

Université de Montréal

Évaluation du rôle de p53 dans la régulation de la recombinaison
homologue et la stabilité génomique

Par :

Jean-François Lemelin

Programme de biologie moléculaire

Faculté des études supérieures

Mémoire présenté à la faculté des études supérieures

En vue de l'obtention du grade de Maîtrise (M.Sc)

En biologie moléculaire

Novembre 2004

© Jean-François Lemelin, 2004



Direction des bibliothèques

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulée :
Évaluation du rôle de p53 dans la régulation de la recombinaison
homologue et la stabilité génomique

Présenté par :
Jean-François Lemelin

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :
Abdellah Belmaaza PhD, Directeur de recherche
Christine Maugard MD/PhD 2^e évaluatrice
Elliot Drobetski PhD, Président rapporteur

Sommaire :

Un mécanisme par lequel p53 pourrait maintenir la stabilité du génome est l'inhibition de la recombinaison homologue (RH) chromosomique. Cette hypothèse découle du fait que p53 inhibe la RH dans un plasmide intégré contenant au moins deux gènes actifs : un gène rapporteur de la RH et un gène marqueur adjacent. Or, il a été démontré que deux gènes adjacents peuvent se réprimer mutuellement, et que p53 réprime l'expression de gènes rapporteurs. Nous avons donc voulu étudier l'effet de p53 sur la RH en absence de répression transcriptionnelle. Pour cela, nous avons développé un nouvel essai de RH où le type et l'orientation des promoteurs permettent d'éliminer l'interférence/répression transcriptionnelle. Ce plasmide a été intégré dans les lignées cellulaires humaines MCF-7 et HCT116. Nous avons exprimé l'oncogène viral HPV16-E6 pour induire la dégradation de p53 dans les deux lignées cellulaires. Les fréquences et les taux de RH ont été déterminés pour les cellules exprimant la forme sauvage de p53 et les cellules exprimant le E6. Nous avons trouvé que les fréquences et les taux de RH demeurent inchangés après la perte de p53. De plus, lorsque nous avons stimulé l'induction des cassures chromosomiques par la méganucléase I-SCEI, nous avons remarqué une modulation de la RH par p53, selon le site d'intégration. Nos résultats indiquent que p53 ne joue aucun rôle direct dans le contrôle de la RH. Par conséquent, nos résultats vont à l'encontre de l'hypothèse voulant que p53 inhibe les réarrangements génomiques en supprimant la RH. Ces résultats suggèrent aussi que la nature de l'essai est un facteur important pouvant influencer sur les résultats obtenus.

Mots clés : Recombain^{inaison} homologue/p53/interférence transcriptionnelle/suppression de promoteur/chromatine/effet de position

Abstract :

It has been proposed that p53 can maintain genomic stability through inhibition of homologous recombination (HR). Indeed, numerous studies have demonstrated that p53 can inhibit HR between repeated genes in an integrated plasmid containing at least 2 active genes: one reporter gene and one adjacent marker gene. The exact mechanism of this inhibition is not yet known. However, p53 can modify chromatin structure and repress transcription. Thus, in this study, we employed a chromosomal assay system in which the HR reporter gene is unaffected by transcriptional interference / promoter suppression by p53. To disrupt p53, we expressed the viral oncoprotein HPV16-E6 in recombination proficient MCF-7 and HCT116 cell lines where the assay plasmid was already integrated. HR frequencies and rates were determined for both p53 proficient and p53 deficient cell lines. Contrary to previous results, the HR rates remain unchanged in p53 +/+ and p53 -/- cells. When we stimulated HR with the meganuclease I-SCEI, a p53 effect was observed in an integration site dependent manner. Our results indicate that p53 does not play a direct role in the control of HR. These results also suggest caution when designing and using HR assay systems, since it appears to be an important determinant of the outcome.

Key words: Homologous recombination / p53 / transcriptional interference / promoter suppression / chromatin / position effect

Table des matières

Sommaire :	iii
Abstract :	iv
Table des matières.....	v
Liste des tableaux	viii
Liste des figures	ix
Abbréviations	Error! Bookmark not defined.
Chapitre 1.....	1
1. Introduction :	2
1.1 Cancers et Suppresseurs de tumeurs.....	2
1.1.1 Les supresseurs de tumeur	2
1.2 p53 : le « gatekeeper » ou « caretaker »	4
1.2.1 Structure de p53	4
1.3 P53 et la transcription	8
1.4 Activation de p53	9
1.4.1 Régulation de p53 en réponse aux dommages à l'ADN	9
1.5 P53 et les points de contrôle cellulaire.....	11
1.5.1 Arrêt du cycle en G1 /S.....	12
1.5.2 Phase S	12
1.5.3 Point de contrôle G2	12
1.5.4 P53 et l'apoptose	13
1.5.5 Phénotypes associés à une déficiences en p53	13
1.6 P53 et la réparation de l'ADN	16
1.6.1 P53 et la réparation par excision de nucléotide	16
1.6.2 P53 et la réparation par excision de bases (BER)	18
1.7 Réparation des cassures double-brins.....	18
1.7.1 La recombinaison illégitime « non-homologous end-joining »..	18
1.7.2 La recombinaison homologue non-conservative ou « single-strand annealing »	20

1.8	La recombinaison homologue conservative.....	22
1.9	P53 et recombinaison homologue	27
1.10	Objectifs.....	30
Chapitre 2.....		33
2.	The p53 protein does not regulate homologous recombination in transcriptionally active chromatin ¹	34
2.1	Abstract.....	36
2.2	Introduction	37
2.3	Results.....	42
2.3.1	Experimental design of the assay system.....	42
2.3.2	Wt p53 does not suppress intra-chromosomal HR in MCF-7 or HCT-116 cells.	44
2.3.3	Analyses of Puro ^R colonies.....	44
2.4	Discussion	46
2.5	Experimental Procedures.....	52
2.5.1	DNA Manipulations	52
2.5.2	Cell culture and transfections.....	52
2.5.3	Western Blot Analysis	53
2.5.4	HR rates.....	54
2.5.5	PCR analysis of Puro ^R colonies	54
2.6	References	56
2.7	Figure legends	62
Chapitre 3.....		69
3.	Matériels et méthodes.....	70
3.1	Extraction de l'ADN génomique	70
3.2	Analyse des recombinants par PCR	70
3.3	Induction de la cassure double brin	71
Chapitre 4.....		72
4.	Résultats.....	73
4.1	Le suppresseur de tumeur p53 n'est pas directement impliqué dans l'inhibition de la RH induite par I-SceI.	73

4.2	Structure des recombinants	Error! Bookmark not defined.
Chapitre 5.....		75
Discussion		75
5.	Discussion	76
5.1	L'expression de la protéine HPV16-E6 n'affecte pas le taux de recombinaison spontanée	76
5.2	La majorité des évènements de RH se font par conversion génique.....	Error! Bookmark not defined.
5.3	La dégradation de p53 par la protéine HPV16-E6 affecte la réparation des CDBs à certains sites génomique.	77
5.4	P53 et la RH, comment expliquer les contradictions.....	78
References		85

Liste des tableaux

Tableau 1 : Effect of p53 on spontaneous intra-chromosomal HR.....	66
Tableau 2 : Effect of p53 on gene conversion to crossover ratio in MCF-7 cells.....	74

Liste des figures

Figure 1. Structure de la protéine p53.....	7
Figure 2. Modèle de l'appariement simple-brin (SSA).....	21
Figure 3. Recombinaison homologue chez les mammifères.....	23
Figure 4. Modèle de Meselson et Radding.....	24
Figure 5. Schematic representations of the constructs developed for this study.....	65
Figure 6. Induction of p53 and p21 response to DNA damage.....	66
Figure 7. PCR analysis of Puro ^R genomic DNA.	66
Figure 7. PCR analysis of Puro ^R genomic DNA.	67
Figure 8. Induction relative de la recombinaison homologue par des CDBs en lignée cellulaire humaine.....	74

Abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique

ARN : Acide ribonucléique

BER : Réparation par excision de bases (base excision repair)

CDB : Cassure double-brin

CG : conversion génique (gene conversion)

CO : Crossover

CPD : Dimère de cyclopyrimidine

GNER : Réparation par excision de nucléotides globale

HPV16-E6 : Human papilloma virus type 16 E6 protein

HSV-tk : Herpes simplex virus thymidine kinase

IR : Radiation ionisante

MARs : Région d'attachement à la matrice

MEF : Fibroblaste embryonnaire de souris

NER : réparation par excision de nucléotides (nucléotide excision repair)

NHEJ : Non-homologous end-joining (

RH : Recombinaison homologue

SSA : Single-strand annealing

SV40 : Simian virus 40

TCNER : Réparation par excision de nucléotides couplée à la transcription

UV : Radiation ultra-violette

Chapitre 1

Introduction

1. Introduction :

1.1 Oncogène, supresseurs de tumeurs et carcinogenèse

Les cancers se développent en une série d'étapes dans lesquelles une succession de mutation somatique ou germinale suivi d'un processus de sélection génèrent des phénotypes favorisant la croissance néoplasique (Macleod, 2000). Parfois, des mutations germinales permettent d'accélérer le processus de carcinogenèse et prédisposent aux cancers. Ces mutations, impliquées dans la tumorigénèse, peuvent se produire dans deux classes de gènes : les oncogènes et les supresseurs de tumeurs. Une mutation dans un oncogène entraîne un gain de fonction stimulant la tumorigénèse, alors qu'une mutation dans un supresseur de tumeur entraîne une perte de fonction stimulant la croissance des néoplasies. L'objet de cette étude ciblera le supresseur de tumeur p53

1.1.1 Les supresseurs de tumeur

Les supresseurs de tumeur ont initialement été identifiés dans les syndromes héréditaires (Macleod, 2000). En 1971, aux cours d'études sur le rétinoblastome, Alfred Knudson émet l'hypothèse des deux coups (two-hit hypothesis) pour le développement du cancer (Knudson, 1971). Cette hypothèse suggère à nécessité de deux évènements génétiquement indépendants au niveau du gène Rb pour le développement du rétinoblastome. Le gène Rb n'a besoin que d'un allèle actif pour réprimer le développement du rétinoblastome; Rb peut donc être qualifié de supresseur de tumeur. À ce jour, plus de vingt supresseurs de tumeur ont été identifiés dont Rb, BRCA1, BRCA2, p53, p16, PTEN, APC, etc. Une diminution

d'expression d'un suppresseur de tumeur, qu'elle soit causée par une mutation ou par un autre mécanisme (méthylation du gène, dégradation excessive de la protéine,...) prédispose la cellule affectée à la tumorigénèse. Il est à noter que certaines mutations dominantes de p53 stimulent la formation de cancer, dans ces cas, p53 se comporte donc comme un oncogène.

Les mécanismes par lesquels les gènes suppresseurs de tumeurs préviennent la progression tumorale, peuvent être classés en trois catégories : 1. les fonctions « gatekeeper », 2. les fonctions « caretakers », et 3. les fonctions « landscapers ». Ces fonctions ne sont pas exclusives. Les « gatekeepers » sont impliqués dans l'inhibition de la croissance cellulaire que ce soit au niveau de l'inhibition de la prolifération, de l'induction de l'apoptose, de la sénescence, ou dans la différenciation cellulaire. Rb, p53, et APC sont des exemples de gènes « gatekeepers ». Ceux-ci préviennent la progression de la croissance de la tumeur, leur perte est une étape limitante dans le processus de la tumorigénèse, et si l'on restaure leur expression dans une tumeur, il y a suppression de la néoplasie.

Une deuxième classe importante de suppresseur de tumeur est la classe des « caretakers ». Ces gènes participent à la prévention de la tumorigénèse en préservant la stabilité du code génétique. Ces gènes sont pour la plupart impliqués dans la réparation de l'ADN ou dans la prévention de la transmission des dommages à l'ADN aux générations cellulaires subséquentes. La perte d'un « caretaker » entraîne une augmentation du taux de mutation, haussant ainsi la probabilité d'avoir une mutation dans un suppresseur de tumeur ou dans un oncogène. MSH2, MLH1, p53, BRCA1, et BRCA2 sont de bons exemples de « caretakers ». La troisième classe de suppresseur de tumeur comprend les « landscapers ». Les « landscapers » sont principalement impliqués dans le maintien du microenvironnement cellulaire soit en régulant l'expression de protéines de la matrice extracellulaire, l'expression et la sécrétion de facteurs de survie et de croissances cellulaires, l'expression de molécules d'adhésion, et finalement

dans l'expression de protéines de surface cellulaire. La perte d'un « landscaper » entraîne la formation d'un microenvironnement favorisant le développement néoplasique.

À cause de ses implications dans la régulation du cycle cellulaire, et dans la réparation de l'ADN, le suppresseur de tumeur p53 est à la fois un « gatekeeper » et un « caretaker », ce qui lui a valu l'appellation de gardien du génome.

1.2 p53 : le « gatekeeper » ou « caretaker »

Découvert en 1979 lors d'études sur la protéine Grand T du virus SV40, p53 a initialement été considérée comme étant un oncogène dû à sa surexpression dans plusieurs cancers et à sa coopération avec l'oncogène RAS dans des essais de transformation (Lane and Crawford, 1979; Linzer and Levine, 1979). Cependant, il a vite été établi que ses activités de transformation cellulaire étaient dues à l'utilisation d'une forme mutante de p53 lors des essais. P53 est donc plutôt un suppresseur de tumeur et non un oncogène (Baker et al., 1990; Chen et al., 1990; Eliyahu et al., 1989). Le lien entre p53 et le cancer a de plus été renforcé par l'étude du syndrome héréditaire Li-Fraumemi où les patients possèdent un allèle mutant de p53, et sont prédisposés au cancer (Malkin et al., 1990). Chez l'humain, p53 est mutée dans approximativement 50 % de tous les cancers (Hollstein et al., 1991), et l'activité de p53 est déficiente dans la majorité des cas restants (Levine, 1997a; Lozano and Elledge, 2000; Vogelstein et al., 2000). Aussi, les tumeurs p53 déficientes présentent des fréquences élevées d'aberrations génétiques telles que translocations, amplifications géniques, aneuploïdies, et perte d'hétérozygotie (Bischoff et al., 1990; Livingstone et al., 1992; Yin et al., 1992).

1.2.1 Structure de p53

Le gène *p53* est localisé au locus 17p13.1, il code pour un facteur de transcription. Il comporte 11 exons qui produisent un ARNm de 2.2 à 2.5 kb (Fisher, 2001; Levine, 1997a; Robles et al., 2002; Smith et al., 2003; Wahl and Carr, 2001). *P53* code pour un polypeptide de 393 acides aminés (a. a.) migrant à 53 kDa sur gel électrophorétique. On peut diviser *p53* en 5 domaines, le domaine de transactivation, le domaine proline-riche, le domaine de liaison à l'ADN, le domaine de tetramérisation, et la partie C-terminale basique (figure 1).

