkitaraman, 2002). A pesar de que ambas proteínas apenas comparten homología entre sus secuencias, los defectos derivados de la no funcionalidad de éstas son muy parecidos y se ha visto que poseen papeles esenciales en el mantenimiento de la integridad genómica de la célula y también en el desarrollo, ya que la depleción de estos genes conlleva letalidad embrionaria en el ratón (Ludwig et al., 1997; Suzuki et al., 1997).

Entre las múltiples funciones de BRCA1 y BRCA2 destacan el control de la HR y la reparación de dobles roturas en respuesta al daño genético. En esta respuesta, BRCA1 juega un papel bastante temprano ya que unos minutos después de la inducción de la lesión es reclutada al sitio del daño, seguramente modificando la estructura de la cromatina y permitiendo así el acceso de otras proteínas de reparación, como RAD50 y RAD51 con la que BRCA2 interacciona directamente (Chen et al., 1998; Paull et al., 2000). Es decir, tanto BRCA1 como BRCA2 colocalizan en regiones subnucleares tras la inducción de daño y, en su ausencia, las células muestran elevada hipersensibilidad a los agentes genotóxicos (Patel et al., 1998). BRCA1 y BRCA2 participan también en la transcripción y remodelamiento de la cromatina además de en otros múltiples procesos celulares, aunque no siempre de manera conjunta (Welch et al., 2000; Welch y King 2001; Liu y West, 2002).

BRCA1 forma parte de un complejo proteico denominado BASC que incluye proteínas involucradas en algunos de los síndromes a los que nos hemos referido previamente como ATM, NBS1, MRE11 y BLM y cuyas características clínicas y genéticas se resumen en la tabla 1. Esta estrecha

relación proteica podría sugerir que este complejo actuaría como centro coordinador para el mantenimiento de la estabilidad genómica teniendo BRCA1 un papel central (Wang et al., 2000; Futaki y Liu, 2000). Independientemente del complejo BASC, BRCA1 y BRCA2 también interactúan con una elevada cantidad de proteínas que incluyen supresores de tumores, oncogenes, proteínas de reparación, reguladores del ciclo celular y activadores/ represores de la transcripción (Liu y West, 2002; Jhanwar-Uniyal, 2003; Venkitaraman, 2004).

### 2.2.8. Anemia de Fanconi

La anemia de Fanconi (FA) es un desorden genético recesivo con herencia autosómica y también ligada al sexo (Meetei et al., 2004) caracterizado por un conjunto de malformaciones congénitas, aplasia medular progresiva, predisposición tanto a tumores sólidos como a leucemia mieloide aguda, y una elevada inestabilidad cromosómica tanto espontánea como inducida por agentes inductores de enlaces cruzados (Auerbach, 1993).

Todas las características clínicas, celulares y genéticas de esta enfermedad se desarrollarán con más detalle en el siguiente apartado.

SÍNDROME	GENES INVOLUCRADOS	MECANISMO AFECTADO	CÁNCER
Ataxia Telangiectasia	ATM	Respuesta a DSB	Linfomas
Síndrome de Seckel	ATR	Respuesta a DSB	Enanismo, microcefalia, retraso mental
Síndrome de Nijmegen	NBS1	HR/ NHEJ	Linfomas
Síndrome de Bloom	BLM	HR?	Leucemia, linfomas
Síndrome de Werner	WRN	HR?	Sarcomas
Xeroderma Pigmentosum	XPA-XPG	NER	Cáncer de piel
Cáncer de mama familiar	BRCA1/ BRCA2	HR	Cáncer de mama
Anemia de Fanconi	FANCA, -B, -C, -D1, -D2, -E, -F, -G, -I, -J, -L	Respuesta a ICL, HR?	Leucemia mieloide aguda, carcinoma de células escamosas

**Tabla 1:** Características genéticas y clínicas de algunos síndromes de inestabilidad genómica

### 3. LA ANEMIA DE FANCONI

#### 3.1. Rasgos clínicos

Como se ha mencionado previamente, la FA es una enfermedad hereditaria muy heterogénea, de baja frecuencia entre la población y que suele manifestarse mediante malformaciones congénitas, aplasia medular progresiva y predisposición tumoral. Algunas de las alteraciones más frecuentes se pueden observar en las fotografías de la figura 5. Entre ellas destacan la baja estatura, anomalías esqueléticas en antebrazos, dedos, cadera y rodillas, malformaciones renales y cardíacas, manchas cutáneas “café con leche”, microcefalia, cierto retraso mental e hipogonadismo en varones (Tischkowitz y Hodgson, 2003; Kutler et al., 2003). Según los últimos estudios, la esperanza de vida es de unos 24 años, la probabilidad de desarrollar tumores sólidos a los 40 años es del 28% y la prevalencia de la aplasia medular es del 80% de los casos. De entre los neoplasmas desarrollados, la mayoría (60%) son hematológicos y, dentro de los no hematológicos, el más abundante es el carcinoma de células escamosas (Kutler et al., 2003).



**Figura 5:** A) Fotografía de una niña afectada de FA; B) Fotografía y radiografía de una anomalía esquelética en los antebrazos típica de FA; C) Ejemplo de las denominadas “manchas café con leche” cutáneas

A pesar de esta variedad de síntomas, hay que destacar que no se presentan en todos los casos, por lo que el diagnóstico de los pacientes basado únicamente en los síntomas clínicos no es completamente fiable. En su lugar, se usa como método diagnóstico el ensayo citogenético de aberraciones cromosómicas en linfocitos de sangre periférica tras la exposición a MMC o DEB, a cuyos efectos son hipersensibles (Auerbach, 1988).

