

## Expresión diferencial del ARN en la anemia de Fanconi. Una probable característica fenotípica

Bioq. Lucía Gutiérrez-Aguilar,\* , \*\*\* Dr. Horacio Reyes-Vivas,\* M en C Bertha Molina,\*\* Dra. Sara Frias,\*\* Dra. Gloria Hernández-Alcántara,\* Q. Carmen Ortiz,\*<sup>s</sup> Biol. Ignacio de la Mora de la Mora,\*<sup>s</sup> Dr. Gabriel López-Velázquez \*<sup>s</sup>

### RESUMEN

**Objetivo:** Analizar la expresión de la triosafosfato isomerasa (TIM) y del ácido ribonucleico ribosomal (ARNr) en ocho grupos de complementación de anemia de Fanconi (AF).

**Material y métodos:** Se utilizaron líneas celulares linfoblastoides de referencia internacional de pacientes con AF, transformadas con virus Epstein Barr. Los grupos fueron AF-A (HSC72), AF-B (HSC230), AF-C (HSC536), AF-D1 (HSC62N), AF-D2 (PD20), AF-E (VU130), AF-F (VU121) y AF-G (VU143). La transcripción del gen de TIM se analizó por RT-PCR. La expresión del ARNr se analizó por electroforesis a partir del ARN total, purificado con trizol, de cultivos celulares de cada grupo.

**Resultados:** El gen de la TIM se expresó de manera constitutiva en los ocho grupos analizados. Los ARN de alto peso molecular se expresaron de forma diferente en los grupos de complementación AF-E y AF-F. Se observó la presencia de un ARN que podría corresponder al precursor de ARNr 47S. Además, en el grupo AF-F, hubo disminución de las especies correspondientes a 28S y 18S.

**Conclusiones:** La TIM forma parte de la glucólisis, una vía metabólica esencial, y nuestros resultados muestran que la transcripción de su gen no se afecta por la anemia de Fanconi. En contraste, la expresión de los ARNs de alto peso molecular sugiere que podrían existir alteraciones en la maduración del ARNr en algunos grupos de AF. Tal defecto en la maduración de una molécula esencial como el ARNr podría causar complicaciones graves en la evolución de la enfermedad. Estudios adicionales permitirán determinar si este comportamiento es característico de los grupos de complementación AF-E y AF-F.

**Palabras clave:** Anemia de Fanconi, triosafosfato isomerasa, ARN ribosomal.

### ABSTRACT

**Objective:** To analyze the expression of the triosephosphate isomerase (TIM), and the ribosomal ribonucleic acid (rRNA) from eight Fanconi anemia (FA) complementation groups.

**Material and methods:** International reference Epstein Barr Virus-transformed lymphoblastoid cell lines, derived from FA patients, were used. The complementation groups were AF-A (HSC72), AF-B (HSC230), AF-C (HSC536), AF-D1 (HSC62N), AF-D2 (PD20), AF-E (VU130), AF-F (VU121) and AF-G (VU143). The transcription of the gene of TIM was analyzed by RT-PCR. The expression of rRNA was analyzed by denaturing electrophoresis of the total RNA, purified by the use of trizol, from cell cultures of each complementation group.

**Results:** The gene of TIM was expressed in a constitutive manner for the eight groups studied. A differential expression of high molecular weight RNA species in the complementation groups E and F was found. The presence of an RNA that could correspond to the 47S rRNA precursor is shown. In addition, there was a decrease on the expression of rRNA species corresponding to 28S and 18S, in the FA-F group.

**Conclusions:** TIM is part of glycolysis, an essential metabolic pathway, and our results showed that FA does not affect its expression. On the other hand, the expression of high molecular weight RNAs suggests that, in some complementation groups of FA, there could exist alterations in the maturation of ribosomal RNA. Such defect in the maturation of an essential molecule as rRNA, might cause complications in the course of the illness. Further studies will allow us to determine if this could be considered as a distinctive feature for the complementation groups FA-E and FA-F.