Les premiers 42 a. a. de la partie N-terminale de *p53* constituent le domaine de transactivation. Celui-ci interagit avec plusieurs composantes de la machinerie de transcription dont la protéine liant la boîte TATA (TBP), et les composantes du facteur de transcription TFIID : ERCC2 et ERCC3, (Ko and Prives, 1996; Levine, 1997a; Smith et al., 2003). Ces interactions permettent à *p53* de favoriser l'activation et la répression d'une multitude de gènes, responsable en partie, de la réponse de *p53* à divers signaux. L'activité transcriptionnelle de *p53* est négativement régulée par MDM2 qui lie *p53* dans sa partie N-terminale (Alarcon-Vargas and Ronai, 2002).

Le domaine riche en proline (a. a. 61-94) contenant les séquences PXXP (où p désigne les prolines et x n'importe quel acide aminé) est responsable de la liaison aux molécules contenant un domaine de liaison SH3. Cette région semble être impliquée dans l'arrêt du cycle cellulaire et l'induction de l'apoptose (Venot et al., 1998; Walker and Levine, 1996).

La partie centrale de *p53* (a.a. 97-300) contient le domaine de liaison à l'ADN. Cette partie joue un rôle dans la liaison séquence spécifique de *p53* à l'ADN. Lors de la liaison à l'ADN, le tétramère de *p53* reconnaît une quadruple répétition de la séquence consensus 5'-PuPuPuC(A/T)-3' (Levine, 1997a; Robles et al., 2002). Soulignant l'importance de ce domaine dans la prévention de la carcinogenèse, 90% des mutations ponctuelles affectant *p53* se situent dans cette portion de la protéine (Cho et al., 1994; Hollstein et al., 1994).

Dans sa forme native, p53 forme un homotétramère composé de deux dimères, formant deux feuillets β et deux hélices α . Les séquences responsables de cette tétramérisation sont les résidus 324-355. Les résidus 287-323 forment un joint flexible entre la région centrale et le domaine de tétramérisation (Jeffrey et al., 1995).

En dernier lieu, la partie C-terminale semble permettre la reconnaissance de dommages à l'ADN en liant l'ADN simple brin (Bakalkin et al., 1995; Bakalkin et al., 1994), les insertions, les délétions, les mésappariements (Lee et al., 1995), et les intermédiaires de recombinaison (Dudenhoffer et al., 1998). Aussi, la perte de cette région inhibe la répression transcriptionnelle p53-dépendante (Ho and Benchimol, 2003a)

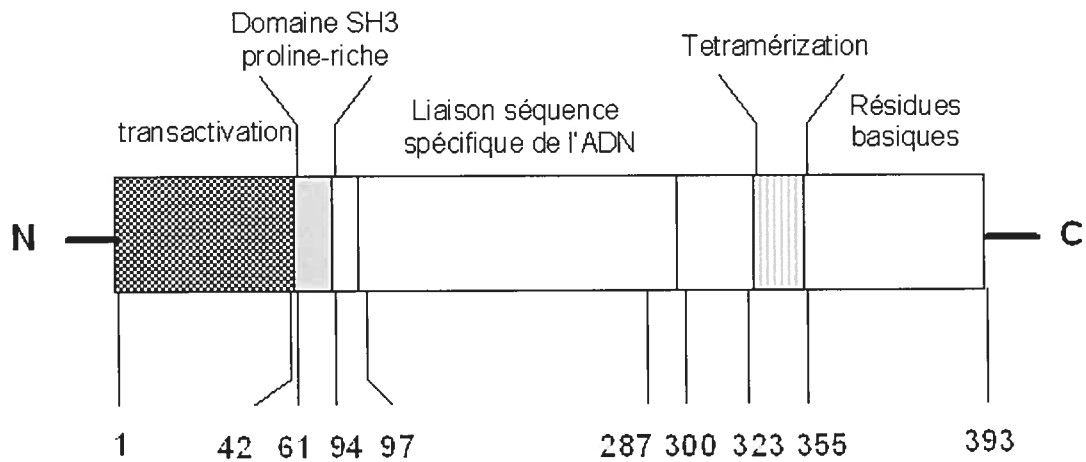


Figure 1. Structure de la protéine p53.

P53 est composé de 393 a.a. La partie N-terminale contient un domaine de transactivation pouvant lier plusieurs composantes de la machinerie transcriptionnelle. Le domaine SH3 proline-riche, permet la liaison aux protéines contenant un motif SH3. La partie centrale de p53 Médie la liaison séquence spécifique à l'ADN. Dans la partie C-terminale on trouve le domaine de tétramérisation ainsi qu'un domaine basique impliqué dans la répression transcriptionnelle.

1.3 P53 et la transcription

P53 est un facteur de transcription pouvant lier l'ADN et induire l'activation de la transcription de gènes spécifiques (Ho and Benchimol, 2003a). La séquence consensus reconnue par p53 est constituée de deux répétitions 5'-PuPuPuC(A/T)(A/T)GPyPyPy-3', séparée par 0-13 bp. L'activité transcriptionnelle de p53 semble être d'une importance capitale dans la régulation de ses activités apoptotiques et du cycle cellulaire. Plusieurs gènes tels que *p21*, *GADD45*, *Bax*, et *14-3-3 σ* sont régulés par p53 lors de stress cellulaires.

Contrastant avec la multitude d'études portant sur la transactivation de gènes par p53, relativement peu d'information est disponible sur les mécanismes entourant la répression transcriptionnelle par p53. En effet, l'analyse de l'expression globale par micropuces à l'ADN révèle que 85% des gènes modulés par p53 sont réprimés plutôt qu'activés. P53 peut réprimer la transcription par trois mécanismes : 1- l'interférence avec des activateurs transcriptionnels tels que HNF-3 et SP1. 2- L'interférence avec la machinerie transcriptionnelle, notamment pour les promoteurs TATA, en interagissant avec la protéine liant la boîte TATA (TBP) et certaines TAFs. 3- La modification de la structure de la chromatine au niveau des promoteurs. Soit par le recrutement de HDAC par mSin3a ou par d'autres mécanismes encore inconnus (Ho and Benchimol, 2003a).

Mais comment p53 peut-il « choisir » entre la répression et la transactivation? Des observations récentes indiquent que l'orientation des séquences consensus par rapport à elles-mêmes (convergente ou divergente), ainsi qu'un effet de position, pourrait expliquer ce choix (Cook et al., 1999a; Johnson et al., 2001).

1.4 Activation de p53

1.4.1 Régulation de p53 en réponse aux dommages à l'ADN

P53 est exprimée à faible niveau dans les cellules de mammifère, et a une demi-vie de 20-30 minutes (Kubbutat et al., 1998) due à une dégradation rapide ubiquitine dépendante (Chowdary et al., 1994; Lopes et al., 1997; Maki et al., 1996). Cette dégradation se produit lorsque des molécules d'ubiquitine sont liées à des résidus sérine, ce qui dirige les protéines marquées vers le protéasome 26S (Ciechanover, 1998). Une protéine qui joue un rôle central dans la régulation de p53 est MDM2 (HDM2 chez l'humain), celle-ci lie le domaine de transactivation de p53 et agit en tant qu'ubiquitine ligase qui stimule l'ubiquitination de p53 et conséquemment la dégradation par le complexe du protéasome/26S (Fuchs et al., 1998a; Haupt et al., 1997; Honda and Yasuda, 2000; Kubbutat et al., 1997). De plus, MDM2 contient des séquences d'importation et d'exportation nucléaire, ce qui permet le transport de p53 vers le cytoplasme où elle sera dégradée (Freedman and Levine, 1998; Roth et al., 1998). P53 est aussi régulée par JNK, une kinase activée par les stress cellulaires (Ip and Davis, 1998). Tout comme MDM2, JNK lie p53 (a.a. 97-116) et stimule sa dégradation ubiquitine dépendante (Adler et al., 1997; Fuchs et al., 1998b). JNK est aussi capable de stabiliser p53 puisqu'une signalisation par MEKK1/JNK augmente les niveaux de p53 et diminue la dégradation de p53 par le protéasome (Fuchs et al., 1998c).

L'activation de p53 en réponse aux dommages à l'ADN comporte de multiples facettes. Des augmentations de la transcription et de la traduction de p53 ont été caractérisées en réponse aux stress, mais les composantes qui impliquent une augmentation rapide de l'activité de p53 agissent surtout par une stabilisation de la protéine et plusieurs modifications post traductionnelles. En réponse à des stress cellulaires, p53 est phosphorylée sur sa partie N-terminale par plusieurs kinases (Meek, 1998). Cette phosphorylation empêche la liaison de MDM2 avec p53, ce qui inhibe la

dégradation de p53 et entraîne sa stabilisation (Chehab et al., 2000; Hirao et al., 2000; Sakaguchi et al., 2000; Shieh et al., 2000; Shieh et al., 1999). ATM, ATR, Chk1, et Chk2 sont les principales kinases impliquées dans la phosphorylation de p53 en réponse aux dommages à l'ADN, et une perte d'activité de ces kinases limite sévèrement la réponse de p53 envers les dommages dus aux radiations ionisantes (RI) et ultraviolettes (UV) (Lakin and Jackson, 1999). Notons que la phosphorylation de p53 diffère selon le type d'injure subit.

En réponse à des cassures doubles-brins (CDBs) induites par des RI, ATM phosphoryle p53 sur le résidu *ser15* (Banin et al., 1998; Canman and Lim, 1998; Canman et al., 1998). Dans les cellules provenant de patients ataxia tangiectasia (cellules AT) où ATM est déficient, il y a un retard dans la stabilisation de p53 associé à une diminution de la phosphorylation de *ser15*, provoquant ainsi une résistance aux RI (Canman et al., 1998; Lavin and Shiloh, 1996; Shieh et al., 1997; Siliciano et al., 1997). À l'opposé des RI, les cellules ATM *-/-* irradiées aux UV montrent une stabilisation ainsi qu'une phosphorylation de *ser15* normale de p53 (Banin et al., 1998). L'activation de p53 par les UV est contrôlée par ATR qui phosphoryle p53 aux sérines 15 et 37 en réponse aux UV (Hall-Jackson et al., 1999; Tibbetts et al., 1999). ATR est aussi impliquée dans l'activation tardive de p53 en réponse aux UV et aux RI (Tibbetts et al., 1999; Wright et al., 1998).

Deux autres kinases, Chk1 et Chk2, sont impliquées dans l'activation de p53. Ces deux protéines, en réponse à des dommages à l'ADN, phosphorylent p53 sur le résidu *ser20*, ce qui permet sa stabilisation en provoquant la dissociation des complexes MDM2/p53 (Chehab et al., 2000; Hirao et al., 2002; Shieh et al., 2000). Ces deux kinases sont différenciellement régulées selon le type de dommages subit. Après une irradiation aux RI, ATM phosphoryle et active Chk2, alors que Chk1 est phosphorylée et activée par ATR en réponse aux rayons UV (Ahn et al., 2000; Guo et al., 2000; Liu et al., 2000; Matsuoka et al., 1998; Matsuoka et al., 2000; Melchionna et al., 2000).

La phosphorylation de p53 n'est pas l'unique modification post traductionnelle. L'acétylation de la partie C-terminale de p53 par des protéines tel que p300/CBP et PCAF entraînent, *in vitro*, une augmentation de la liaison de p53 à l'ADN de manière séquence spécifique, et par conséquent augmente son activité transcriptionnelle (Gu and Roeder, 1997; Liu et al., 1999; Sakaguchi et al., 1998). D'autres modifications de p53 tel que la sumoylation (Gostissa et al., 1999; Muller et al., 2000; Rodriguez et al., 1999), la glycosylation, et la ribosylation par PARP (Kumari et al., 1998; Vaziri et al., 1997) ont aussi été démontrées comme étant capables d'affecter la stabilité de p53.

1.5 P53 et les points de contrôle cellulaire

Chez les cellules eucaryotes, des mécanismes ont été mis en place pour assurer le déroulement et la fidélité d'évènements propres à chaque phase du cycle cellulaire. Ces mécanismes, appelés points de contrôles cellulaires, permettent soit l'entrée dans la phase suivante du cycle cellulaire, soit l'arrêt du cycle (Hartwell and Weinert, 1989). En réponse à des dommages cellulaires, notamment des dommages à l'ADN, les points de contrôles activent des voies de signalisations qui empêchent la progression du cycle cellulaire pour permettre la réparation des dommages (Hartwell and Kastan, 1994; Kastan et al., 2000; Khanna and Jackson, 2001a; Vogelstein et al., 2000; Zhou and Elledge, 2000). Ces voies de signalisation peuvent aussi induire la mort cellulaire programmée (apoptose) lorsque les dommages sont trop importants. Des erreurs au niveau des points de contrôles cellulaires peuvent résulter en mutations, aberrations chromosomiques, et aneuploïdies; évènements pouvant contribuer aux processus de la tumorigénèse (Paulovich et al., 1997).

1.5.1 Arrêt du cycle en G1 /S

Le point de contrôle cellulaire G1/S est activé en réponse à des dommages à l'ADN et a pour but d'empêcher la réplication d'ADN endommagé. P53 joue un rôle majeur dans l'activation du point de contrôle G1/S en réponse à des dommages à l'ADN. Lors d'un stress génotoxique, p53 active la transcription de p21, une protéine capable de lier et d'inactiver les complexes cycline-Cdk (el-Deiry et al., 1993). En inactivant les complexes cycline-Cdk, p21 provoque l'hypophosphorylation de pRB et la séquestration de E2F, étapes essentielles pour empêcher la progression du cycle cellulaire vers la phase S (Sherr and Roberts, 1995). Lorsque p21 est absent, des cellules p53 positives ne peuvent bloquer le cycle cellulaire en G1/S en réponse à des dommages à l'ADN, confirmant ainsi rôle essentiel de p21 dans la réponse p53-dépendante aux dommages à l'ADN (Brugarolas et al., 1995; Deng et al., 1995; Waldman et al., 1995).