### 3.2. Base genética y biología molecular

#### 3.2.1. Genes FA

La prevalencia de la FA es de aproximadamente 1-5 nacimientos por millón de habitantes, siendo la frecuencia de portadores de entre 0,3-1%, aunque estas cifras dependen del grado de consanguinidad o del grupo étnico de que se trate (Whitney et al., 1993; Savino et al., 1997; Tipping et al., 2001).

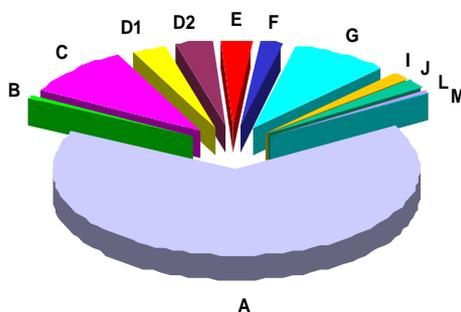
La FA no es sólo una enfermedad con heterogeneidad clínica, sino que la heterogeneidad afecta también a la base genética. Hasta la fecha, se ha descrito que existen al menos 11 genes diferentes involucrados y que dan nombre a otros tantos grupos de complementación (FA-A, -B, -C, -D1/BRCA2, -D2, -E, -F, -G, -I, -J, -L). No todos ellos han sido clonados y caracterizados y poco se sabe acerca de sus funciones (Levitus et al., 2003; Surrallés et al., 2004). Ninguno de los genes muestra homología entre sí ni con otros genes, excepto *FANCG*, que se encontró que era idéntico al gen de hámster *XRCC9* involucrado en la hipersensibilidad a los agentes inductores de ICLs (de Winter et al., 1998).

El gen *FANCA* es el que más frecuentemente se encuentra mutado (Tabla 2), y presenta un espectro de mutaciones muy amplio (Wijker et al., 1999). De entre ellas, una gran parte son grandes deleciones (Morgan et al., 1999; Callen et al., 2004), ya que es un gen muy rico en secuencias *Alu*, lo cual favorece eventos recombinatorios (Levran et al., 1998).

Recientemente se ha publicado la clonación del gen *FANCB*, cuyo producto forma parte del complejo FA. Lo que hace que este gen sea especial con respecto al resto es su localización en el cromosoma X (Meetei et al.,

2004). Hasta el momento, se han descrito 4 pacientes con mutaciones en este gen, todos ellos hombres. Esto es debido a que, en las mujeres, es precisamente la copia mutada la que permanece inactivada. En uno de los casos, la madre no era portadora de la mutación, si no que se trataba de una mutación *de novo*. Aún queda por discutir la importancia y las implicaciones de este descubrimiento.

Gen	Localización	Nº Exones	Aminoácidos	Prevalencia	Referencia
FANCA	16q24.3	43	1455	66%	FA- breast cancer, 1996 Lo Ten Foe et al, 1996
FANCB	Xp22.31	10	859	<1%	Levitus et al., 2004
FANCC	9q22.3	14	558	12%	Strathdee et al., 1992
FANCD1/ BRCA2	13q12	27	3418	<1%	Howlett et al., 2002
FANCD2	3p25.3	44	1451	<1%	Timmers et al., 2001
FANCE	6p21.3	10	536	4%	de Winter et al., 2000
FANCF	11p15	1	374	4%	de Winter et al., 2000
FANCG	9p13	14	622	12%	de Winter et al., 1998
FANCI				<1%	Levitus et al., 2004
FANCI				<1%	Levitus et al., 2004
FANCI				<1%	Levitus et al., 2004
FANCL	2p16.1	14	375	<1%	Meetei et al., 2003



**Tabla 2:** Resumen de los genes involucrados en FA, localización, tamaño y prevalencia y diagrama con la frecuencia relativa de cada uno de ellos.

La relación entre el fenotipo clínico y el gen involucrado es un tema que sigue sin resolverse ya que cada gen puede estar afectado por una amplia variedad de mutaciones con distintas consecuencias a nivel proteico y clínico. Según el trabajo publicado recientemente por Kutler y colaboradores, los pacientes pertenecientes al grupo de complementación FA-C muestran una aparición más temprana de la aplasia medular y una menor supervivencia en comparación con el resto de grupos, siendo la severidad de los portadores de

mutaciones en FANCD1/BRCA2 la más elevada de todas (Wagner et al., 2004). Dentro de este grupo, poseen peor pronóstico aquellos que presentan mutaciones en los exones 4 y 14 del gen (Kutler et al., 2003).

En una proporción de pacientes FA, ocurre un fenómeno denominado mosaicismo somático. Estos individuos presentan dos poblaciones de células T en sangre, una de ellas sensible a la MMC y otra resistente, lo cual dificulta la asignación de un grupo de complementación a estos pacientes. Esta población resistente es resultado de sucesos recombinacionales o de conversión génica, que revierten un alelo patogénico a su estado normal (Gregory et al., 2001). Aunque, en algunos casos, este mosaicismo se ha asociado a una mejora de la enfermedad a nivel hematológico, el riesgo de padecer tumores sólidos sigue siendo tan elevado como el de un paciente clásico (Waisfisz et al., 1999; Joenje y Patel 2001; Gross et al., 2002).