**Key words:** Fanconi anemia, triosephosphate isomerase, ribosomal RNA.

La anemia de Fanconi (AF) es una enfermedad autosómica recesiva en el humano, cuyo cuadro presenta una gran variedad de manifestaciones clínicas como pancitopenia, defectos en el desarrollo esquelético y de órganos vitales,

retraso del crecimiento pre y post natal, anomalías del sistema nervioso, predisposición al cáncer (especialmente leucemia), e hiperpigmentación de la piel.<sup>1,2</sup>

El fenotipo celular se caracteriza por hipersensibilidad hacia agentes alquilantes bifuncionales del ADN;

la hipersensibilidad a su vez da origen a numerosas aberraciones cromosómicas y retraso de las células en la fase G2 del ciclo celular.<sup>1,3</sup>

Se identificaron 11 genes involucrados en este proceso mediante estudios de complementación por fusión de células: FANC A, B, C, D1, D2, E, F, G, I, J y L.<sup>4-11</sup>

Se considera que otros factores, además de los de origen genético, están involucrados en la AF, ya que se han descrito casos que presentan la misma mutación pero con un fenotipo diferente,<sup>12</sup> por lo que se argumenta la participación de factores ambientales, alimentación y exposición a patógenos, entre otros, en la variabilidad de expresión fenotípica de la AF.<sup>13</sup>

Hasta el momento se desconoce el total de moléculas involucradas en la expresión de alguno de los 11 fenotipos descritos para la AF, así como la existencia de otras moléculas que se afecten como consecuencia de esta enfermedad.

Nuestro grupo de trabajo estudia la triosafosfato isomerasa (TIM o TPI) tanto a nivel genético como bioquímico. Esta enzima se considera un buen modelo para el estudio de la estructura y función proteica respecto a factores perturbadores externos e internos a la célula.

La TIM es una enzima de la vía glucolítica que cataliza la interconversión entre la dihidroxiacetona fosfato y el gliceraldehído 3- fosfato.<sup>14</sup> Su participación en la glucólisis es determinante en la producción de energía a partir del metabolismo de la glucosa. Se sabe que las mutaciones detectadas hasta la fecha en el gen de la TIM de humano

producen, entre otras anormalidades, anemia hemolítica crónica, incremento en la susceptibilidad a infecciones bacterianas, defectos del crecimiento y deterioro de los sistemas muscular y nervioso.<sup>15</sup>

El gen de TIM en el humano tiene 3.5 kpb y consta de 7 exones interrumpidos por seis intrones. El ARN mensajero (ARNm) presenta una región no traducida (UTR) en el extremo 5', de aproximadamente 50 nucleótidos (nt), y un UTR de 448 nt en el extremo 3'.<sup>15</sup>

No existen trabajos que se refieran a la relación entre defectos de la TIM y la AF. Sin embargo, debido a su importancia en el metabolismo energético de la célula, así como su relación con el desarrollo de anemia hemolítica en individuos con deficiencia en la TIM (cita), en este trabajo analizamos su expresión en células de ocho de los grupos de complementación de AF. El objetivo inicial fue saber si existía algún daño en la vía de la glucólisis debido a la AF.

También analizamos la expresión del ARNr, uno de los procesos más importantes de toda célula viviente, con la intención de saber si existía alguna anomalía en la biogénesis de los ribosomas debido a la AF.

Los genes ribosomales (ADNr) se localizan en el nucléolo, a excepción del gen que codifica la subunidad 5S que se encuentra en el nucleoplasma.<sup>16</sup> El ARNr se transcribe como una unidad transcripcional que contiene un espaciador transcrito externo 5'; la subunidad de ARNr 18S; el espaciador transcrito interno 1; la subunidad de ARNr 5.8S; el espaciador transcrito interno 2; la subunidad de ARNr 28S y el espaciador transcrito externo 3'.<sup>17</sup> Para que el ARNr pueda incorporarse a los ribosomas, primero debe pasar por ciertos procesos de maduración, entre ellos el corte de las regiones espaciadoras. Conforme avanza el proceso de maduración, se forman intermediarios con tamaños que van desde 47S hasta 32S, antes de generarse las especies completamente maduras.<sup>17</sup> Cuando existen defectos en este mecanismo, las especies intermediarias de ARNr pueden llegar a acumularse y distinguirse de las maduras.

## MATERIAL Y MÉTODO

### Células

Se utilizaron líneas linfoblastoides de referencia internacional que fueron transformadas con virus Epstein

Este trabajo fue parcialmente apoyado por el proyecto CONACYT J4.022-M

\* Laboratorio de Bioquímica Genética, Instituto Nacional de Pediatría, México.

\*\* Laboratorio de Citogenética, Instituto Nacional de Pediatría, México.

\*\*\* Universidad de la República de Uruguay.

<sup>§</sup> Los autores agradecen la colaboración de la Q. Ortiz C., del Biol. de la Mora en los ensayos electroforéticos y en la densitometría. Al Dr. López-Velázquez en el procesamiento del ARN ribosomal y la purificación del mismo.