1.5.2 Phase S

L'arrêt du cycle cellulaire en phase S sert principalement à empêcher la fixation de mutation par la synthèse d'ADN. La participation de p53 dans ce point de contrôle peut se faire par l'intermédiaire de p21 qui peut lier PCNA et empêcher l'étape d'élongation de la synthèse d'ADN (Waga et al., 1994; Waga and Stillman, 1998). P53 semble aussi avoir la capacité d'arrêter la cellule en S par d'autres mécanismes encore inconnus (Agarwal et al., 1998; Shimura et al., 2002a; Shimura et al., 2002b)

1.5.3 Point de contrôle G2

P53 et son effecteur p21 peuvent agir sur le point de contrôle G2 en permettant le maintien de l'arrêt en G2 en réponse à des dommages à l'ADN, puisqu'en absence de ces protéines, la cellule procède vers la mitose plus rapidement (Bunz et al., 1998). P53 peut aussi provoquer un arrêt du cycle cellulaire en G2 en réprimant l'expression de la cycline B1 et de Cdc2,

deux protéines essentielles à la progression du cycle cellulaire (Flatt et al., 2000; Taylor et al., 1999). De plus, p21 est capable d'inhiber l'activité des cyclines complexes B1-Cdc2, probablement en liant le complexe tel que démontré *in vitro* (Harper et al., 1993; Innocente et al., 1999). Enfin, p53 peut augmenter la transcription de 14-3-3 σ et de GADD45, deux protéines capables d'inactiver les complexes cyclineB1-Cdc2 (Chan et al., 1999; Wang et al., 1999; Zhan et al., 1999).

1.5.4 P53 et l'apoptose

L'arrêt du cycle cellulaire induit par p53 permet à la cellule de réparer les dommages afin de poursuivre son cycle sans encombre. Mais lorsque les dommages sont trop importants, p53 peut aussi induire la mort cellulaire programmé ou apoptose (Bennett et al., 1998; Fisher, 2001; Lane et al., 1994; Oren, 2003; Sionov and Haupt, 1999).

En premier lieu, p53 peut induire l'apoptose en activant l'expression de gènes pro-apoptotiques tels que IGF-1BP3, Fas, et Bax. P53 peut aussi induire l'apoptose en inhibant l'expression de protéines anti-apoptotique dont Bcl-2 ou en bloquant la signalisation de survie cellulaire en inhibant l'expression de récepteurs tels que IGF-1R.

Nonobstant le rôle important de la transactivation dans l'apoptose p53-dépendante, p53 peut aussi activer l'apoptose par des mécanismes indépendants de son activité de transactivation. En effet, une fraction de p53 activée transloque à la mitochondrie, ce qui permet d'induire l'apoptose par le relâchement du cytochrome *c* (Mihara et al., 2003).

1.5.5 Phénotypes associés à une déficience en p53

Dans le but d'évaluer le rôle de p53 dans la tumorigénèse, l'étude du dysfonctionnement de p53 a été faite chez l'humain en étudiant la génétique humaine, et lors d'études *in vivo* en laboratoire.

Chez l'humain, les mutations dans le gène p53 sont les altérations génétiques les plus fréquemment retrouvées dans les cancers (Freboung and Friend, 1992). En effet, tel que mentionné précédemment, la majorité des cancers chez l'humain présentent un dysfonctionnement de p53. Une maladie associée à une dysfonction de p53 est le syndrome de Li Fraumeni. Ce syndrome se caractérise par une incidence élevée de cancers, en particulier de sarcomes, ostéosarcomes, cancers du sein, cancers du cerveau, leucémies, et de carcinome adrenocortical. De plus, l'étude de fibroblastes Li Fraumeni montre une fréquence très élevée d'aberrations chromosomiques et génétiques (Eyfjord et al., 1995).

Pour confirmer les observations chez l'humain, des formes dysfonctionnelles de p53 ont été introduites chez la souris. L'introduction dans des souris p53 +/+, d'allèles dominants négatifs différents de la forme sauvage par des substitutions p53 ¹⁹³Arg > Pro et ¹³⁵Ala > Val, présentent une incidence de cancer de 20 %. De plus, malgré une expression généralisée du transgène, il semble que la fréquence d'apparition de tumeurs varie d'un tissu à l'autre, avec une préférence pour les ostéosarcomes, les lymphomes, et les adénocarcinomes pulmonaires (Lavigueur et al., 1989).

Pour étudier l'effet de l'absence de p53 sur la tumorigénèse, diverses stratégies ont été utilisées pour éliminer p53 par recombinaison homologue (Donehower et al., 1992; Gondo et al., 1994; Jacks et al., 1994; Purdie et al., 1994). Les souris p53 -/- issues de ces stratégies ne possèdent pas d'ARNm ni de protéines détectables. Elles sont viables, mais ont une fréquence élevée de tumeurs spontanées. À l'instar des souris transgéniques présentant un allèle p53 dominant négatif, 75 % des souris p53 -/- développent des tumeurs, principalement des sarcomes et de lymphomes, dans les 6 premiers mois de leur vie, et 100 % des souris ont des tumeurs ou sont mortes avant 10 mois. Pour les souris p53 +/-, 50 % des hétérozygotes développent des tumeurs avant l'âge de 18 mois, et 90 % ont des tumeurs ou sont mortes avant l'âge de 2 ans. De plus, il a été démontré que chez les

souris p53 +/-, une réduction du dosage de p53 augmentait les risques de tumorigénèse.

En plus d'être prédisposées au développement spontané de tumeurs, les souris p53, l'irradiation de souris p53 -/- par des rayons ultraviolets stimule fortement la formation de cancers de la peau, 100 % des souris développent des tumeurs avant 16 semaines, tandis qu'aucune des souris p53 +/+ n'ont développées de tumeurs à 17 semaines post irradiation (Jiang et al., 1999; Li et al., 1998). Lorsque traitées aux radiations ionisantes (RI), des souris, exprimant un p53 dominant négatif ou ayant perdu leurs p53 par recombinaison homologue, développent rapidement des sarcomes et des lymphomes (Gurley et al., 1998; Lee et al., 1994). De plus, ces souris présentent une accumulation 2 fois plus élevée de cassures double-brins de l'ADN induites par les RI que les souris exprimant la forme sauvage de p53. D'ailleurs, des cellules extraites de souris p53-/- exposées à des RI ont une fréquence élevée d'aberrations génétiques à la fois interchromosomique et intrachromosomique, comparativement à des souris p53 +/+ (Bouffler et al., 1995; Liang et al., 2002; Wang et al., 1996).

Dans le but d'évaluer le rôle de p53 dans la réponse à des agents génotoxiques et dans le maintien de la stabilité du génome, des études ont été faites sur des cultures primaires et des lignées cellulaires, traitées avec des agents génotoxiques. Chez les fibroblastes provenant de souris dont p53 a été inactivée, il y a une apparition rapide d'anomalies chromosomiques pour les cellules homozygotes, alors que l'apparition de ces anomalies est plus lente pour les cellules hétérozygotes (Harvey et al., 1993). Les cellules, extraites de différents organes de jeune souris p53 -/- (4-6 semaines), présentent une augmentation des aneuploïdies, amplifications géniques, et amplifications de centrosomes (Fukasawa et al., 1997). Enfin, l'instabilité p53-dépendante semble être impliquée dans le mécanisme de perte d'hétérozygotie. Des fibroblastes provenant de souris p53 -/-, et présentant

des délétions chromosomiques, duplications chromosomiques et perte de chromosomes, montrent une fréquence trois fois supérieure de perte d'hétérozygotie au locus de l'*Aprt* (adénine phosphoribosyltrasferase) (Shao et al., 2000).

1.6 P53 et la réparation de l'ADN

P53 peut aussi prévenir l'accumulation de dommages en modulant certains mécanismes de réparation de l'ADN. En réponse à des stress génotoxiques, p53 peut s'impliquer dans la réparation de l'ADN par divers mécanismes, dont la transactivation de gènes impliqués dans la réparation de l'ADN et l'interaction directe avec des composantes des voies de réparation (Janus et al., 1999).

1.6.1 P53 et la réparation par excision de nucléotide

Les cellules procaryotes ainsi qu'eucaryotes sont équipées de plusieurs mécanismes de réparation de l'ADN pouvant éliminer une grande variété de lésions à l'ADN incluant les cassures simple-brin, les bases endommagées et les « crosslinks » de l'ADN. Parmi ces mécanismes, la réparation de dommages par excision de nucléotide (NER) permet l'élimination d'une multitude de lésions, dont les dimères de cyclobutane pyrimidine (CPD) et les photoproduits pyrimidine 6-4 pyrimidone induites par les UV, et les cyclopurines et autres lésions induites par une variété de produits chimiques dont l'aflatoxinB1 et le benzo[a]pyrène (van Hoffen et al., 2003). Notons que le NER peut se subdiviser en deux mécanismes distincts : la réparation par excision de nucléotide globale (GNER) et l'excision de nucléotide couplée à la transcription (TCNER). Le NER procède par une série d'étapes qui sont les suivantes : 1) la détection des lésions, 2) la formation d'une incision simple-brin de chaque côté de la lésion, 3) l'excision de l'ADN simple-brin contenant la lésion, 4) synthèse d'ADN pour remplir l'espace simple-brin, et 5) une étape de ligation pour refermer la coupure simple-brin. Là où les deux sous-mécanismes diffèrent, est dans la reconnaissance des dommages. En

effet, le GNER agit autant dans l'euchromatine que dans l'hétérochromatine, et il peut réparer autant les brins transcrits que non transcrits; alors que le TCNER est spécifique aux brins transcrits.

Les cellules p53 déficientes sont plus sensibles aux rayons UV que des cellules p53 normales. Cette sensibilité est en partie causée par une défectuosité dans la réparation des dommages causés par les UV (Ford and Hanawalt, 1997; Smith et al., 1995). Est-ce que l'inactivation de p53 se traduit par une défectuosité dans le GNER, ou dans le TCNER? Il a été démontré que p53 est requis pour enlever les CPDs du brin non transcrit du gène DHFR, alors que la réparation du brin transcrit n'était pas affectée par p53 (Ford and Hanawalt, 1995; Ford and Hanawalt, 1997; Wang et al., 1995). Ces évidences semblent impliquer p53 dans le GNER mais pas dans le TCNER puisque la fréquence de réparation du brin transcrit n'était pas affectée par p53. Cependant, d'autres évidences obtenues avec un essai similaire et utilisant le PCR médié par la ligation (ligation mediated PCR), ont montrée que p53 était impliqué non seulement dans le GNER, mais aussi dans le TCNER (Therrien et al., 1999).

P53 peut agir sur le NER de différentes manières. En premier lieu, p53 régule spécifiquement la transcription de p48XPE et de XPB (Amundson et al., 2000; Hwang et al., 1999). P53 régule aussi Gadd45, une protéine capable de lier les dommages à l'ADN induits par les UV, et qui, lorsque absente, semble induire des défauts dans la réparation par NER (Carrier et al., 1999; Hollander et al., 2001; Smith et al., 2000). Deuxièmement, p53 interagit avec plusieurs protéines impliquées dans le NER, dont RPA, XPB, XPC, TFIIH, et CSB (Coverley et al., 1991; Dutta et al., 1993; Wang et al., 1995). En troisième lieu, p53 peut stimuler le NER en agissant comme facteur d'accessibilité de la chromatine (Rubbi and Milner, 2003a). En effet, en réponse à des dommages induits par des UV, p53 induit l'acétylation des histones H3 et provoque une relaxation globale de la chromatine, donnant ainsi accès à la machinerie de réparation aux sites de dommages.

1.6.2 P53 et la réparation par excision de bases (BER)

Un autre type de dommage induit par les UV, les RI et le MMS entre autres, est l'alkylation de la position N7 des résidus guanines et la désamination d'une cytosine pour donner un uracile (Seeberg et al., 1995). Ces bases endommagées sont excisées par une série de protéines, notamment des glycosylases spécifiques aux types de dommages, une AP endonucléase (HAP1), l'ADN polymérase β , XRCC1, et soit la ligase III ou la ligase I. Malgré un manque de connaissance sur les mécanismes impliqués, p53 semble aussi être impliqué dans le BER, puisqu'il stimule celui-ci et que des cellules p53-déficientes, sont aussi BER déficiente (Offer et al., 2001a; Offer et al., 2001b; Zhou et al., 2001).

1.7 Réparation des cassures double-brins

La forme la plus létale de dommage à l'ADN est la cassure double-brins (CDB). Lorsque non réparées, les CDBs sont une cause importante d'aberrations chromosomiques pouvant entraîner la mort cellulaire ou la tumorigénèse. Les CDBs peuvent être causées par les RI, par des agents chimiques imitant les RI, par la rencontre entre la fourche de réplication et une cassure simple-brin, et par des protéines spécifiques lors de la méiose (Haber, 2000; Karran, 2000)). Différents mécanismes sont utilisés par les cellules pour réparer les CDBs.

1.7.1 La recombinaison illégitime « non-homologous end-joining »

La recombinaison illégitime (NHEJ) est un mécanisme important dans la réparation des CDBs (Lieber et al., 2003), ainsi que lors de la recombinaison V(D)J et dans les réarrangements des immunoglobulines. Le NHEJ se produit par une action limitée de nucléases sur les extrémités, suivie par un

appariement et la ligation des deux extrémités. Le NHEJ est assuré par la ligase IV, XRCC1, WRN, et le complexe de la protéine kinases ADN-dépendante (DNA-PK). Le complexe de la DNA-PK est composé de Ku70 et de Ku80, deux protéines aussi impliquées dans le maintien des télomères, ainsi que la sous-unité catalytique DNA-PKc. Lors d'une CDB, un hétérodimère de Ku70 et de Ku80 lie les bouts d'ADN et recrute le complexe ligase IV-XRCC4 pour permettre la ligation des deux bouts. Le complexe Ku facilite aussi le recrutement de DNA-PKc au niveau de la cassure et complète la formation du complexe DNA-PK fonctionnel. La protéine WRN est probablement aussi impliquée dans le NHEJ. En effet, WRN forme un complexe avec les DNAPKcs et Ku, et semble être impliquée dans le déplacement des DNA-PKCs des extrémités de l'ADN (Li and Comai, 2002). Aussi, certaines évidences montrent une implication du complexe RAD50-MRE11-NBS1 dans le NHEJ. Ce complexe possède des activités hélicase et exonucléase suggérant un rôle dans le traitement des CDBs avant la réparation par le NHEJ. La perte du NHEJ entraîne une augmentation du nombre de cassure chromosomique, la formation de réarrangements chromosomiques, et une augmentation de la tumorigénèse. Néanmoins, le processus de NHEJ n'est pas parfait. En effet, le NHEJ s'accompagne souvent de délétion/insertion de quelques nucléotides, ce qui peut entraîner des mutations nuisibles lorsque effectué dans une séquence régulatrice ou codante. Ainsi, lorsqu'il y a plusieurs cassures présentes simultanément dans une cellule, le NHEJ peut provoquer des aberrations chromosomiques en joignant les bouts de deux CDBs. Cet événement peut provoquer des inversions ou des délétions lorsque les cassures sont sur le même chromosome, ou des translocations lorsque les cassures sont sur deux chromosomes différents (Khanna and Jackson, 2001a).