### 3.2.2. La ruta Fanconi/ BRCA

La ruta FA es una ruta compleja sobre la cual todavía queda mucho por dilucidar y que podemos subdividir en dos rutas independientes que actúan en respuesta a estímulos distintos, los **agentes inductores de enlaces cruzados** y las **radiaciones ionizantes** (Figura 6).

La mayoría de proteínas FA (FANCA, -B, -C, -E, -F, -G, -I, -L) forman un complejo nuclear necesario para la posterior activación de FANCD2 mediante la ubiquitinación de la lisina 561 en respuesta a los agentes inductores de ICLs. Se cree que esta monoubiquitinación es llevada a cabo de manera más concreta por FANCL, que posee actividad ubiquitin-ligasa E3, en un proceso en el que también participa BRCA1 (Garcia-Higuera et al., 2001; Meetei et al., 2003b). También forma parte de este complejo BLM y, aunque su papel no es esencial para la activación de FANCD2, quizás podría actuar movilizando el complejo FA a la cromatina (Meetei et al., 2003a). Según un reciente trabajo, BLM colocaliza con la forma activa de FANCD2 tras la inducción de daño con agentes inductores de ICLs, UV-C o HU, siendo necesario en el caso del tratamiento con ICL la integridad del complejo FA para que BLM sea fosforilada y relocalice al lugar del daño (Pichierri et al., 2004). La presencia de la forma monoubiquitinada de FANCD2 (FANCD2-L), de mayor tamaño que la forma

inactiva (FANCD2-S), permite distinguir mediante *western blot* entre aquellos casos en que la mutación se ha producido en alguno de los genes por encima de FANCD2 y, por tanto, la proteína no está activada (una única banda) y aquellos casos en los que el gen mutado es FANCD2 (sin banda), o está por debajo de FANCD2 (doble banda). Esta activación va a tener lugar tanto en presencia de agentes inductores de enlaces cruzados, UV-C o HU como durante la fase S del ciclo celular y, en esas condiciones, FANCD2 relocaliza a focos nucleares asociados a la cromatina junto a BRCA1, BRCA2, RAD51, BLM y el complejo MRN, confiriendo así resistencia a los agentes inductores de ICLs (D'Andrea 2003; Gregory et al., 2003). Tanto al final de la fase S del ciclo celular como tras la inducción de daño en el DNA, se activa la enzima deubiquitinasa USP-1, la cual se asocia físicamente con FANCD2 y la cromatina, actuando como un regulador de la inactivación de FANCD2 (Nijman et al., 2004). A pesar de desconocer el modo preciso en que las proteínas FA actúan, las evidencias anteriormente expuestas muestran que el fenotipo de la FA está causado por defectos en la reparación del DNA ya que, entre otros factores, BRCA2 está directamente implicado en la reparación por HR y porque los defectos en cualquiera de los genes FA conlleva inestabilidad genómica y tumorigénesis.

Uno de los logros más importantes en los últimos años ha sido el descubrimiento de que *FANCD1* es, en realidad, *BRCA2*, con lo que la interrelación con otras rutas es cada vez más evidente (Howlett et al., 2002). De todas formas, aunque FANCD2 y BRCA2 colocalizan en un complejo en la cromatina, no se puede afirmar que esta interacción sea física o si existe una proteína intermedia. Se cree que FANCD2 actúa promoviendo la localización de BRCA2 en focos nucleares tras la inducción de daño, ya que, en ausencia de FANCD2 monoubiquitinada, la formación de estos focos está alterada (Wang y D'Andrea, 2004). El descubrimiento de BRCA2 como uno de los genes FA, refuerza todavía más el papel de la ruta FA en el procesamiento de las dobles roturas mediante HR. En la tabla 2 se muestra la localización, características y prevalencia de los genes y proteínas conocidas hasta hoy.

Dentro de esta parte de la ruta inducida por agentes inductores de ICLs, el grupo de F. Rosselli publicó recientemente que el punto de control de la fase S en respuesta a ICLs está controlado por ATR a través de dos vías

independientes, una de las cuales involucra al complejo MRN y FANCD2. La activación de esta ruta requiere el ensamblaje de FANCD2 y MRN en focos nucleares de manera dependiente del complejo FA, la fosforilación de NBS1 por parte de ATR y la fosforilación de FANCD2 mediada por ATR y dependiente de NBS1 (Pichierri y Rosselli, 2004). Aunque se han publicado resultados contradictorios, parece que ATR es necesaria para la monoubiquitinación de FANCD2 inducida por agentes mutagénicos, aunque se desconoce el mecanismo exacto de esta relación (Andreassen et al., 2004)

Por otra parte y de forma independiente a lo mencionado anteriormente, en respuesta a la IR, se activa ATM, que fosforila FANCD2 en el residuo Ser 222, de manera supeditada a la fosforilación de NBS1 por esta misma quinasa, para mantener un funcionamiento normal del punto de control de la fase S en respuesta a IR (Nakanishi et al., 2002; Taniguchi et al., 2002).