Correspondencia: Dr. Gabriel López-Velázquez. Laboratorio de Bioquímica Genética. Instituto Nacional de Pediatría. Insurgentes Sur 3700-C Col. Insurgentes Cuicuilco. México 04530 D.F. Teléfono: 10840900 ext. 1442 Correo electrónico: glv@salud.gob.mx Recibido: abril, 2005. Aceptado: noviembre, 2005.

Barr a partir de linfocitos de pacientes con AF, que pertenecen a los grupos de complementación AF- A (HSC72), B (HSC230), C (HSC536), D1 (HSC62N), D2 (PD20), E(VU130), F (VU121) y G (VU143). Estas líneas celulares fueron amablemente donadas por el Dr. Hans Joenje de la Universidad Libre de Ámsterdam y son mantenidas en condiciones de crecimiento en el laboratorio de Citogenética del Instituto Nacional de Pediatría.

Por cada línea celular se sembraron cultivos con una densidad celular de 300,000 células/mL en medio RPMI (GIBCO) suplementado con 10% de suero fetal de ternera (HYCLONE) inactivado por temperatura y antimicótico al 1% (GIBCO BRL). Se incubaron a 37 °C en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5 %. Para la purificación de ARN, se tomaron alícuotas de cada línea celular con 5,000,000 células cada una.

#### Purificación de ARN total

Las células se centrifugaron a 1,000 rpm, a 4°C durante 10 min. Cada botón celular se resuspendió lentamente con 1mL de trizol (GIBCO BRL), en hielo. Se incubó 5 min a temperatura ambiente y luego se pasó a hielo. Se adicionaron a la muestra 200 mL de cloroformo-alcohol isoamílico frío (49:1 v/v). Se agitó 15 segundos en vortex y se incubó a temperatura ambiente. Posteriormente se centrifugó a 10,000 rpm, a 4°C por 15 min. Se recuperó la fase acuosa superior y se le adicionó un volumen igual al recuperado de isopropanol frío. Se mezcló por inversión y se incubó 5 min a temperatura ambiente. Se centrifugó a 10,000 rpm, a 4°C por 15 min y se decantó el sobrenadante. Se adicionó al botón 1mL de etanol al 75 %, en frío, y se resuspendió. La muestra se centrifugó a 10,000 rpm, a 4°C por 10 min, se decantó nuevamente el sobrenadante y se dejó evaporar el alcohol. Finalmente se resuspendió en 100 mL de agua DEPC (dietil pirocarbonato, SIGMA). Las especies preponderantes de ARN (principalmente ARN ribosomal) se analizaron por geles desnaturizantes de agarosa al 1.5 % con formaldehído.

#### Cuantificación de ARN

La concentración de ARN se cuantificó por su absorbencia a 280 nm en un espectrofotómetro Beckman Coulter DU 650, tomando en cuenta que  $1D.O.^{280nm} = 40\mu g$  de ARN/mL.

#### Oligonucleótidos

Se sintetizaron dos oligonucleótidos con la secuencia correspondiente para flanquear al gen de TIM: sentido 5'-CATATGGCGCCCTCCAGGAAG-3' (hTIM F) antisentido 5'-GGATCCTCATTGTTTGGCATT-3' (hTIM R1). En sus extremos 5' y 3' llevan incluidos los sitios de restricción para las enzimas NdeI y BamHI respectivamente. Con estos oligonucleótidos se amplifica desde el exon 1 hasta el exon 7.

Se sintetizaron otros dos oligonucleótidos con la secuencia correspondiente para flanquear al exon 7 del gen y la región UTR 3': sentido 5'-GCTCTGTGACTGGGG CAACCTG-3' (hTIM F2) y antisentido 5'-GGATCCTAGTGCCAGGTTTATTCC-3' (hTIM R2). Con estos oligonucleótidos se amplifica desde el inicio del exon 7 (ultimo exon del gen) e incluye el UTR 3'.

#### RT-PCR

Para la amplificación del exon 7 con el extremo UTR 3' del gen de TIM, se partió del ARN total (3 µg) proveniente de cada grupo de complementación. Para esta amplificación se usaron los oligos hTIM F2 y hTIM R2 a una concentración final de 0.025 µg/µL. Se utilizó el estuche para RT-PCR Titan, de acuerdo a las recomendaciones del proveedor (ROCHE). Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: 50°C durante 30 min; 94°C por 2 min, seguido de 30 ciclos de 94°C por 30 seg, a 55°C por 30 seg y a 68°C por 1 min. Finalmente se incubaron las muestras a 68°C durante 10 min.