1.7.2 La recombinaison homologue non conservative ou « single-strand annealing »

Un second mécanisme de réparation des CDBs est l'appariement simple-brin ou « single-strand annealing » (SSA) (Belmaaza and Chartrand, 1994; Haber, 2000; Karran, 2000). À l'instar du NHEJ qui ne requiert peu ou pas d'homologie entre les deux bouts à joindre, le SSA utilise l'homologie entre les deux extrémités de la cassure pour régénérer un brin continu d'ADN. Lors d'une CDB, les parties 5' des deux bouts de la cassure sont dégradés par des nucléases pour révéler des séquences complémentaires qui pourront par la suite s'apparier (figure 2). Ce mécanisme de réparation est considéré comme non-conservatif puisqu'il provoque des délétions entre des séquences répétitives. La phase de digestion est médiée par le complexe protéique NBS1/MRE11/RAD50. Par la suite, Rad52 catalyse l'appariement des deux brins d'ADN. Finalement la coupure des queues 3' simple-brin non homologues est faite par les endonucléases XPF/ERCC1 et requiert la présence de Msh2 et Msh3 pour stabiliser les queues.

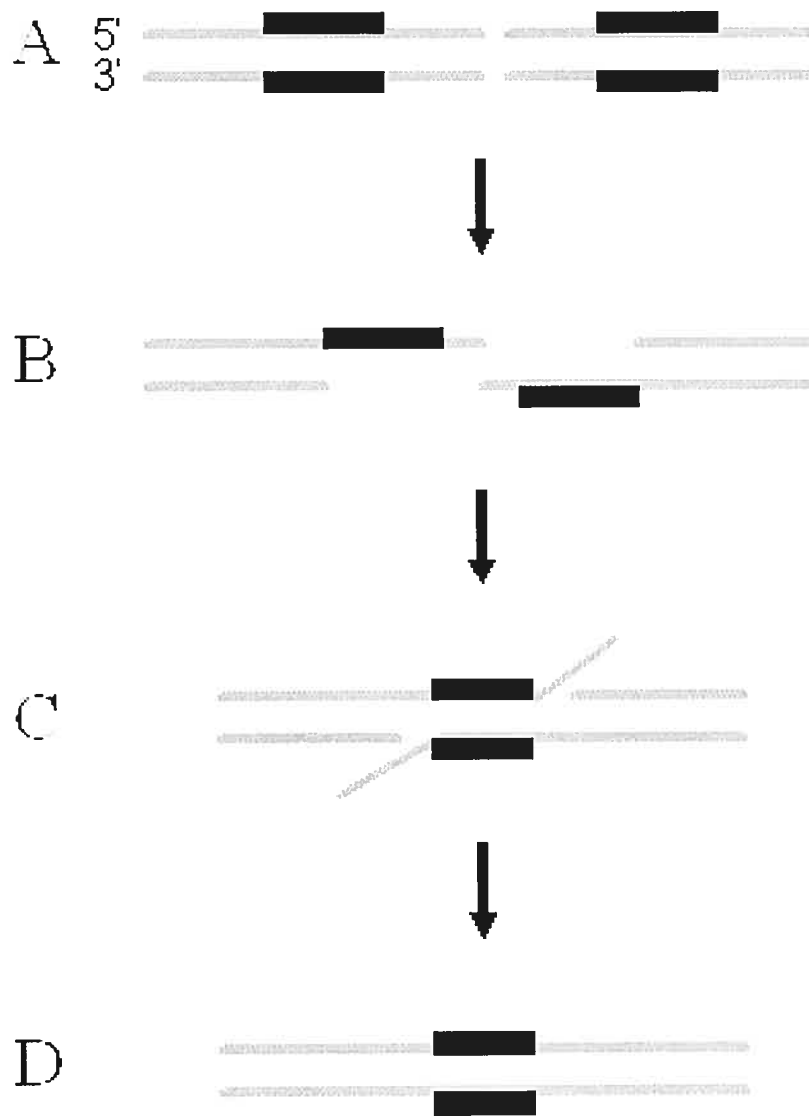


Figure 2. Modèle de l'appariement simple-brin (SSA)

Le SSA est initié lorsqu'une CDB se produit entre deux séquences homologues en répétition directe (A). Une région simple-brin est formée par digestion nucléolytique et s'étend jusqu'aux séquences répétées, permettant alors l'appariement entre les séquences homologues (B). Suite à l'appariement, les queues simple-brin formées sont stabilisées et clivées (C), ce qui permettra à une ligase de souder les deux brins d'ADN et refermer ainsi la cassure (D).

1.8 La recombinaison homologue conservative

Le troisième type de réparation des cassures double-brins est la recombinaison homologue (HR). Ce mécanisme dépend d'un second duplex d'ADN homologue à la séquence contenant la CDB. La RH a principalement été étudiée chez les bactéries et les levures, mais il apparaît maintenant clair que cette voie de réparation est fortement conservée chez tous les organismes (Belmaaza and Chartrand, 1994; Cromie et al., 2001; Haber, 2000; Sonoda et al., 2001; van Gent et al., 2001a). Chez ces organismes, la recombinaison homologue peut se produire entre deux types de substrats. La recombinaison allélique est l'échange de matériel génétique entre deux chromatides sœurs ou entre des chromosomes homologues. Ce type de recombinaison joue un rôle majeur dans le maintien de la stabilité du génome en permettant la réparation des CDBs durant la mitose (Morrison et al., 2003). La recombinaison ectopique se produit entre séquences homologues non alléliques (entre séquences répétitives par exemple). Ce type de RH doit être fortement régulé étant donné les risques accrus d'aberrations chromosomiques (Cooper et al., 1998; Liefshitz et al., 1995; Yoshida et al., 2003).

L'analyse de mutants sensibles aux RI chez la levure a permis d'identifier plusieurs gènes jouant des rôles importants dans la RH : *RAD50*, *RAD51*, *RAD52*, *RAD54*, *RAD55*, *RAD57*, *RAD59*, *MRE11* et *XRS2* (*NBS1* chez l'homme). Chez les mammifères, on retrouve des homologues de tous ces facteurs (Wood et al., 2001). Notons que la recombinaison homologue peut être initiée autant par les cassures double-brins (figure 3) que simple-brin (figure 4). Tout comme pour le SSA et le NHEJ, la première étape dans la recombinaison homologue implique la digestion nucléolytique 5'-3' Rad50-Mre11-Nbs1 dépendante de la CDB. Par la suite, la queue 3' simple-brin est reconnue par la recombinase Rad51 qui la lie. Ce processus est largement

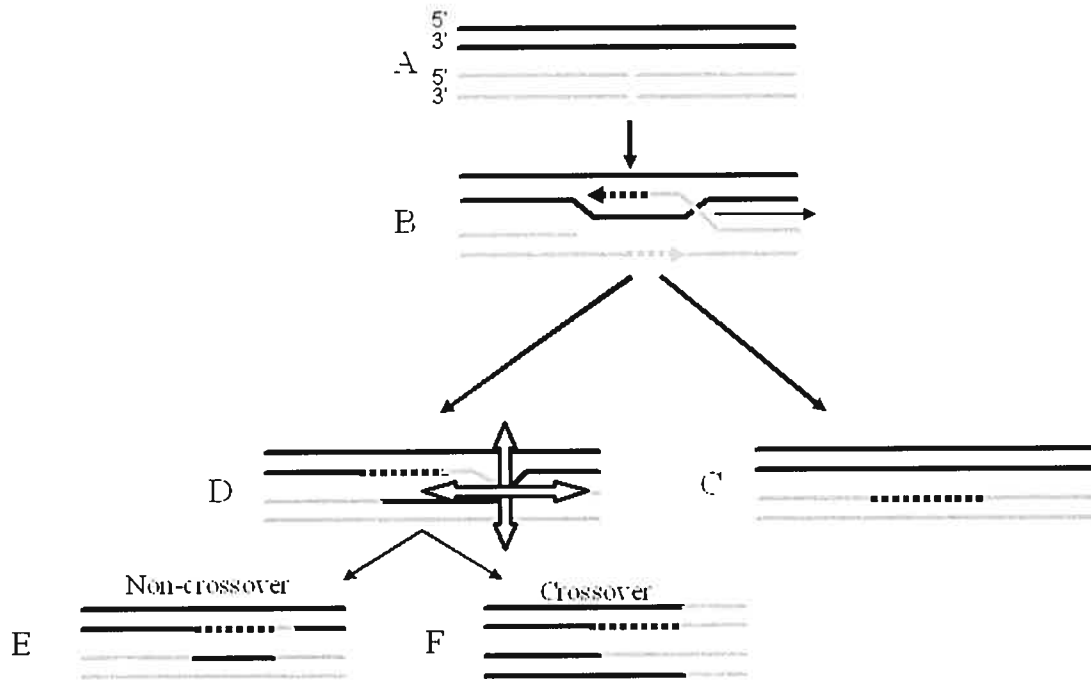


Figure 3. Recombinaison homologue chez les mammifères.

Le principal modèle de recombinaison homologue, appelé « One-sided invasion », est initié par une cassure double-brins (A). La dégradation des extrémités 5' par des exonucléases permet d'exposer les extrémités 3'. Par la suite, une des extrémités 3' va envahir le duplex homologue complémentaire et provoquer la formation d'un « D-loop » (B). La synthèse d'ADN est alors amorcée à partir des deux extrémités 3' (B). Ensuite, l'intermédiaire de recombinaison peut-être résolu de trois façons. En premier lieu, le brin 3' ayant participé à l'invasion peut-être libéré avec l'aide d'hélicases et aller se liguer à l'extrémité 5' libre, formant ainsi une conversion génique ou non crossover (C). La résolution peut aussi se faire par la coupure du « D-loop » qui va aller s'apparier à l'extrémité de la cassure n'ayant pas participé à l'invasion. Enfin, il y a ligation des extrémités générées et la formation d'une jonction de Holliday (D). Cette jonction de Holliday sera résolue en conversion génique (E) ou en crossover (F).

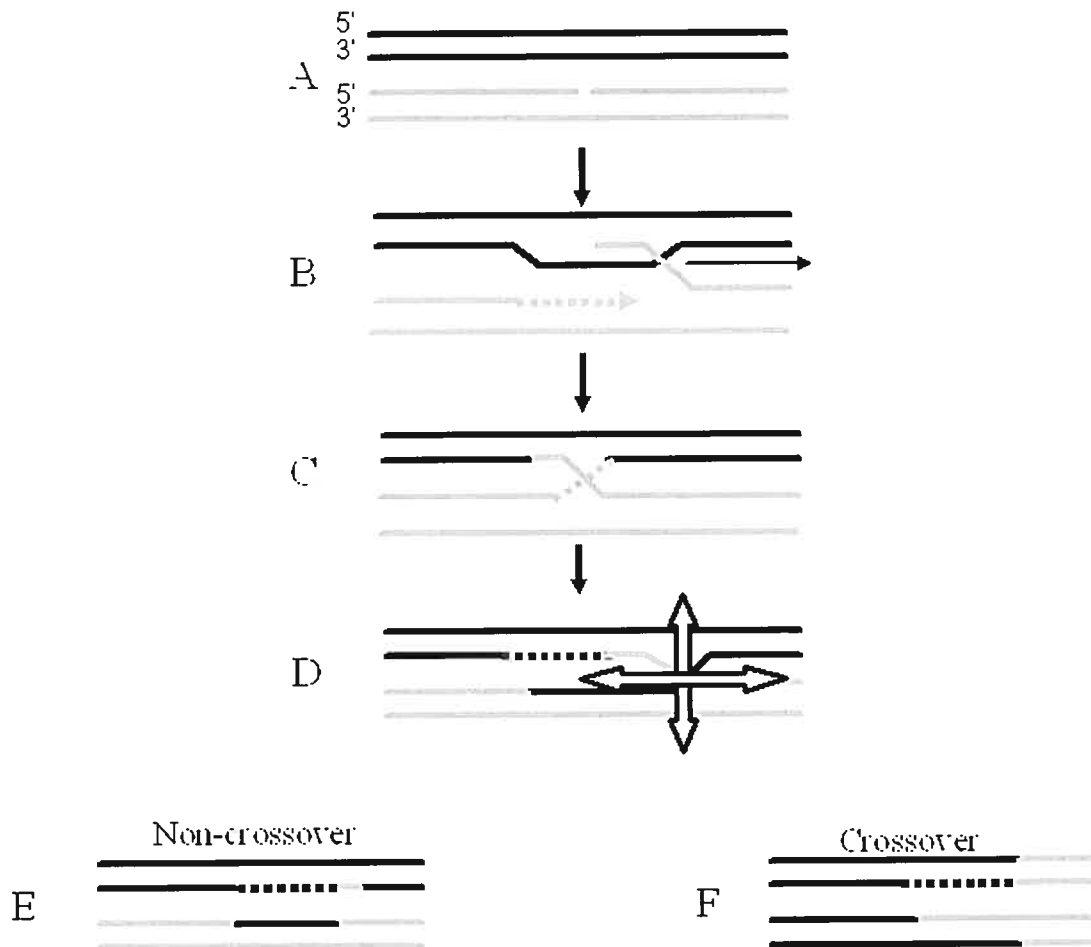


Figure 4. Modèle de Meselson et Radding.

Ce modèle de RH présume que l'initiation de la RH se fait par une cassure simple-brin (A). L'extrémité 3' générée par la cassure amorce la synthèse d'ADN, alors que l'extrémité 5' envahit le duplexe homologue et provoque la formation d'une boucle « D-loop » (B). La dégradation du « D-loop » par des nucléases suivi de la ligation des extrémités entraîne la formation de la jonction de Holliday (C). La résolution de la jonction de Holliday (D) peut former soit des crossovers (E) ou des conversion géniques (F).

dépendant des protéines Rad52, Rad54, et la « replication protein A » ou RPA. Le filament nucléoprotéique contenant Rad51 part alors à la recherche d'un partenaire homologue, et lorsque celui-ci a été trouvé, Rad51 catalyse le processus d'invasion du brin 3' sur le partenaire homologue intact, déplacent ainsi un brin sous forme de « D-loop », formant ainsi un hétéroduplexe d'ADN. Le brin 3' subit alors une étape de polymérisation où de l'information génétique est copiée du partenaire intact par une ADN polymérase. Par la suite, des hélicases provoquent le relâchement du brin 3' nouvellement synthétisé, permettant à celui-ci de s'apparier à l'extrémité de la cassure n'ayant pas participé à l'invasion (figure 3c) (Belmaaza and Chartrand, 1994). Enfin, le brin 3' est religaturé par la DNA ligase I pour refermer la CDB. Ce type d'évènement s'appelle conversion génique ou non crossover. Il se peut aussi qu'une partie du D-loop soit clivé et qu'elle se ligue à l'extrémité 3' n'ayant pas participé à l'invasion, entraînant ainsi la formation d'une jonction de Holliday (figure 3d). Cette jonction peut se résoudre de deux manières : en conversion génique (figure 3e) ou en crossover (figure 3f). Lorsque la recombinaison se produit entre séquences répétitives, les crossovers engendreraient des délétions et des inversions, et lorsque la RH est interchromosomique, les crossovers entraîneraient des translocations. Chez les mammifères, la grande majorité des évènements se produisent par conversion génique, ce qui permet la préservation de la stabilité génétique (Johnson and Jasin, 2000).