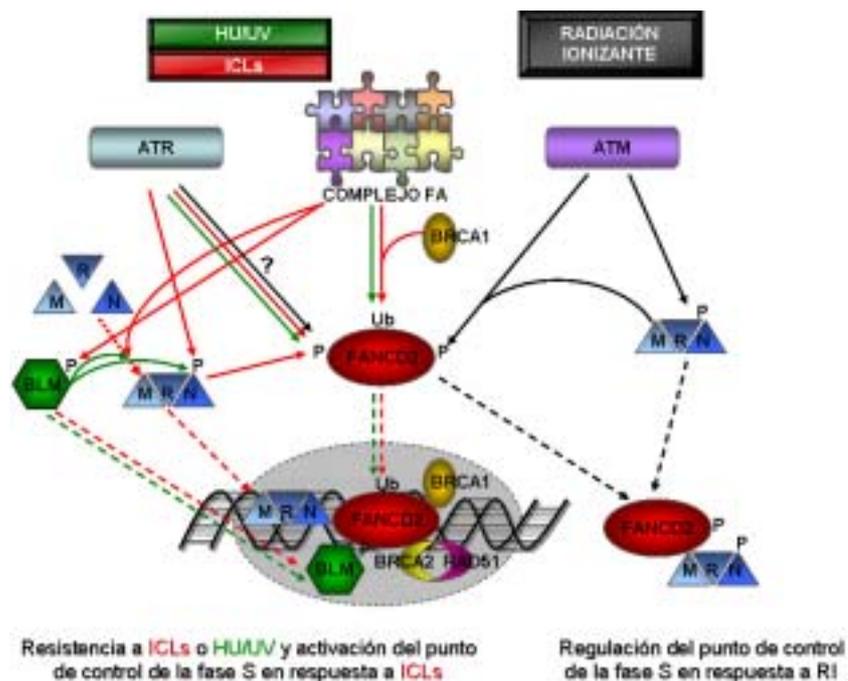


Figura 6: Interacciones entre los componentes de la ruta FA

### 3.3. Otras alteraciones del fenotipo celular en FA

#### 3.3.1. Estrés oxidativo

A lo largo de los años, muchos estudios han implicado a las especies reactivas de oxígeno (ROS) en la patogénesis de la FA. En diversas ocasiones,

se ha descrito que en cultivos mantenidos en unas condiciones de elevada presión de oxígeno, las células FA muestran una drástica reducción de la viabilidad, alteraciones en el ciclo celular y un aumento de aberraciones cromosómicas (Joenje et al., 1981; Ruppitsch et al., 1997). También se ha observado una elevada presencia de 8-oxodG (la lesión más común y mutagénica de las derivadas del proceso de oxidación) en linfocitos FA así como en linfocitos de heterocigotos sanos (Degan et al., 1995),

Se cree que éste es un defecto secundario en las células Fanconi ya que, a pesar de que la hipersensibilidad a ROS (en concreto al  $^1\text{O}_2$ ) es un fenómeno bastante homogéneo entre las diversas líneas FA, al contrario de lo que ocurre con los ICLs, es corregido al ser transformadas con el antígeno SV40 (Saito et al., 1993).

Otra de las evidencias que relaciona la FA con el daño oxidativo es el papel citoplasmático de alguna de sus proteínas, en concreto la interacción entre FANCC y el citocromo P450 reductasa, enzima que produce especies reactivas de oxígeno potencialmente tóxicas. Mediante esta interacción, FANCC atenúa la actividad de esta reductasa actuando como antioxidante (Kruyt et al., 1998). FANCG es otra de las proteínas que interacciona con enzimas implicadas en la producción de ROS, en concreto con la CYP2E1 (Futaki et al., 2002).

### **3.3.2. Regulación del ciclo celular**

Una de las respuestas desarrolladas por la maquinaria celular para mantener la integridad genómica, es la activación de distintos puntos de control a lo largo del ciclo celular para dar tiempo a que los mecanismos de reparación cumplan su función y, de este modo, impedir la transmisión a las células hijas de un genoma alterado (Hartwell y Kastan, 1994; Elledge, 1996; Sancar et al., 2004). Estos puntos de control, junto con la muerte celular, forman parte de la respuesta a las agresiones en el DNA y determinan de alguna forma el destino final de la célula dañada. La activación de estos puntos requiere de unos sensores y mediadores de la señal entre los que destacan ATM y ATR, ambas involucradas en la ruta FA como se explicó anteriormente (Abraham, 2001; Taniguchi et al., 2002; Pichierri y Rosselli, 2004).

Se ha observado que las células FA poseen un ciclo celular más largo comparado con el de las células sanas, debido principalmente a una acumulación de células en la fase G2/M, sobre todo tras el tratamiento con MMC (Dutrillaux et al., 1982). Este comportamiento es revertido tras la introducción del gen normal en la línea celular. Según algunos autores, el alargamiento de la fase G2, no es debido a un defecto en el ciclo celular en sí, sino a una acumulación de daño tras la exposición a los agentes inductores de ICLs (Heinrich et al., 1998). Este mismo efecto se observa cuando las células se mantienen en condiciones de elevada presión de oxígeno (Schindler y Hoehn, 1988) y es revertido cuando se corrigen con el gen correspondiente.