La amplificación del transcrito completo de TIM (del exon 1 la exon 7 sin UTR) se realizó a 50°C durante 30 min, 94°C por 2 min, seguido de 30 ciclos a 94°C por 30 seg; a 42°C por 30 seg y a 68°C por 1 min, usando los oligos hTIM F y hTIM R1 como iniciadores.

#### Electroforesis y semicuantificación del ARNm

Los productos de amplificación se verificaron en geles de agarosa al 1% y a partir de ellos, se llevó a cabo la semicuantificación del ARNm de TIM por densitometría óptica. A los geles de agarosa en los que se analizó el producto de amplificación del ARNm de TIM se les agregó el mismo volumen de amplificado para cada grupo de complementación; después se digitalizaron con un sistema de análisis de imágenes UVP. Se evaluó por densidad óptica la expresión del

gen de TIM, tomando el blanco como 100% y el negro como 0% de concentración con el software LabWorks 4.0.

### PCR

Se realizó la amplificación del gen por PCR utilizando como molde 2  $\mu\text{L}$  del producto de RT-PCR para cada grupo de complementación, los oligos hTIM F y hTIM R1 a una concentración final de 0.025  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , y las siguientes condiciones de PCR: previa incubación de las muestras a 94°C durante 1 min, 35 ciclos de amplificación a 94°C por 30 seg, a 42°C por 1 min y a 72°C por 1 min. Al final se incubaron las muestras a 72°C durante 10 min. Para el PCR se utilizó Taq polimerasa recombinante de Gibco con los reactivos e indicaciones que incluye el proveedor.

### RESULTADOS

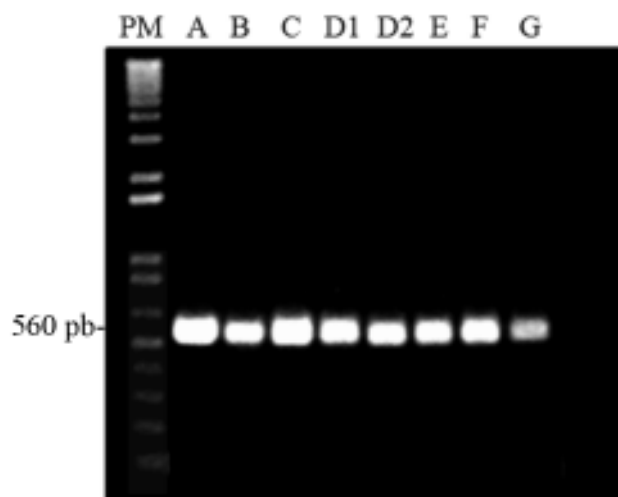
El cuadro 1 muestra el rendimiento en la purificación de ARN a partir de cada grupo de complementación. Este ARN purificado se utilizó en los ensayos de RT-PCR y en el análisis de la expresión del ARNr.

**Cuadro 1.** Concentración de ARN total obtenida para cada grupo de complementación de AF

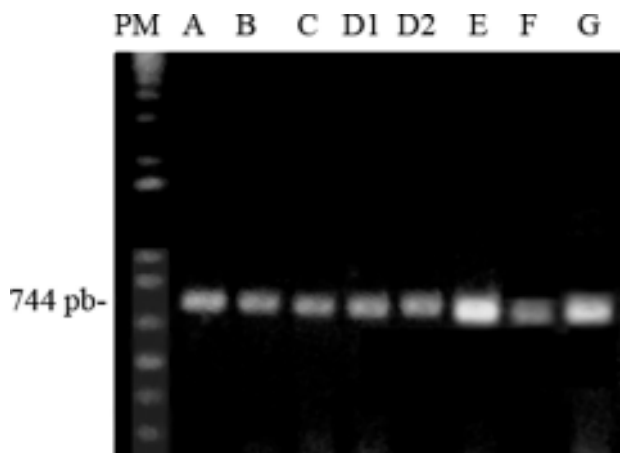
Grupo AF	A	B	C	D1	D2	E	F	G
[ARN]ng/ $\mu\text{L}$	310	380	480	390	900	850	302	210

Se amplificó el exon 7 incluyendo el UTR 3' del ARNm de TIM de todos los grupos de complementación y alcanzaron un peso molecular de 563pb. El peso molecular del amplificado fue igual para todos los grupos (Figura 1). Asimismo, se amplificaron los 7 exones del gen de TIM (sin UTR 3'), a partir del ARN previamente purificado (Figura 2) y alcanzaron un peso molecular de 744 pb, el cual corresponde al ARNm maduro de este gen. La variación en densidad óptica registrada para el gen amplificado en cada grupo AF, se encuentra dentro de los parámetros del error por carga de la muestra en el pozo; hubo una expresión similar en todos los grupos de complementación (Figura 2).