Deux protéines ont été proposées comme candidate dans le déroulement de l'hétéroduplexe et dans la résolution des jonctions de Holliday, les hélicases de type ReqQ : BLM (Bloom's syndrome helicase) et WRN (Werner Syndrome protein) (Karow et al., 2000; Saintigny et al., 2002; van Brabant et al., 2000; Wu and Hickson, 2003; Yang et al., 2002). BLM interagit aussi avec Rad51 et semble avoir des activités antirecombinaison (Onclercq-Delic et al., 2003; Wu et al., 2001; Yamagata et al., 1998), alors que WRN interagit avec Rad52 et inhibe aussi la recombinaison (Baynton et al., 2003; Yamagata et al., 1998).

D'autres protéines sont aussi impliquées dans la RH, parmi celles-ci, on retrouve les protéines de susceptibilité au cancer du sein, BRCA1 et BRCA2 (Scully and Livingston, 2000; Venkitaraman, 2001; Welch et al., 2000). En plus d'être accompagnée d'une diminution importante de l'efficacité de la réparation de dommages à l'ADN, une perte de fonction de BRCA1 ou de BRCA2 entraîne une augmentation des mécanismes de réparation par homologies provoquant des erreurs, lorsque la réparation se fait entre séquences répétitives (Moynahan et al., 1999; Moynahan et al., 2001; Snouwaert et al., 1999; Tutt et al., 2001; Xia et al., 2001). Un mécanisme par lequel BRCA2 peut affecter la recombinaison homologue, est par l'interaction de son motif BRC et la recombinase Rad51. En effet, il a été démontré que BRCA2 affecte directement la localisation nucléaire de Rad51, sa capacité d'interagir avec l'ADN, et sa capacité de former des foyers nucléaires en réponse à des dommages à l'ADN (Chen et al., 1999; Davies et al., 2001; Scully and Livingston, 2000; Yuan et al., 1999). Dans le cas de BRCA1, sa présence dans des complexes de remodelage de la chromatine et dans la transcription, nous permet de croire qu'il peut affecter la RH en modifiant la structure de la chromatine aux sites de CDBs. BRCA1 peut aussi induire l'expression de protéines impliquées dans la réponse aux dommages à l'ADN (Bochar et al., 2000; Scully et al., 1997).

La protéine de réparation des « mismatch » MSH2 a aussi été impliquée dans le contrôle de la RH. Il a été proposé qu'elle agissait dans le contrôle de la fidélité de la RH en inhibant l'étape d'invasion entre des séquences divergentes (Modrich and Lahue, 1996). MSH2 est aussi capable de reconnaître les intermédiaires de recombinaison tels que les jonctions de Holliday (Alani et al., 1997; Marsischky et al., 1999), et les « mismatch » pouvant être présents dans les hétéroduplexes (Dudenhoffer et al., 1998), ainsi que la terminaison de la réparation des CDBs par conversion génique (Villemure et al., 2003)

1.9 P53 et recombinaison homologue

Les études sur les activités biochimiques de p53 ont éveillé les soupçons concernant une potentielle implication de p53 dans la recombinaison. P53, en tant que protéine liant l'ADN, est capable de lier *in vitro* et de manière séquence non-spécifique, les intermédiaires de recombinaison tels que les « mismatch », les hétéroduplexes contenant des « mismatch », et les jonctions de Holliday (Dudenhoffer et al., 1998; Janz et al., 2002a; Lee et al., 1997; Mummenbrauer et al., 1996; Prabhu et al., 2002; Skalski et al., 2000). Aussi, il a été démontré que p53 possède *in vitro* une activité exonucléase 5'-3', activité pouvant être stimulé en présence de « mismatch » (Mummenbrauer et al., 1996; Skalski et al., 2000). Cette activité aurait présumément un rôle dans la reconnaissance et la dégradation des hétéroduplexes mésappariés.

1.9.1 P53, interactions protéiques et recombinaison

P53 interagit avec plusieurs protéines impliquées dans la recombinaison homologue. *In vitro*, p53 a la capacité de lier et d'inhiber l'activité de la recombinase Rad51 (Buchhop et al., 1997; Linke et al., 2003; Sturzbecher et al., 1996a). L'interaction avec Rad51 augmente l'activité exonucléase de p53, qui interagit avec le filament nucléoprotéiques Rad51/ADN (Susse et al., 2000a). Ces données ont menées à l'hypothèse que p53 participe au contrôle de la fidélité de la RH. Deux autres protéines impliquées dans la réparation des CDBs par la voie conservative de RH, BRCA1 et BRCA2, interagissent aussi avec p53 (Marmorstein et al., 1998; Zhang et al., 1998). Cependant, la signification de cette interaction demeure encore inconnue.

P53 est aussi potentiellement impliquée dans la résolution des intermédiaires de recombinaison tels que les jonctions de Holliday (figure 3 et 4). En effet, p53 module, *in vitro*, les activités de WRN et de BLM dans le traitement des jonctions de Holliday. D'ailleurs, BLM est requise pour le

transport de p53 aux sites d'arrêt de la fourche de réplication ce qui entraîne une modulation de la recombinaison homologe (Sengupta et al., 2003a). Une autre interaction impliquant p53 dans la résolution des jonctions de Holliday, est l'interaction entre MSH2 et p53. La protéine MSH2 rehausse la capacité de liaison de p53 aux « mismatch » et aux jonctions de Holliday, et s'associe avec p53 dans les complexes de réparation par RH (Subramanian and Griffith, 2002; Zink et al., 2002).

1.9.2 L'inhibition de la recombinaison homologe ectopique par p53

En plus d'interagir avec des protéines impliquées dans la recombinaison et d'avoir elle-même des activités biochimiques pouvant influencer la RH, la protéine p53 a aussi été impliquée dans l'inhibition de la recombinaison homologe spontanée ectopique ainsi que dans la recombinaison impliquant la reconstitution d'un virus SV40 fonctionnel à partir de deux génomes mutants du virus SV40 (Wiesmuller et al., 1996). Lorsque la fonction de la protéine p53 est perturbée (inactivation génétique, dominant négatif, ou oncogène viral), il y a une augmentation de 5 à 200 fois de la RH (Mekeel et al., 1997a). La stratégie d'inactivation utilisée par Mekeel la plus efficace dans la stimulation de la RH est l'utilisation de l'oncogène viral HPV16-E6 qui séquestre p53 et stimule sa dégradation par le protéasome (Scheffner et al., 1990; Song et al., 1998). L'augmentation de la RH en absence de la forme sauvage de p53 a été démontrée entre des répétitions directes et inversées (Akyuz et al., 2002a; Bertrand et al., 1997a; Bishop et al., 2003; Boehden et al., 2004; Janz and Wiesmuller, 2002; Linke et al., 2003; Lu et al., 2003a; Saintigny and Lopez, 2002; Saintigny et al., 1999a; Slebos and Taylor, 2001; Willers et al., 2000a). Il se pourrait néanmoins que cette inhibition ne soit pas directe, mais plutôt due à la perte de l'activité de transactivation ou à la perte de l'arrêt du cycle cellulaire. Cependant, des protéines p53 mutantes, déficientes dans leurs activités de transactivation et d'arrêt du cycle cellulaire,

gardent leurs capacités d'inhiber la RH, permettant ainsi de croire à une nouvelle fonction de p53 (Akyuz et al., 2002a; Bishop et al., 2003; Boehden et al., 2003a; Dudenhoffer et al., 1999a; Lu et al., 2003a; Willers et al., 2000c).

1.9.3 P53, recombinaison allélique et chromatine

Cependant, il semble que l'inhibition de la RH par p53 se limite, à la recombinaison ectopique. En effet, p53 n'a pas d'effet sur la recombinaison allélique. La RH entre chromatides sœurs se produit à des fréquences similaires en absence ou en présence d'une protéine p53 fonctionnelle (Bunz et al., 2002a). Aussi, il n'y a pas de différence significative dans la recombinaison allélique au niveau de la méiose entre des souris p53 +/+ et p53 -/-, et ce, indépendamment de la taille et la position des marqueurs microsatellites utilisés (Gersten and Kemp, 1997a). De plus, à l'exception de la recombinaison extrachromosomique entre deux génomes de SV40, p53 n'est pas impliquée dans la régulation de la recombinaison extrachromosomique tel que démontré par l'utilisation de plasmides pouvant se répliquer de manière épisomale (Willers et al., 2001a), et par l'utilisation du ciblage de gènes (gene targeting) (Dominguez-Bendala et al., 2003a). Ces données indiquent que p53 n'est pas impliqué dans le processus d'invasion Rad51 dépendant, et que la régulation de la RH par p53 se limite à une chromatine organisée (Willers et al., 2001a). Or il a été démontré que la structure de la chromatine et que la transcription affecte la recombinaison (Aguilera et al., 2000).

Des modifications de la chromatine peuvent être induites par l'interaction entre deux promoteurs adjacents ou entre des répétitions en tandem (Dorer and Henikoff, 1997; Emerman and Temin, 1984; Emerman and Temin, 1986a; Emerman and Temin, 1986b; Eszterhas et al., 2002a; Hasegawa and Nakatsuji, 2002a; Villemure et al., 2001a; Wu et al., 1988). Il a été démontré que deux promoteurs adjacents en cis peuvent se réprimer mutuellement lors d'un phénomène appelé interférence transcriptionnelle ou

suppression de promoteur (Villemure et al., 2001a). Ce mécanisme d'interférence se produit au niveau de la transcription, est épigénétique, et est associé à une condensation de la chromatine et une déacétylation des histones (Villemure et al., 2001a). Cette interférence, peut aussi être due à un effet de position et à l'interaction entre les promoteurs du plasmide et les promoteurs avoisinant le site d'intégration (Eszterhas et al., 2002a). À la lumière de ces informations, il est intéressant de constater qu'une quantité grandissante d'information pointe vers un rôle de p53 dans le maintien de la structure de la chromatine. En effet, il semble que p53 soit associée avec la méthylation (Iwamoto et al., 1999), la modification des histones (Allison and Milner, 2003; Taylor et al., 1995a), la condensation de la chromatine (Ogden et al., 2001a; Smith et al., 1998a), et la répression transcriptionnelle (Jackson et al., 1993; Murphy et al., 1999a; Ogden et al., 2001a; Subler et al., 1992a). Aussi, p53 s'associe à la matrice nucléaire, ce qui pourrait influencer l'organisation de la chromatine et les mécanismes mentionnés ci-haut (Jiang et al., 2001; Okorokov et al., 2002a).

Finalement, p53 peut réprimer plusieurs promoteurs cellulaires et viraux (Cook et al., 1999a; Ho and Benchimol, 2003a; Jackson et al., 1993; Johnson et al., 2001; Subler et al., 1992a). La répression transcriptionnelle de ces promoteurs peut avoir une incidence sur les taux de recombinaison spontanée puisqu'il a été démontré que les niveaux de recombinaison sont directement proportionnels au niveau de transcription du gène marqueurs (Kotani and Kmiec, 1994; Kotani et al., 1994; Nickoloff, 1992; Nickoloff and Reynolds, 1990; Thomas and Rothstein, 1989).

1.10 Objectifs

Les hypothèses courantes veulent que p53 assure un contrôle sur la recombinaison homologue de deux façons. En premier lieu, p53, en interagissant avec Rad51 et avec son activité de reconnaissance des mésappariements et exonucléase, inhibe l'étape d'invasion catalysée par

Rad51. Deuxièmement, via ses interactions avec BLM, WRN, et MSH2, p53 pourrait préserver la stabilité du génome en inhibant la formation des crossovers.

Cependant, en raison de ses activités sur la répression transcriptionnelle et la structure de la chromatine, nous avons voulu évaluer les effets de p53 sur la recombinaison chromosomique en absence d'interférence transcriptionnelle entre le gène rapporteur et le gène marqueur adjacent. Une répression du gène rapporteur pourrait aussi expliquer la suppression de la recombinaison homologue.

Notre laboratoire a développé un essai de recombinaison où le gène rapporteur et le gène marqueur (en l'occurrence les gènes de puromycine et de l'hygromycine) sont arrangés de manière convergente, pour éviter ou du moins diminuer l'interférence entre les promoteurs. De plus, puisque p53 est capable de réprimer des promoteurs viraux, nous avons placé le gène rapporteur de la RH, le gène puromycine (*puro*), sous contrôle du promoteur cellulaire du gène de la phosphoglycérate kinase. Cet essai repose sur la recombinaison entre deux séquences inactives du gène *puro*, une sans promoteur et l'autre, pleine longueur, contenant une délétion remplacée par une insertion du site de restriction de la nucléase I-SCEI. Les séquences du gène *puro* sont organisées soit en répétitions directes ou inversées, ce qui nous permet de distinguer entre la recombinaison Rad51-indépendante (SSA) et la recombinaison Rad51-dépendante, respectivement. Nous avons choisi d'inactiver p53 avec le HPV16-E6 puisque cette approche avait déjà été utilisée par Mekeel et al., et qu'elle avait donné une très forte augmentation de la RH. Nous avons donc voulu reproduire les conditions expérimentales utilisées par Meekel et al.. Il faut aussi noter que la protéine HPV16-E6 ne semble pas interagir avec d'autres protéines impliquées dans la réparation de l'ADN, ce qui aurait pu fausser nos résultats. Cette approche pourrait donc nous permettre d'isoler le rôle que la structure de l'essai de RH

tout en s'assurant qu'une possible divergence de résultats n'est pas due à la stratégie d'inactivation de p53. La fonction de p53 a été abrogée par l'introduction du gène HPV-E6, qui stimule la dégradation protéasome dépendante de p53 (Scheffner et al., 1990; Song et al., 1998).

Chapitre 2

Article :

A Chromosomal Assay System in Which p53 does not Inhibit Homologous Recombination.

Jean-François Lemelin, Christine Abaji, Isabelle Cousineau, and Abdellah Belmaaza.