Además del defecto en la fase G2/M, se ha descrito que algunas líneas FA presentan un progreso defectuoso a través de la fase S tras la inducción de ICLs (Sala-Trepat et al., 2000; Akkari et al., 2001). Esto no es de extrañar si tenemos en cuenta que las proteínas FA interactúan con NBS1 y ATR, ambas con un papel demostrado en la activación del punto de control interno de la fase S, en el caso de ATR tras el paro de la horquilla de replicación y, como es sabido, los ICLs impiden el progreso de esta horquilla (Osborn et al., 2002; Pichierri y Rosselli, 2004). Por lo tanto, la fase G2 prolongada que se observa en células FA, ocurriría para otorgar a las células el tiempo necesario para poder reparar las lesiones que no han sido convenientemente procesadas durante la fase S.

### **3.3.3. Remodelación de la cromatina y regulación transcripcional**

A lo largo de la ruta FA, se ha visto que participan y se establecen interacciones con distintos factores que tienen un demostrado papel en la remodelación de la cromatina y en la regulación de la transcripción, tales como BRCA1 y BRCA2. BRCA1 se asocia con proteínas de la vía MMR requeridas para la reparación acoplada a la transcripción del daño oxidativo y con componentes de la holoenzima RNA-polimerasa II (Scully et al., 1997; Wang et al., 2000). Su papel en el remodelamiento cromatínico viene dado por su asociación al complejo SWI/SNF (Bochar et al., 2000).

Evidencias más recientes demuestran que FANCD2 tiene un papel directo en la asociación a la cromatina ya que posee en su extremo C-terminal un dominio ácido *HMG-like*, dominio que se sabe que facilita el ensamblaje de complejos nucleoproteicos involucrados en transcripción y recombinación (Grosschedl et al., 1994; García-Higuera et al., 2001), y en su forma activa promueve el asentamiento de BRCA2 en la cromatina (Wang et al., 2004). BRG1, parte del complejo SWI/SNF, también interacciona con la ruta FA (Otsuki et al., 1999).

Mediante el ensayo de dos híbridos, varias proteínas Fanconi han demostrado su capacidad para interactuar con diversas proteínas de regulación transcripcional, como es el caso de FANCC que interacciona con el factor FAZF (represor de la transcripción), con el que también colocaliza en focos nucleares (Hoatlin et al., 1998; Reuter et al., 2003).

### **3.3.4. Alteraciones en el telómero**

En varios síndromes de inestabilidad genómica se ha descrito que existe un defecto en el mantenimiento telomérico. Asimismo, es frecuente observar un acortamiento acelerado de los telómeros en enfermedades hematológicas, debido a la gran demanda proliferativa de las células madre hematopoyéticas en estas condiciones (Notaro et al., 1997; Ball et al., 1998). En modelos murinos, se ha visto también que el mantenimiento telomérico es decisivo para la funcionalidad del sistema hematológico (Herrera et al., 1999).

Ayudando estas evidencias se ha descrito que en FA existe un acortamiento telomérico acelerado que, en ocasiones, se ha correlacionado con la severidad hematológica de la enfermedad (Leteurtre et al., 1999; Callén et al., 2002; Li et al., 2003).

Estudios en ratones deficientes para *FANCG* sugieren que el defecto telomérico es secundario al defecto genético y es debido a la presión proliferativa, aunque deberíamos tener en cuenta que en el caso de la FA, los modelos murinos no son un buen modelo de la enfermedad observada en humanos (Franco et al., 2004).

Una parte importante de este trabajo de tesis doctoral se ha dedicado al estudio de la biología telomérica en FA y al posible papel que juegan en el mantenimiento telomérico las proteínas involucradas en esta enfermedad.

## **4. LA DISFUNCIÓN TELOMÉRICA**

Los telómeros son estructuras nucleoproteicas no codificantes situadas en los extremos de los cromosomas eucariotas. Están constituidos por la repetición de secuencias de DNA altamente conservadas y tienen importantes funciones en la protección, replicación y estabilización de los extremos cromosómicos, así como en el posicionamiento nuclear de los cromosomas (Hahn, 2003; Chan y Blackburn, 2004). El mecanismo mediante el cual se mantienen los telómeros es exclusivo de esta región e implica a una ribonucleoproteína denominada telomerasa que sintetiza estas repeticiones.

Algunas de las proteínas que forman parte del telómero son proteínas involucradas en síndromes genéticos y cuyo defecto tiene importantes consecuencias en la biología telomérica y, en consecuencia, en la inestabilidad cromosómica y la carcinogénesis (Callén y Surrallés, 2004).

### **4.1. Estructura del telómero y proteínas teloméricas**

El DNA telomérico se caracteriza por estar compuesto por la repetición de una secuencia corta que en mamíferos es TTAGGG y que puede alcanzar una longitud de 5-15 Kb (Moyzis et al., 1998). Esta secuencia acaba en un *overhang* en 3' rico en G que se dobla hacia sí mismo formando un *T-loop* o lazo-T el cual es estabilizado por varias proteínas (van Steensel et al., 1998; Griffith et al., 1999). Esta estructura impedirá la fusión del telómero con los extremos de otros cromosomas.

La estabilidad del telómero se consigue también gracias a la función de varias proteínas que se unen a él, consiguiendo de este modo la preservación de la integridad cromosómica, protegiendo al DNA telomérico de la acción enzimática y la degradación, mediando importantes interacciones entre los

cromosomas y la matriz nuclear, y ejerciendo además ciertos efectos sobre la transcripción de genes situados en regiones subteloméricas (Blackburn, 1991).