Los geles desnaturalizantes de agarosa muestran las especies de ARN preponderantes de la célula. Se



**Figura 1.** Amplificación por RT-PCR del exon 7 y el UTR 3' del gen de TIM de 8 grupos de complementación de la AF. El peso molecular (PM) del producto de amplificación fue de 560pb en todos los grupos de AF, lo cual corresponde a lo esperado de acuerdo a la secuencia del gen.

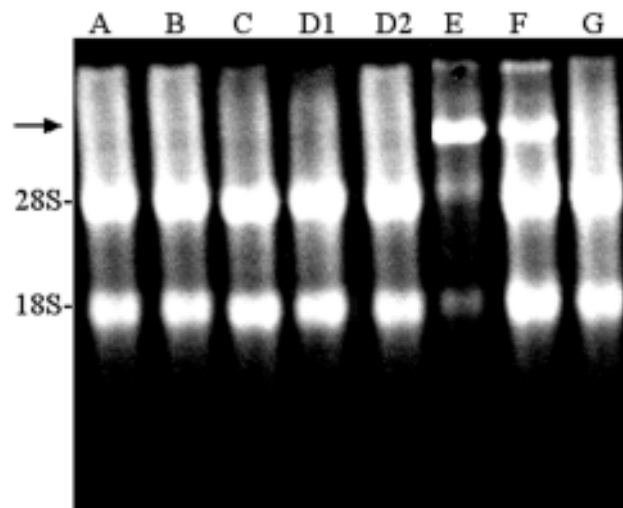


**Figura 2.** Amplificación por RT-PCR de los 6 exones correspondientes al gen de TIM. El peso molecular (PM) del producto de amplificación fue de 744pb en todos los grupos de AF, lo cual corresponde a lo esperado de acuerdo a la secuencia del gen.

destacó la expresión diferencial con respecto a las especies de ARN de alto peso molecular, correspondientes a los ARNr (Figura 3).

### DISCUSION

Confirmamos que el gen de TIM está presente en los ocho grupos de complementación analizados y que se



**Figura 3.** Expresión de ARNr de 8 grupos de complementación de AF. Las bandas preponderantes representan las subunidades 28S y 18S. En los grupos E y F se distinguen bandas de peso molecular mayor a 28S (→).

expresa de manera normal, por lo que proponemos que el metabolismo energético de la célula no se encuentra dañado a ese nivel.

Las especies de ARN de mayor peso que las bandas correspondientes al 28S observadas en los grupos de complementación E y F (Figura 3), pueden corresponder al precursor 47S del ARNr, ya que el peso molecular de la banda observada es cercano a 14 kb, lo cual ya se ha descrito con anterioridad en sistemas que analizan la biogénesis de los ribosomas.<sup>17</sup> Además, el grupo F muestra una disminución en la intensidad de las bandas correspondientes al 28S y 18S (5 kb y 1.9 kb respectivamente), lo que sugiere que la maduración de estos ARN se retrasa por la acumulación de su precursor. La acumulación de precursores del ARNr se ha observado en células privadas de factores de maduración como los ARN nucleolares pequeños (snoARNs)<sup>18,19</sup> o proteínas nucleolares como la fibrilarina.<sup>19</sup> Cabe señalar que algunas proteínas de la anemia de Fanconi se organizan en *foci* intranucleares,<sup>5</sup> que por tamaño, densidad y morfología podrían corresponder a los cuerpos de Cajal. Se sabe que los cuerpos de Cajal contienen algunos factores de maduración del ARNr.<sup>21</sup> Si las proteínas vinculadas con la anemia de Fanconi tuvieran que ver con la organización de tales estructuras nucleares, podríamos estar destacando el vínculo que existe entre dos metabolismos que parecían indepen-

dientes; la maduración del ARNr y el proceso que se desarrolla en la AF.

A nivel molecular, sugerimos que los grupos de complementación E y F podrían distinguirse del resto, por presentar especies de ARN de alto peso molecular (14 kb), lo que en determinado momento puede ser útil en la identificación de estos fenotipos celulares.

#### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Joenje H, Patel KJ. The emerging genetic and molecular basis of Fanconi anaemia. *Nat Rev Genet* 2001;2:446-59.
2. Alter BP. Fanconi's anaemia and malignancies. *Am J Hematol* 1996;53:99-110.
3. Auerbach AD. Fanconi anaemia diagnosis and the diepoxibutane (DEB) test. *Exp Hematol* 1993;21:731-3.
4. Sala-Trepat M, Rouillard D, Escarceller M, Laquerbe A, Moustacchi E, Papadopoulos D. Arrest of S-phase progression is impaired in Fanconi anaemia cells. *Exp Cell Res* 2000;260:208-15.
5. Joenje H, Oostra AB, Wijker M, di Summa FM, van Berkel CG, Rooimans MA, *et al.* Evidence for at least eight Fanconi anaemia genes. *Am J Hum Genet* 1997;61:940-44.
6. Meetei AR, de Winter JP, Medhurst AL, Wallisch M, Waisfisz Q, van de Vrugt HJ, Oostra AB, *et al.* A novel ubiquitin ligase is deficient in Fanconi anaemia. *Nat Genet* 2003;35:113-14.
7. Timmers C, Taniguchi T, Hejna J, Reifsteck C, Lucas L, Bruun D, *et al.* Positional cloning of a novel Fanconi anaemia gene, FANCD2. *Mol Cell* 2001;7:241-48.
8. Strathdee CA, Gavish H, Shannon WR, Buchwald M. Cloning of cDNAs for Fanconi's anaemia by functional complementation. *Nature* 1992;356:763-67.
9. The Fanconi Anaemia/Breast Cancer Consortium. Positional cloning of the Fanconi Anaemia Group A gene. *Nat Genet* 1996;14:324-328.
10. de Winter JP, Waisfisz Q, Rooimans MA, van Berkel CG, Bosnoyan-Collins L, Alon N, *et al.* The Fanconi Anaemia group G gene is identical with human XRCC9. *Nat Genet* 1998;20:281-283.
11. de Winter JP, Leveille F, van Berkel CG, Rooimans MA, van Der Weel L, Steltenpool J, *et al.* Isolation of a cDNA representing the Fanconi Anaemia Complementation Group E gene. *Am J Hum Genet* 2000;67:1306-8.
12. de Winter JP, Rooimans MA, van Der Weel L, van Berkel CG, Alon N, Bosnoyan-Collins L, *et al.* The Fanconi Anaemia Complementation Gene FANCF encodes a novel protein with homology to ROM. *Nat Genet* 2000;24:15-16.
13. Koc A, Pronk JC, Alikasifoglu M, Joenje H, Altay C. Variable pathogenicity of exon 43del (FAA) in four Fanconi anaemia patients within a consanguineous family. *Br J Haematol* 1999;1:127-30.
14. Faivre L, Guardiola P, Lewis C, Dokal I, Ebell W, Zatterale A, *et al.* Association of complementation group and mutation type with clinical outcome in Fanconi anaemia. *Blood* 2000;96:4064-70.
15. Noltmann EA. Aldose ketose isomerases. *Enzymes* 1972;1:271-353.
16. Brown J, Daar I, Maquat L, Krug J. Characterization of the functional gene and several processed pseudogenes in the

- human triosephosphate isomerase gene family. *Mol Cell Biol* 1985;5:1694-706.
17. Martinov MV, Plotnikov AG, Vitvitsky VM, Ataullakhanov FI. Deficiencies of glycolytic enzymes as a possible cause of haemolytic anaemia. *Biochim Biophys Acta* 2000;1474: 75-87.
  18. Enright CA, Sollner-Webb B. Ribosomal RNA processing in vertebrates. In: Higgins SJ and Hames BD. (eds.) *RNA processing. A practical approach*. Vol II. Oxford University Press, USA 1994;pp135-71.
  19. Dunbar DA, Baserga SJ. The U14 snoRNA is required for 2'-O-methylation of the pre-18S rRNA in *Xenopus* oocytes. *RNA*. 1998;4:195-204.
  20. Tollervey D, Lehtonen H, Jansen R, Kern H, Hurt EC. Temperature-sensitive mutations demonstrate roles for yeast fibrillarin in pre-rRNA processing, pre-rRNA methylation, and ribosome assembly. *Cell* 1993;3:443-57.
  21. Gall JG. A role for Cajal bodies in assembly of the nuclear transcription machinery. *FEBS Lett*. 2001; (2-3):164-7.