2. The p53 protein does not regulate homologous recombination in transcriptionally active chromatin¹

Jean-François Lemelin, Christine Abaji, Isabelle Cousineau, and Abdellah Belmaaza²

Jean-François Lemelin
Molecular Biology Program, Université de Montréal, Centre de recherche, CHUM-Hôpital Notre-Dame, Institut du cancer de Montréal, Montréal, Québec, Canada

-Christine Abaji
Department of Biochemistry, Université de Montréal, Centre de recherche, Centre hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM)-Hôpital Notre-Dame, Institut du cancer de Montréal, Montréal, Québec, Canada

-Isabelle Cousineau
Molecular Biology Program, Université de Montréal, Centre de recherche, CHUM-Hôpital Notre-Dame, Institut du cancer de Montréal, Montréal, Québec, Canada

Abdellah Belmaaza
Department of Medicine, Université de Montréal, Centre de recherche, CHUM-Hôpital Notre-Dame, Institut du Cancer de Montréal, Montréal, Québec, Canada

Running title
Lack of p53-directed suppression of recombination

Key words
Transcriptional interference / Promoter suppression / Chromatin / p53 / Position effect

Footnotes

This Research was funded in part by the National Cancer Institute of Canada for the Terry Fox Run and the Canadian Breast Cancer Research Initiative (A.B.). A.B. is a scholar of the Fonds de la recherche en santé du Québec (FRSQ). J.-F.L., C.A., and I.C. were recipients of fellowships from Canderel and the Faculté des études supérieures of the Université de Montréal.

²To whom requests for reprints should be addressed at CHUM-Hôpital Notre-Dame, Institut du cancer de Montréal, 1560, rue Sherbrooke est, Pavillon J.A.

de Sève, Y-5634, Montréal, Québec, Canada H2L 4M1. Phone: (514) 890-8000 ext. 28946; Fax: (514) 412-7591; [REDACTED]
[REDACTED]

The abbreviations used are: ATM, Ataxia telangiectasia mutated; CMV; cytomegalovirus; DSB, DNA double-strand break; HDAC, histone deacetylase; HR, homologous recombination; HSV-*tk*, herpes simplex virus thymidine kinase gene; Hyg, hygromycin drug; *Hyg*, hygromycin gene; Hyg^R, hygromycin-resistant; LINEs, Long, interspersed nuclear elements; LTR, long terminal repeat; *Neo*, neomycin gene; PCR, polymerase chain reaction; MARs, matrix attachment regions; *PGK*, phosphoglycerate kinase gene; Puro, puromycin drug; *Puro*, puromycin acetyltransferase gene; Puro^R, puromycin-resistant; Puro^S, puromycin-sensitive; SSA; single-strand annealing; SV40; simian virus 40; TSA, trichostatin A; wt, wild-type

2.1 Abstract

The tumour suppressor gene *p53* is the most frequently mutated gene in human cancers. The loss of *p53* was shown to increase the frequency of chromosomal homologous recombination (HR); raising the possibility that *p53* could prevent genome rearrangements by suppressing HR between repetitive sequences. The exact molecular mechanisms by which *p53* suppresses HR remain unknown, however, *p53* has the ability to alter chromatin structure and repress gene expression. Here, by using an assay system in which a HR reporter gene can escape transcriptional interference and promoter suppression, we report that *p53* does not suppress intra-chromosomal HR. Intra-chromosomal HR rates remained normal following disruption of human *p53* by the viral oncoprotein HPV16-E6. These results argue against a direct role for *p53* in the regulation of chromosomal HR mechanisms, and imply that HR assay systems are the important determinants of outcome.

2.2 Introduction

Allelic homologous recombination (HR), the exchange of DNA segments between pairs of homologous chromosomes or identical sister chromatids, is important for chromosome disjunction and repair of DNA double-strand breaks (DSBs) or other DNA damage. This ensures the formation of healthy gametes, the preservation of genetic diversity as well as the maintenance of genome integrity and the prevention of genetic diseases (Carrington and Cullen, 2004; Jeffreys and May, 2004; Khanna and Jackson, 2001b; Nicolaidis and Petersen, 1998; Thompson and Schild, 2002; van Gent et al., 2001b; Venkitaraman, 2004). On the other hand, non-allelic (ectopic) HR events in multigene and dispersed repeat sequence families can have drastic consequences for genome stability. HR can be either reciprocal (crossover) or non-reciprocal (gene conversion), and requires the DNA strand exchange protein RAD51, the equivalent of bacterial RecA (West, 2003).

Crossover, which involves the physical exchange of information between repeats, can give rise to various types of genome rearrangements, including deletions and duplications between direct repeats, inversions between inverted repeats, and chromosomal translocations (Bi et al., 2003; Labuda, 1995; Tayebi et al., 2003). Deletions between direct repeats can also result from RAD51-independent, non-conservative HR pathways, such as sister chromatid replication slippage or single-strand annealing (SSA) (Prado et al., 2003). Gene conversion, which involves the unidirectional transfer of information from one repeat to another, can lead to the correction

of deleterious mutations (Gross et al., 2002; Jonkman et al., 1997), but also their transmission (Boocock et al., 2003; Cavenee et al., 1983; Ezquieta et al., 2002; Hauptschein et al., 2000; Mazzei et al., 2004). Given the genome-destabilizing effects of ectopic HR, it is important that such events occur at low rates relative to allelic HR.

Unlike allelic HR, ectopic HR in mammals can be difficult to measure, as it is a relatively uncommon event, with no simple method to detect rearrangements (Bunz et al., 2002b; Carrington and Cullen, 2004; Gersten and Kemp, 1997b; Jeffreys and May, 2004). However, insights into its molecular mechanisms can be gained with assay systems designed to measure HR events between defined extents of homologous DNA sequences. Briefly, the assay system currently used to study intra-chromosomal HR employs plasmids that contain different mutants of a selectable HR reporter gene and a dominant marker gene linked in *cis*. With this type of procedure, it can be determined that p53 suppresses spontaneous intra-chromosomal HR as well as homology-directed repair of chromosomal DSBs; HR rates or frequencies were much greater in cells with mutant p53 than in cells with wild-type (wt) p53 (Akyuz et al., 2002b; Bertrand et al., 1997b; Gebow et al., 2000; Lu et al., 2003b; Mekeel et al., 1997b; Willers et al., 2000b). The increase was noted with a variety of mammalian cells in which p53 was inactivated either genetically, or by interactions with p53-dominant mutants or viral tumour antigens (Akyuz et al., 2002b; Bertrand et al., 1997b; Gebow et al., 2000; Lu et al., 2003b; Mekeel et al., 1997b; Willers et al., 2000b). Such a hyper-recombination phenotype has also been

reported in cells with mutations in *Ataxia telangiectasia mutated* (ATM) (Bishop et al., 2000). As with DSBs, in response to DNA damage, the protein kinase ATM activates p53, which, in turn, transactivates downstream target genes to allow growth arrest at specific points in the cell cycle (Levine, 1997b). However, HR suppression by wt p53 was dissociated from its function at the G1/S checkpoint and even from its transactivation function, leading to the idea that p53 may play a direct role in the regulation of HR mechanisms (Boehden et al., 2003b; Dudenhoffer et al., 1999b; Saintigny et al., 1999b; Willers et al., 2000d). Further support for the direct involvement of p53 in HR suppression came from the observation that p53 binds directly to human RAD51 and RecA proteins, and the wt but not a mutant form of p53 inhibited their function *in vitro* (Janz et al., 2002b; Sturzbecher et al., 1996b; Susse et al., 2000b). These studies have provided evidence for the attractive hypothesis that p53 functions to minimize ectopic HR in somatic cells and thereby prevent genomic rearrangements. Loss of p53 function in incipient tumour cells might result in increased recombination rates, leading to oncogene activation or tumour-suppressor gene inactivation.

In contrast, there was no significant difference in meiotic allelic HR frequencies between mice with or without functional p53, and this lack of effect was observed regardless of chromosomal size or locations of microsatellite sequences employed as HR markers (Gersten and Kemp, 1997b). Similarly, genetic inactivation of p53 in human somatic cells did not lead to an increased rate of sister chromatid exchange (Bunz et al., 2002b; Sengupta et al., 2003b). This apparent ability of p53 to suppress ectopic HR

but not allelic HR would seem to be consistent with its role in the maintenance of genome integrity. The protein p53 is regarded as a tumour suppressor on the basis of its capacity to induce cell cycle arrest as well as apoptosis in response to a number of cellular stresses, mainly DNA damage (Levine, 1997b). Cell cycle arrest is thought to allow time for accurate repair of damaged DNA, and one major role of allelic HR that has emerged in recent years is to accurately repair DSBs and thereby facilitate the progression of replication forks stalled at such damage (Helleday, 2003; Henry-Mowatt et al., 2003; Lomonosov et al., 2003). The potential outcomes of inaccurate or inefficient DSB repair include genome instability, tumourigenesis, and cell death (Khanna and Jackson, 2001b; Thompson and Schild, 2002; van Gent et al., 2001b).

The mechanisms by which p53 discriminates between ectopic and allelic HR remain unknown. However, the observation that neither RAD51-dependent nor RAD51-independent extra-chromosomal HR was affected by the p53 status of the cell suggested that p53 does not interfere with DNA strand exchange reactions (Bunz et al., 2002b; Dominguez-Bendala et al., 2003b; Villemure and Belmaaza, 1999; Willers et al., 2001b), and that regulation of intra-chromosomal HR by p53 is restricted to the highly-ordered chromatin structure (Willers et al., 2001b).

The ability of p53 to alter chromatin structure and repress transcription (Ho and Benchimol, 2003b), together with the well established link between chromatin structure alteration, transcription repression and decreased intra-chromosomal HR (Prado et al., 2003), prompted us to investigate whether

p53 inhibits HR in the absence of mechanisms that repress reporter genes. Studies with a variety of organisms show that 2 transcriptionally active genes linked in *cis* can repress one another by a phenomenon termed “transcriptional interference” or “promoter suppression” (Eszterhas et al., 2002b; Villemure et al., 2001b). Interference/suppression, which can be influenced by chromosomal integration position, occurs at the transcriptional level, is *cis*-acting, epigenetic, heritable, and can be associated with alteration of chromatin structure (Eszterhas et al., 2002b; Villemure et al., 2001b). We designed a chromosomal assay system in which a HR reporter gene can escape marker interference and investigated HR at chromosomal positions that do not affect expression of the reporter. In addition, as p53 has the ability to repress transcription from a variety of viral promoters (Subler et al., 1992b), we placed the reporter gene under the control of a strong cellular housekeeping gene promoter. We disrupted p53 by expressing the human papilloma virus HPV16-E6 oncoprotein in 2 distinct human cell lines containing direct or inverted repeats. Such repeats allow the monitoring of RAD51-dependent and RAD51-independent HR pathways (Prado et al., 2003).

In this assay system, disruption of p53 did not result in increased rates of spontaneous intra-chromosomal HR. These data argue against a direct role for p53 in the regulation of chromosomal HR mechanisms, and imply that assay systems are important determinants of outcome.

2.3 Results

2.3.1 Experimental design of the assay system

Chromosomal HR is usually measured in cell clones established by integrating, into the genome of a test cell, a plasmid containing 3 transcriptionally active units: 2 mutated, full length copies of a HR reporter gene, and a dominant marker gene linked in *cis*. The marker gene facilitates the introduction and stable integration of mutant gene duplication in host cells. Maintaining cell clones under selection for expression of the marker gene eliminates cells that repress the reporter gene and/or the marker gene. However, it has been consistently demonstrated with various organisms that in cell clones, which had initially been selected for the expression of a marker gene, the adjacent reporter gene was usually repressed. This phenomenon is known as transcriptional interference or promoter suppression, and is usually documented with transcription units arranged in a head-to-tail tandem fashion (Villemure et al., 2001b). Inserting transcription terminators or chromatin boundaries between 2 adjacent units, or placing the units in divergent or convergent orientations can decrease suppression (Hasegawa and Nakatsuji, 2002b; Villemure et al., 2001b). However, a recent study indicated that interference/suppression is influenced by chromosomal integration position and occurs in any relative arrangement of the units, with convergent orientations showing the strongest effect when the units were placed under control of the same viral promoter (Eszterhas et al., 2002b).

Placing transcription units under the control of distinct promoters can decrease suppression between convergent units (Villemure et al., unpublished results). As p53 has the ability to repress a variety of viral promoters (Subler et al., 1992b), we placed the HR reporter puromycin (*Puro*) gene under the control of the cellular housekeeping phosphoglycerate kinase (*PGK*) gene promoter in convergent orientation to the marker hygromycin (*Hyg*) gene under control of the herpes simplex virus thymidine kinase (*HSV-tk*) gene promoter. Nevertheless, we determined that repression of the reporter was not occurring with this combination of promoters. The construct pHyg/*Puro* and its derivatives pCA_{dir} and pCA_{inv}, illustrated in Figure 1, were stably integrated as a single, intact copy in the genome of the human cancer cell lines MCF-7 and HCT-116, and independent hygromycin-resistant (*Hyg*^R) colonies were picked, amplified, and subjected to analysis for *Puro* expression (Villemure et al., 2001b). With pHyg/*Puro*, more than 70% (86/117) of cell clones, that had initially been selected as *Hyg*^R, were also puromycin-resistant (*Puro*^R) when subsequently placed in *Puro* containing medium. This level of interference/suppression is much lower than what has been reported with transcription units arranged in a head-to-tail tandem fashion; as in almost all cell clones (>90%) that had been initially selected for the expression of one gene, the other gene linked in *cis* was repressed (Villemure et al., 2001b). Similarly, Northern blot analysis of pCA_{dir} and pCA_{inv} cell clones revealed that *Puro* was effectively expressed (data not shown), indicating that interference/suppression or position effects (Eszterhas

et al., 2002b; Villemure et al., 2001b) were not occurring at the integration sites analysed.

2.3.2 Wt p53 does not suppress intra-chromosomal HR in MCF-7 or HCT-116 cells.

To test whether p53 would impair HR with this combination of promoters, we compared HR rates between p53-positive pCAdir and pCAinv cell clones and their derivative p53-negative clones. The p53 protein was artificially disrupted in p53-positive MCF-7 or HCT-116 cell clones by expressing HPV16-E6 oncoprotein (Fig. 2)(Gupta et al., 1997; Mekeel et al., 1997b). The HPV16-E6 has been consistently used to disrupt p53 in many cell lines including MCF-7 cells where it appeared to enhance spontaneous HR by more than 200-fold (Gupta et al., 1997; Mekeel et al., 1997b). HR rates in MCF-7 and HCT-116 cell clones were measured by fluctuation analysis (Capizzi and Jameson, 1973). We observed no statistically significant difference in HR rates between p53-positive and p53-negative cell clones (Table 1). The lack of p53 effect on HR was independent of the orientation of *Puro* repeats or integration sites (Table 1).