Lo que resulta paradójico acerca de las proteínas que se unen a los telómeros, es que la mayoría de ellas son proteínas involucradas en la reparación de dobles roturas en el DNA, precisamente las estructuras con las que debido a su evidente semejanza, se ha de evitar que sean confundidos los telómeros (Lundblad, 2000; Wei et al., 2002).

La primera proteína telomérica que fue descubierta en 1992 por Zhong y colaboradores fue **TRF1**, una proteína exclusivamente telomérica y que actúa como inhibidor indirecto de la telomerasa para controlar la longitud del telómero, uniéndose a él en forma de homodímero (Zhong et al., 1992).

**TRF2** es otra proteína que comparte homología con TRF1 (Broccoli et al., 1997) y cuya inhibición resulta en la pérdida del *overhang* rico en G y en la fusión covalente de los extremos cromosómicos pero manteniendo la secuencia telomérica (van Steensel y de Lange, 1997; Smogorzewska et al., 2000). Otra de las funciones asignadas a esta proteína es la activación de la respuesta apoptótica y la detención del ciclo celular a través de la ruta ATM/p53 (Karlseder et al., 1999). TRF2 junto con TRF1 juegan un papel esencial en la formación de la estructura en lazo-T que forma el telómero (van Steensel et al., 1998).

Las proteínas principales de la vía NHEJ de reparación de dobles roturas **Ku80/70** y **DNA-PKcs**, también participan (aunque con papeles diferentes) en la biología telomérica. Ku 80 interacciona con TRF1, TRF2 y telomerasa, regulando negativamente esta última, por lo que en ratones *Terc<sup>+/+</sup>/Ku80<sup>-/-</sup>* podemos observar una elongación progresiva del telómero comparado con células normales (Samper et al., 2000). Además, Ku80 participa en las fusiones terminales entre telómeros cortos mediante NHEJ, así como en la apoptosis masiva de células germinales asociada al acortamiento telomérico (Espejel et al., 2002a). Por el contrario, en ausencia de telomerasa, la deficiencia de DNA-PKcs contribuye al aceleramiento del acortamiento telomérico e interacciona con la telomerasa para mantener la longitud telomérica, no como un regulador negativo, como en el caso de Ku80. La ausencia de DNA-PKcs promueve la aparición de fusiones, pero entre telómeros que conservan su longitud inalterada debido a su función en el mantenimiento de una estructura

telomérica adecuada (d'Adda di Fagagna et al., 2001; Gilley et al., 2001; Espejel et al., 2002b).

Aunque no se conoce con exactitud su papel en los telómeros, el complejo **MRN** se une al telómero a través de TRF2 (Zhu et al., 2000) y, en el caso de NBS1, de forma dependiente del ciclo. En fibroblastos NBS1<sup>-/-</sup>, se ha visto que NBS1 promueve la elongación telomérica en conjunción con la subunidad retrotranscriptasa de la telomerasa (TERT), lo cual podría sugerir que esta proteína se requiere para el mantenimiento telomérico (Ranganathan et al., 2001).

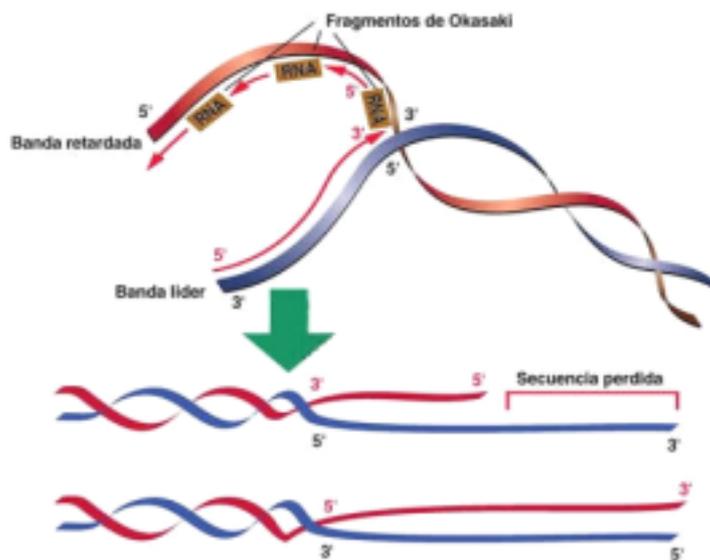
Las proteínas que participan en HR también tienen en **RAD54** y **RAD51** representación en el telómero. Ambas poseen capacidad tanto de protección como de mantenimiento de la longitud telomérica ya que tanto los ratones *knock out* para RAD54 como las células humanas en las que se inhibe RAD51 por siRNA (*small interfering RNA*) poseen telómeros más cortos y mayor número de fusiones cromosómicas terminales que los ratones salvajes (Jaco et al., 2003; Tarsounas et al., 2004).

## 4.2. El acortamiento telomérico

Conforme las células envejecen, los telómeros se van acortando progresivamente con cada ronda de replicación debido al llamado “problema de replicación terminal” en el extremo 5' de la cadena discontinua del DNA recién sintetizado (Harley et al., 1990). Este acortamiento está considerado como el reloj mitótico que establece el periodo de vida celular y por tanto regula el número de veces que una célula va a ser capaz de dividirse antes de entrar en senescencia (Allsopp et al., 1992). Esto se puede explicar por el hecho de que la DNA polimerasa sólo puede sintetizar en sentido 5'→3' y por tanto el extremo 5' de la cadena discontinua se verá acortado comparado con su secuencia molde cuando se elimine el cebador de ARN más terminal (Figura 7) (Harley et al., 1990).

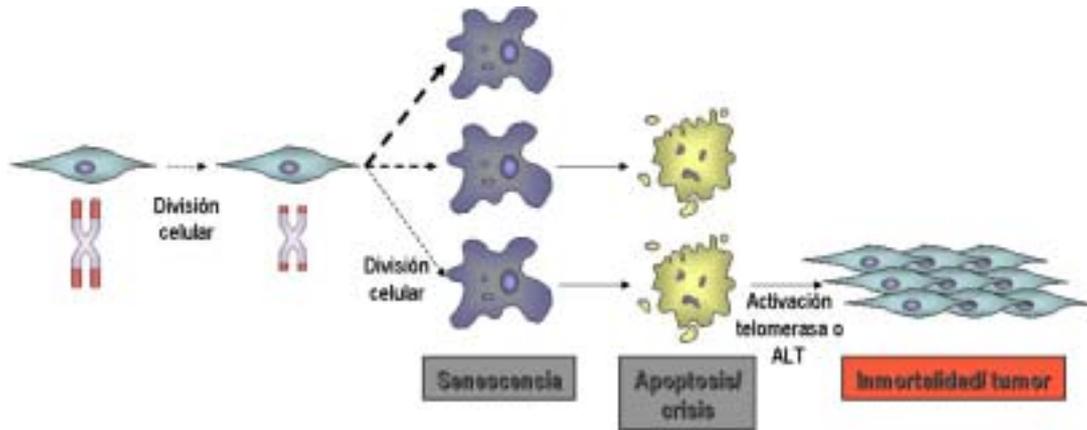
En cada una de estas divisiones, se van perdiendo 50-200 pb de DNA telomérico, hasta el punto en el que los telómeros son tan cortos que la célula ya no puede sufrir más divisiones, y se desencadena toda una serie de respuestas abocadas en la mayoría de casos a la muerte celular o crisis

(Allsopp et al., 1992; Levy et al., 1992). Este fenómeno, que en realidad es un mecanismo de protección frente al cáncer (Wright y Shay, 2001), se conoce con el nombre de senescencia replicativa y tiene lugar después de unas 50 divisiones. De todas formas, ésta no es la única vía por la cual se erosionan los telómeros, sino que también se ha comprobado que una reparación deficiente de ciertas lesiones en estas regiones, así como factores epigenéticos, pueden modular la longitud telomérica (Kruk et al., 1995; Petersen et al., 1998; Surrallés et al., 1999; García-Cao et al., 2004).



**Figura 7:** Modelo de la replicación de los extremos cromosómicos

Cuando los telómeros alcanzan una longitud crítica y no pueden cumplir sus funciones normales, la inestabilidad genómica resultante permite la adquisición de mutaciones que, en la mayoría de células afectadas promueven la muerte celular (de Lange, 2002). Por lo tanto, parece evidente pensar que activando los mecanismos de mantenimiento telomérico promoveríamos la immortalización celular (Figura 8). En cierta medida, esto es así, ya que la mayoría de tumores y células inmortales han activado la enzima encargada de la extensión de estas secuencias para sobreponerse a la senescencia y conseguir dividirse “indefinidamente”.

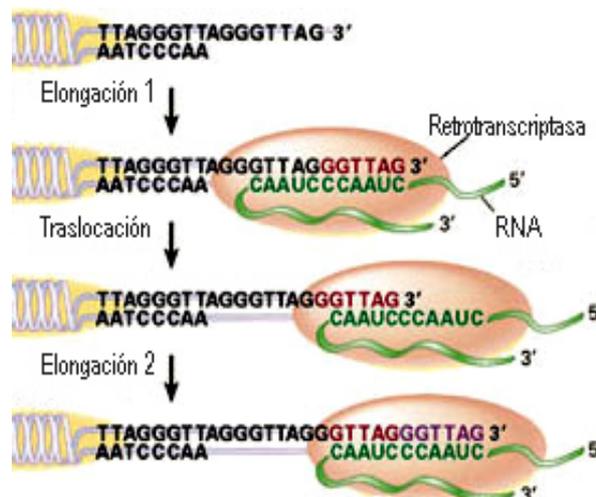


**Figura 8:** Esquema simplificado del proceso de división celular y los diferentes destinos de la célula: senescencia replicativa, crisis y formación tumoral tras la activación de mecanismos de mantenimiento telomérico, de mayor a menor probabilidad respectivamente.

### 4.3. El mantenimiento del telómero

#### 4.3.1. Telomerasa

La telomerasa es una ribonucleoproteína que consta de dos subunidades, un componente RNA (hTERC) que actúa de molde de la secuencia telomérica, y otra subunidad con actividad retrotranscriptasa hTERT, que sintetiza DNA telomérico a partir del extremo 3' de los extremos cromosómicos como se representa en la figura 9 (Greider y Blackburn 1985; Feng et al., 1995).