2.3.3 Analyses of Puro^R colonies

To establish whether Puro^R colonies represent bona fide recombinants, genomic DNA from individually expanded Puro^R cell clones was analysed by polymerase chain reaction (PCR). HR between direct *Puro* repeats would result in 2 types of products: RAD51-dependent gene conversion, keeping intact the structure of the construct, and deletion

removing one repeat and the intervening *Hyg* sequences (Fig. 3)(Prado et al., 2003). Deletion events can result from RAD51-dependent crossover or RAD51-independent mechanisms, such as replication slippage or SSA (Prado et al., 2003). In contrast, HR between inverted *Puro* repeats would only arise via RAD51-dependent gene conversion or crossover. Crossover would invert the intervening *Hyg* sequences. Gene conversion and deletion events can be distinguished by PCR with a distinct set of primer pairs (Fig. 3). PCR was performed with each set of primer pairs, and amplification products were digested with I-SceI and Eag1 to identify HR events (Eag1⁺/I-SceI)(Fig. 3). The major pathway leading to Puro^R was gene conversion. This was found in 95% of MCF-7 Puro^R clones (91/96). The remaining Puro^R colonies had the characteristic of deletion events (Fig. 3). These results indicate that in mammalian cells, HR occurs almost exclusively by gene conversion, supporting previous studies (Villemure, 2003) and references therein).

2.4 Discussion

The data reported here provide no evidence that disruption of p53 causes increased rates of spontaneous intra-chromosomal HR in human cells. The lack of p53's effect was observed with inverted and direct repeat orientations, and thus applies to both RAD51-dependent and RAD51-independent HR pathways. Similar results were obtained with extra-chromosomal assays (Willers et al., 2001b). The loss of p53 function also did not lead to an increased rate of sister chromatid exchange in HCT-116 cells or in other human cell lines (Bunz et al., 2002b; Sengupta et al., 2003b), nor did it affect the frequency of meiotic crossover events in mice (Gersten and Kemp, 1997b). Together, these findings indicate that p53 has no direct role in the regulation of ectopic or allelic HR mechanisms.

However, in contrast to our results, several groups have unanimously reported 5- to >100-fold rate increases in intra-chromosomal HR with various mammalian cells (see Introduction). The largest increase (>200-fold) was noted with MCF-7 and other human cell lines when p53 was disrupted by interactions with HPV16-E6, SV40 large T antigen, or p53 mutants (Mekeel et al., 1997b). The exact reason for this conflict is not known. However, there are aspects of the assay system that may be important determinants of the outcome. Previous HR assays have relied on viral promoters for reporter gene expression, whereas in our assay system, the *Puro* gene reporter was under the control of the cellular housekeeping *PGK* gene promoter. It has been shown that wt p53 represses a number of cellular and viral gene

promoters (Ho and Benchimol, 2003b). Viral promoters include the HSV-*tk* gene promoter, the SV40 promoter, the CMV promoter, and various LTR promoters (Subler et al., 1992b). Although p53 can repress promoters via several mechanisms, accumulating evidence suggests that it may also repress transcription through recruitment of histone deacetylases (HDACs) and chromatin remodelling (Ho and Benchimol, 2003b).

An indication that p53 may repress promoters through alteration of chromatin structure was obtained from studies using trichostatin A (TSA), an HDAC inhibitor. TSA was shown to abolish p53-mediated repression at various promoters. In addition, the presence of wt p53 at p53-repressed promoters was associated with a decrease in acetylated histone H3 at promoters. The effects of TSA are consistent with the ability of p53 to associate with the HDAC-mSin3a repressor complex (Murphy et al., 1999b). In addition to histone deacetylation, cellular and viral promoter repression has also been associated with DNA methylation, and DNA methyltransferases of mammals appear to interact with HDACs (Dobosy and Selker, 2001; Ng and Bird, 1999). There is also a link between p53 inactivation, demethylation, and promoter reactivation (Ho and Benchimol, 2003b; Jackson-Grusby et al., 2001b; Nasr et al., 2003b). It appeared that the N-terminus, the proline-rich domain, and the C-terminal region of p53 each contribute to p53-mediated promoter repression (Ho and Benchimol, 2003b). Interestingly, mutant forms of p53 that abrogated transcription repression and chromatin remodelling (Ho and Benchimol, 2003b; Smith et al., 1998b) also increased the efficiency of intra-chromosomal HR and DSB repair (Akyuz et al., 2002b; Mekeel et al.,

1997b; Saintigny et al., 1999b; Willers et al., 2000d). Chromatin aspects, like methylation and acetylation/deacetylation, also affect the efficiency of HR and DSB repair (Bird et al., 2002; Maloisel and Rossignol, 1998; Prado et al., 2003).

Another aspect that may influence the outcome is transcriptional interference or promoter suppression (Eszterhas et al., 2002b; Villemure et al., 2001b). Interference/suppression between repeated genes has been associated with chromatin condensation and histone deacetylation, as revealed by the inaccessibility of silenced promoters to nucleases or restriction enzymes and by their reactivation through treatment with HDAC inhibitor TSA (Villemure et al., 2001b). The protein p53 might be involved in interference/suppression through its ability to both recruit HDAC at promoters and alter chromatin compaction (Smith et al., 1998b). Targeted inactivation of p53, or transfection of cells with mutant p53 or HPV16-E6, results in the disruption of high-order chromatin structure, as evidenced by enhanced sensitivity to micrococcal nuclease (Smith et al., 1998b). Multiple mechanisms have been thought to contribute to this phenotype, including histone H1 phosphorylation, disruption of nuclear matrix attachment sites (MARs), and altered expression of component genes of the p53 pathway, whose products may function directly or indirectly in the maintenance of chromatin structure (Smith et al., 1998b; Taylor et al., 1995b). Although p53 seems to lack the ability to directly alter an established, activated chromatin structure *in vitro* (Ogden et al., 2001b), chromatin alteration by p53 *in vivo* might be induced by changes in DNA topology, a process that has also been

thought to trigger interference/suppression (Eszterhas et al., 2002b; Villemure et al., 2001b).

Transcription-induced DNA topology, negative supercoiling upstream of promoters, and positive supercoiling ahead of polymerases, could change the nearby chromatin such that transcription complexes are not efficiently formed on an adjacent promoter. Consistent with this hypothesis is that inserting unwinding DNA elements or MARs between adjacent transcription units can block promoter suppression (Villemure et al., 2001b). MARs elements, which divide eukaryotic chromosomes into topologically and regulatory looped domains, have the ability to unwind under torsional stress, and this capacity was shown to be important for their attachment to the nuclear matrix and for stabilization of the transcriptionally active state of chromatin (reviewed in Villemure et al., 2001). P53 may modulate DNA topology during transcription or replication through its ability to preferentially bind supercoiled DNA (Kim and Deppert, 2003), like histone H1 (Ivanchenko et al., 1997), to interact with topoisomerases (Cowell et al., 2000; Gobert et al., 1999), and to associate with proteins that unwind DNA (Sengupta et al., 2003b). DNA supercoiling, DNA topoisomerases, DNA unwinding proteins, and histone H1 each affects the process of HR and DSB repair (Downs et al., 2003; Prado et al., 2003; Sengupta et al., 2003b; Traverso et al., 2003). The ability of p53 to bind both the nuclear matrix (Okorokov et al., 2002b) and certain types of DNA structures (Kim and Deppert, 2003) may also alter chromatin structure. Chromatin structure alteration may, in turn, affect the function of p53 as a transcription regulator or chromatin modifier (Ho and

Benchimol, 2003b; Kim and Deppert, 2003). It has been shown that p53 can trans-activate, repress, or have no effect on expression of the same reporter gene, depending upon chromosomal integration sites (Cook et al., 1999b).

Previous studies demonstrated that p53 deficiency alone not only does not increase HR rates, but also does not lead to gross chromosomal rearrangements (Bunz et al., 2002b). Our data indicate that p53 deficiency alone also does not result in increased rates of ectopic HR in transcriptionally active chromatin. However, it remains possible that p53 elicits chromosomal rearrangements that may be too subtle to be revealed by karyotyping. This could arise from increased HR between closely spaced DNA repeats at some chromosomal sites where p53 acts directly or indirectly to remodel chromatin structure (Rubbi and Milner, 2003b; Smith et al., 1998b). Relaxation of chromatin in p53-deficient cells may provide a more vulnerable target for DNA damaging agents that would induce recombination and genome rearrangements (Khanna and Jackson, 2001b; Smith et al., 1998b). As a chromatin remodelling-factor, p53 may, therefore, protect against DNA damage (Khanna and Jackson, 2001b; Smith et al., 1998b). In line with this idea is the observation that in p53-deficient cells, stalled replication forks are inappropriately processed to DNA DSBs (Kumari et al., 2004a), as in human cells with defects in chromatin assembly factors (Ye et al., 2003), or co-factors involved in DNA repair (Lomonosov et al., 2003). Relaxation of chromatin in p53-deficient cells may also evoke reactivation of dormant endogenous retroviruses or retrotransposons, such as LINEs or Alu, culminating in insertional mutagenesis or silencing of nearby tumour

suppressor genes by transcriptional interference or promoter suppression (Villemure et al., 2001b; Whitelaw and Martin, 2001).

In conclusion, our results indicate that p53 has no direct role in the regulation of chromosomal HR mechanisms. The concept that p53 acts as a chromatin-remodelling factor that affects transcription, recombination, and DNA repair merits further studies as it is likely to be important in the maintenance of genome integrity, carcinogenesis, and therapy. Our data also suggest caution when designing chromosomal recombination assays, since many proteins involved in HR and DNA repair are also involved in transcription and/or chromatin dynamics.

2.5 Experimental Procedures

2.5.1 DNA Manipulations

The construct pHyg/Puro as well as the recombination reporter substrates pCAinv and pCAdir were constructed by using the *Hyg* gene from pCEP-4, the *Puro* from pGKpuro, and the bacterial plasmid pUC19. The *Hyg* gene was excised from pCEP-4 by *Nru*I and *Sal*I as a 1,864 bp fragment which was blunted and cloned into the blunted *Xba*I site of pUC19. The *Puro* gene was excised by *Sal*I from pGKpuro as a 1,703 bp fragment and inserted into the *Sal*I site of pUC-Hyg to generate pHyg/Puro. To generate pHyg/ScePuro, the *Puro* gene was mutated by digesting its coding region at the adjacent *Bss*HI and *Eag*I sites and inserting the 23 bp *I-Sce*I recognition site in their place. The promoterless copy of the *Puro* gene was excised as a 1,015 bp fragment from pGKpuro by *Bst*II and *Hinc*II and inserted into *Acc*65I of pHyg. The *Puro* promoterless fragment was cloned in both orientations to provide for the direct repeat plasmid pCAdir and the inverted repeat plasmid pCAinv. Fragments were blunted with the Klenow fragment of DNA Polymerase I. All restriction enzymes were purchased from New England Biolabs and Pharmacia.

2.5.2 Cell culture and transfections

The tumour cell lines MCF-7 and HCT-116 used in these experiments originated from the American Type Culture Collection (Rockville, MD). They were cultured at 37°C in humidified 5% CO₂ in MEM and McCoy's media, respectively. All media were supplemented with 10% fetal bovine serum and gentamicin (50 µg/ml). MCF-7 and HCT-116 cells were transfected by electroporation at room temperature with BTX ECM399 at 250V (VWR

Canada, Mississauga, Ont.). For transfection, 2×10^6 cells were suspended in 0.4 cm electroporation cuvettes with 800 μ l MEM or McCoy's medium containing 5 μ g of linear pCAdir, or pCAinv, without serum or antibiotics. They were seeded immediately in 100 mm petri dishes with fresh medium; selection was applied 48 hrs after electroporation with 125 μ g/ml hygromycin (Hyg) for MCF-7 and 200 μ g/ml for HCT-116. Hyg^R clones were picked, expanded, and analysed by Southern blotting (Villemure et al., 2001b). For the expression of HPV16-E6 protein, Hyg^R cells seeded in plates of 6 wells were transfected at 25% confluency with linearized pCMV-E6 plasmid or pCMV-neomycin (Neo) (kindly provided by Dr. Simon N. Powell (Mekeel et al., 1997b), using the fugene 6 reagent at a 2:1 Fugene 6/DNA ratio according to the manufacturer's instructions (Roche Canada, Mississauga, Ont.). Forty-eight hrs after transfection, Neo selection was applied at a concentration of 600 μ g/ml of G418. Neo^R clones were picked, expanded and subjected to Western blot analysis.

2.5.3 Western Blot Analysis

Cells were 40-60% confluent at the time of actinomycin D treatment. MCF-7 cells were exposed to 5 nM actinomycin D while HCT-116 cells were exposed to 100 nM actinomycin D (Sigma, St. Louis, MO). Twenty-four hrs after exposure, the cells were lysed in fresh buffer containing 20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1% Triton X-100, 0.1% SDS, 1 μ g/ml leupeptin, 1 μ g/ml pepstatin A, 1.5 μ g/ml aprotinin and 1 mM

phenylmethanesulphonyl fluoride. Western blotting was carried out under standard procedures with anti-p53 DO-1 and anti-p21 C-19 (Santa Cruz Biotechnologies, Santa Cruz, CA) and enhanced chemiluminescence (Amersham, Baie d'Urfé, Que).

2.5.4 HR rates

In parallel experiments, 1 to 100 G418^R cells from each p53-positive or p53-negative cell clone were seeded in 24-well tissue culture plates with 12 wells for each cell clone. Cells from each well were amplified, counted, and plated at 10⁵, 10⁶, or 10⁷, depending on the clone. Twelve hrs subsequent to seeding, selection was undertaken with 1 µg/ml or 1.5 µg/ml of Puro (Sigma) scored for MCF-7 or HCT-116 Puro^R colonies, which were counted by staining with a solution of crystal violet (3% formaldehyde, 4% acetic acid, 1% crystal violet dissolved in 70% ethanol). HR frequency was established by dividing the number of Puro^R colonies by the number of plated cells. The frequencies determined HR rate as described (Capizzi and Jameson, 1973). The student t test was performed to measure the statistical significance of differences in the HR rate between p53-positive and p53-negative cell clones.

2.5.5 PCR analysis of Puro^R colonies

Genomic DNA from individual Puro^R cell clones was extracted, and 400 ng subjected to PCR, as described previously (Villemure, 2003). The following primer pairs were employed in PCR (Fig. 3): Hyg4419 (5'-

gctgtgtagaagtactcgccg-3') and pUC469 (5'-tgaccatgattacgccaagct-3') amplify the 2,324 bp fragment with both direct and inverted repeats; Hyg1891 (5'-aacttctcgacagacgtcgcggtg-3') and pUC469 amplify the 2,091 bp fragment with inverted repeats; whereas pUC315 (5'-aaaggggatgtgctgcaaggcga-3') and pUC469 amplify the 1,836 bp fragment with direct repeats.