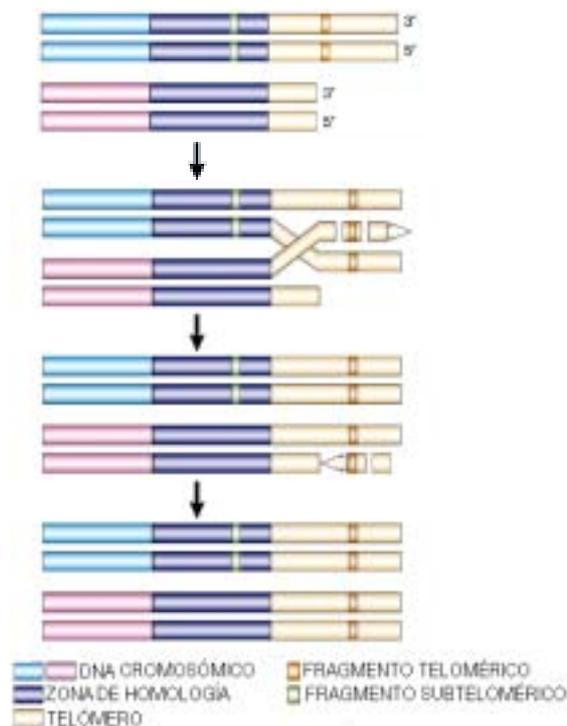
**Figura 9:** Mecanismo de elongación telomérica dependiente de telomerasa.

La actividad telomerasa queda restringida a células reproductivas, tumorales y a algunas células hematopoyéticas, epidérmicas y hepáticas (Kim et al., 1994; Counter et al., 1995), lo cual nos indica por una parte que la telomerasa no es oncogénica *per se* y, por otra parte, apoya la hipótesis de que el mantenimiento telomérico es esencial para la proliferación tumoral a largo término (Holt y Shay, 1999). El proceso de inmortalización celular es otro de los mecanismos en que la telomerasa interviene. Como ha sido sobradamente demostrado, una vez que los telómeros se acortan hasta un nivel tal que sus funciones normales se ven alteradas, la mayoría de células mueren debido a la inestabilidad genética adquirida, pero hay un pequeño número de células que superan la crisis a través de la activación de algún mecanismo que les permita mantener la longitud de sus telómeros, aunque permanezcan críticamente cortos (Counter et al., 1992; Kim et al., 1994; Masutomi y Hahn, 2003). Así pues, en resumen, la actividad telomerasa es un requisito para inmortalizar las células, mantener sus telómeros y adquirir otras mutaciones promotoras de oncogénesis y desarrollo tumoral. Por todo ello, la telomerasa es considerada como un candidato en la terapia antitumoral (Blasco, 2001).

### **4.3.2. Alargamiento telomérico alternativo (ALT)**

A pesar de que la mayoría de células inmortalizadas y tumorales utilizan la telomerasa como mecanismo para el mantenimiento telomérico, un número determinado de células tumorales y cultivos de células inmortalizadas mantienen sus telómeros por un mecanismo alternativo e independiente de la telomerasa o de cualquiera de sus componentes (Bryan et al., 1997a). Una de las características de estas células ALT es que el tamaño de sus telómeros es muy heterogéneo ya que oscila entre una longitud prácticamente indetectable hasta unas 50 Kb (Bryan et al., 1995; Tsutsui et al., 2003). Otra característica de estas células es que contienen unas estructuras conocidas como APBs (*ALT-associated Promyelocytic Leukemia Bodies*) (Yeager et al., 1999). Los APBs son grandes estructuras nucleares con forma de rosquilla que contienen la proteína PML (de *promyelocytic leukemia*), además de proteínas involucradas en replicación y recombinación como RPA, RAD51 y RAD52 y las proteínas teloméricas TRF1 y TRF2 (estas últimas, específicamente en las células ALT).

Se desconoce la función exacta de estas estructuras, pero podrían estar involucradas en supresión de tumores (potencian la actividad de p53), en la apoptosis y la recombinación (Hodges et al., 1998; Grobelny et al., 2000; Bernardi et al., 2004). Lo que sí que se conoce es que la recombinación entre secuencias teloméricas (sin afectar a la región subtelo mérica) es el mecanismo por el cual se mantienen los telómeros en estas células, tal y como se representa en la figura 10.



**Figura 10:** Mecanismo de alargamiento telomérico alternativo. El modo en que opera y a qué regiones afecta se comprueba introduciendo dos secuencias marcador en la región telomérica y subtelo mérica y controlando cuál de las dos es la que se transmite en el nuevo telómero

La primera evidencia de que la recombinación podría estar involucrada en el mantenimiento telomérico se obtuvo en *Saccharomyces cerevisiae* (Shampay y Blackburn, 1988; Le et al., 1999). En humanos, fue el trabajo de Dunham y colaboradores el que demostró que este mismo mecanismo es el que opera en las células ALT (Dunham et al., 2000), lo cual concuerda con el hecho de que en los APB colocalicen las proteínas teloméricas y proteínas de recombinación. Otro hecho que apoya esta hipótesis es que se ha visto que

dichas estructuras son más abundantes en el núcleo durante las fases G2/M del ciclo celular, que es cuando tienen lugar los eventos recombinacionales (Grobelyny et al., 2000).

Además de las proteínas anteriormente mencionadas, se ha publicado que proteínas como NBS1 o BLM interactúan con TRF2 en las células ALT dentro de los APB y promueven la síntesis telomérica ya que, como en el caso de NBS1, su inhibición impide la formación de APB funcionales (Wu et al., 2000; Stavropoulos et al., 2002; Wu et al., 2003; Callén y Surrallés, 2004).