2.6 References

1. Nicolaidis, P. and Petersen, M. B. Origin and mechanisms of non-disjunction in human autosomal trisomies. *Hum Reprod*, 13: 313-319, 1998.
2. Jeffreys, A. J. and May, C. A. Intense and highly localized gene conversion activity in human meiotic crossover hot spots. *Nat Genet*, 36: 151-156, 2004.
3. Carrington, M. and Cullen, M. Justified chauvinism: advances in defining meiotic recombination through sperm typing. *Trends Genet*, 20: 196-205, 2004.
4. Khanna, K. K. and Jackson, S. P. DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. *Nat Genet*, 27: 247-254., 2001.
5. van Gent, D. C., Hoeijmakers, J. H., and Kanaar, R. Chromosomal stability and the DNA double-stranded break connection. *Nat Rev Genet*, 2: 196-206, 2001.
6. Thompson, L. H. and Schild, D. Recombinational DNA repair and human disease. *Mutat Res*, 509: 49-78, 2002.
7. Venkitaraman, A. R. Tracing the network connecting brca and fanconi anaemia proteins. *Nat Rev Cancer*, 4: 266-276, 2004.
8. West, S. C. Molecular views of recombination proteins and their control. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 4: 435-445, 2003.
9. Labuda, D., Zietkiewicz, and Mitchell, G.A. Alu elements as a source of genomic variation: deleterious and evolutionary novelties. *In: J. R. Maraia (ed.), The impact of short interspersed elements (SINEs) on the host genome*, pp. 1-24. Austin: R.G. Landes company, 1995.
10. Bi, W., Park, S. S., Shaw, C. J., Withers, M. A., Patel, P. I., and Lupski, J. R. Reciprocal crossovers and a positional preference for strand exchange in recombination events resulting in deletion or duplication of chromosome 17p11.2. *Am J Hum Genet*, 73: 1302-1315, 2003.
11. Tayebi, N., Stubblefield, B. K., Park, J. K., Orvisky, E., Walker, J. M., LaMarca, M. E., and Sidransky, E. Reciprocal and nonreciprocal recombination at the glucocerebrosidase gene region: implications for complexity in Gaucher disease. *Am J Hum Genet*, 72: 519-534, 2003.
12. Prado, F., Cortes-Ledesma, F., Huertas, P., and Aguilera, A. Mitotic recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet*, 42: 185-198, 2003.
13. Gross, M., Hanenberg, H., Lobitz, S., Friedl, R., Herterich, S., Dietrich, R., Gruhn, B., Schindler, D., and Hoehn, H. Reverse mosaicism in Fanconi anemia: natural gene therapy via molecular self-correction. *Cytogenet Genome Res*, 98: 126-135, 2002.
14. Jonkman, M. F., Scheffer, H., Stulp, R., Pas, H. H., Nijenhuis, M., Heeres, K., Owaribe, K., Pulkkinen, L., and Uitto, J. Revertant mosaicism in epidermolysis bullosa caused by mitotic gene conversion. *Cell*, 88: 543-551., 1997.

15. Cavenee, W. K., Dryja, T. P., Phillips, R. A., Benedict, W. F., Godbout, R., Gallie, B. L., Murphree, A. L., Strong, L. C., and White, R. L. Expression of recessive alleles by chromosomal mechanisms in retinoblastoma. *Nature*, 305: 779-784., 1983.
16. Hauptschein, R. S., Gaidano, G., Rao, P. H., Scotto, L., Edwards, Y. H., Chaganti, R. S., and Dalla-Favera, R. An apparent interlocus gene conversion-like event at a putative tumor suppressor gene locus on human chromosome 6q27 in a Burkitt's lymphoma cell line. *DNA Res*, 7: 261-272, 2000.
17. Boocock, G. R., Morrison, J. A., Popovic, M., Richards, N., Ellis, L., Durie, P. R., and Rommens, J. M. Mutations in SBDS are associated with Shwachman-Diamond syndrome. *Nat Genet*, 33: 97-101, 2003.
18. Ezquieta, B., Cueva, E., Oyarzabal, M., Oliver, A., Varela, J. M., and Jariego, C. Gene conversion (655G splicing mutation) and the founder effect (Gln318Stop) contribute to the most frequent severe point mutations in congenital adrenal hyperplasia (21-hydroxylase deficiency) in the Spanish population. *Clin Genet*, 62: 181-188, 2002.
19. Mazzei, R., Gambardella, A., Conforti, F. L., Magariello, A., Patitucci, A., Gabriele, A. L., Sprovieri, T., Labate, A., Valentino, P., Bono, F., Bonavita, S., Zappia, M., Muglia, M., and Quattrone, A. Gene conversion events in adult-onset spinal muscular atrophy. *Acta Neurol Scand*, 109: 151-154, 2004.
20. Bunz, F., Fauth, C., Speicher, M. R., Dutriaux, A., Sedivy, J. M., Kinzler, K. W., Vogelstein, B., and Lengauer, C. Targeted inactivation of p53 in human cells does not result in aneuploidy. *Cancer Res*, 62: 1129-1133, 2002.
21. Gersten, K. M. and Kemp, C. J. Normal meiotic recombination in p53-deficient mice. *Nat Genet*, 17: 378-379., 1997.
22. Mekeel, K. L., Tang, W., Kachnic, L. A., Luo, C. M., DeFrank, J. S., and Powell, S. N. Inactivation of p53 results in high rates of homologous recombination. *Oncogene*, 14: 1847-1857., 1997.
23. Bertrand, P., Rouillard, D., Boulet, A., Levalois, C., Soussi, T., and Lopez, B. S. Increase of spontaneous intrachromosomal homologous recombination in mammalian cells expressing a mutant p53 protein. *Oncogene*, 14: 1117-1122., 1997.
24. Willers, H., McCarthy, E. E., Alberti, W., Dahm-Daphi, J., and Powell, S. N. Loss of wild-type p53 function is responsible for upregulated homologous recombination in immortal rodent fibroblasts. *Int J Radiat Biol*, 76: 1055-1062., 2000.
25. Gebow, D., Miselis, N., and Liber, H. L. Homologous and nonhomologous recombination resulting in deletion: effects of p53 status, microhomology, and repetitive DNA length and orientation. *Mol Cell Biol*, 20: 4028-4035, 2000.
26. Akyuz, N., Boehden, G. S., Susse, S., Rimek, A., Preuss, U., Scheidtmann, K. H., and Wiesmuller, L. DNA substrate dependence of p53-mediated regulation of double-strand break repair. *Mol Cell Biol*, 22: 6306-6317, 2002.

27. Lu, X., Lozano, G., and Donehower, L. A. Activities of wildtype and mutant p53 in suppression of homologous recombination as measured by a retroviral vector system. *Mutat Res*, 522: 69-83, 2003.
28. Bishop, A. J., Barlow, C., Wynshaw-Boris, A. J., and Schiestl, R. H. Atm deficiency causes an increased frequency of intrachromosomal homologous recombination in mice. *Cancer Res*, 60: 395-399., 2000.
29. Levine, A. J. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell*, 88: 323-331, 1997.
30. Saintigny, Y., Rouillard, D., Chaput, B., Soussi, T., and Lopez, B. S. Mutant p53 proteins stimulate spontaneous and radiation-induced intrachromosomal homologous recombination independently of the alteration of the transactivation activity and of the G1 checkpoint. *Oncogene*, 18: 3553-3563., 1999.
31. Dudenhoffer, C., Kurth, M., Janus, F., Deppert, W., and Wiesmuller, L. Dissociation of the recombination control and the sequence-specific transactivation function of P53. *Oncogene*, 18: 5773-5784., 1999.
32. Willers, H., McCarthy, E. E., Wu, B., Wunsch, H., Tang, W., Taghian, D. G., Xia, F., and Powell, S. N. Dissociation of p53-mediated suppression of homologous recombination from G1/S cell cycle checkpoint control. *Oncogene*, 19: 632-639., 2000.
33. Boehden, G. S., Akyuz, N., Roemer, K., and Wiesmuller, L. p53 mutated in the transactivation domain retains regulatory functions in homology-directed double-strand break repair. *Oncogene*, 22: 4111-4117, 2003.
34. Sturzbecher, H. W., Donzelmann, B., Henning, W., Knippschild, U., and Buchhop, S. p53 is linked directly to homologous recombination processes via RAD51/RecA protein interaction. *Embo J*, 15: 1992-2002., 1996.
35. Susse, S., Janz, C., Janus, F., Deppert, W., and Wiesmuller, L. Role of heteroduplex joints in the functional interactions between human Rad51 and wild-type p53. *Oncogene*, 19: 4500-4512., 2000.
36. Janz, C., Susse, S., and Wiesmuller, L. p53 and recombination intermediates: role of tetramerization at DNA junctions in complex formation and exonucleolytic degradation. *Oncogene*, 21: 2130-2140., 2002.
37. Sengupta, S., Linke, S. P., Pedoux, R., Yang, Q., Farnsworth, J., Garfield, S. H., Valerie, K., Shay, J. W., Ellis, N. A., Wasylyk, B., and Harris, C. C. BLM helicase-dependent transport of p53 to sites of stalled DNA replication forks modulates homologous recombination. *Embo J*, 22: 1210-1222, 2003.
38. Helleday, T. Pathways for mitotic homologous recombination in mammalian cells. *Mutat Res*, 532: 103-115, 2003.
39. Henry-Mowatt, J., Jackson, D., Masson, J. Y., Johnson, P. A., Clements, P. M., Benson, F. E., Thompson, L. H., Takeda, S., West, S. C., and Caldecott, K. W. XRCC3 and Rad51 modulate replication fork progression on damaged vertebrate chromosomes. *Mol Cell*, 11: 1109-1117, 2003.

40. Lomonosov, M., Anand, S., Sangrithi, M., Davies, R., and Venkitaraman, A. R. Stabilization of stalled DNA replication forks by the BRCA2 breast cancer susceptibility protein. *Genes Dev*, 17: 3017-3022, 2003.
41. Dominguez-Bendala, J., Priddle, H., Clarke, A., and McWhir, J. Elevated expression of exogenous Rad51 leads to identical increases in gene-targeting frequency in murine embryonic stem (ES) cells with both functional and dysfunctional p53 genes. *Exp Cell Res*, 286: 298-307, 2003.
42. Willers, H., McCarthy, E. E., Hubbe, P., Dahm-Daphi, J., and Powell, S. N. Homologous recombination in extrachromosomal plasmid substrates is not suppressed by p53. *Carcinogenesis*, 22: 1757-1763., 2001.
43. Villemure, J. F. and Belmaaza, A. Effects of sequence divergence on the efficiency of extrachromosomal recombination in mismatch repair proficient and deficient mammalian cell lines. *Somat Cell Mol Genet*, 25: 79-90., 1999.
44. Ho, J. and Benchimol, S. Transcriptional repression mediated by the p53 tumour suppressor. *Cell Death Differ*, 10: 404-408, 2003.
45. Eszterhas, S. K., Bouhassira, E. E., Martin, D. I., and Firing, S. Transcriptional interference by independently regulated genes occurs in any relative arrangement of the genes and is influenced by chromosomal integration position. *Mol Cell Biol*, 22: 469-479, 2002.
46. Villemure, J. F., Savard, N., and Belmaaza, A. Promoter suppression in cultured mammalian cells can be blocked by the chicken beta-globin chromatin insulator 5'HS4 and matrix/scaffold attachment regions. *J Mol Biol*, 312: 963-974., 2001.
47. Subler, M. A., Martin, D. W., and Deb, S. Inhibition of viral and cellular promoters by human wild-type p53. *J Virol*, 66: 4757-4762, 1992.
48. Hasegawa, K. and Nakatsuji, N. Insulators prevent transcriptional interference between two promoters in a double gene construct for transgenesis. *FEBS Lett*, 520: 47-52, 2002.
49. Gupta, M., Fan, S., Zhan, Q., Kohn, K. W., O'Connor, P. M., and Pommier, Y. Inactivation of p53 increases the cytotoxicity of camptothecin in human colon HCT116 and breast MCF-7 cancer cells. *Clin Cancer Res*, 3: 1653-1660., 1997.
50. Capizzi, R. L. and Jameson, J. W. A table for the estimation of the spontaneous mutation rate of cells in culture. *Mutat Res*, 17: 147-148., 1973.
51. Villemure, J. F. MSH2-deficient human cells exhibit a defect in the accurate termination of homology-directed repair of DNA double-strand breaks. *Cancer Res*, 63: 3334-3339, 2003.
52. Murphy, M., Ahn, J., Walker, K. K., Hoffman, W. H., Evans, R. M., Levine, A. J., and George, D. L. Transcriptional repression by wild-type p53 utilizes histone deacetylases, mediated by interaction with mSin3a. *Genes Dev*, 13: 2490-2501, 1999.

53. Dobosy, J. R. and Selker, E. U. Emerging connections between DNA methylation and histone acetylation. *Cell Mol Life Sci*, 58: 721-727, 2001.
54. Ng, H. H. and Bird, A. DNA methylation and chromatin modification. *Curr Opin Genet Dev*, 9: 158-163., 1999.
55. Jackson-Grusby, L., Beard, C., Possemato, R., Tudor, M., Fambrough, D., Csankovszki, G., Dausman, J., Lee, P., Wilson, C., Lander, E., and Jaenisch, R. Loss of genomic methylation causes p53-dependent apoptosis and epigenetic deregulation. *Nat Genet*, 27: 31-39., 2001.
56. Nasr, A. F., Nutini, M., Palombo, B., Guerra, E., and Alberti, S. Mutations of TP53 induce loss of DNA methylation and amplification of the TROP1 gene. *Oncogene*, 22: 1668-1677, 2003.
57. Smith, M. L., Bortnick, R. A., Sheikh, M. S., and Fornace, A. J., Jr. Chromatin relaxation by overexpression of mutant p53, HPV16-E6, or cyclin G transgenes. *Exp Cell Res*, 242: 235-243., 1998.
58. Maloisel, L. and Rossignol, J. L. Suppression of crossing-over by DNA methylation in *Ascobolus*. *Genes Dev*, 12: 1381-1389, 1998.
59. Bird, A. W., Yu, D. Y., Pray-Grant, M. G., Qiu, Q., Harmon, K. E., Megee, P. C., Grant, P. A., Smith, M. M., and Christman, M. F. Acetylation of histone H4 by Esa1 is required for DNA double-strand break repair. *Nature*, 419: 411-415, 2002.
60. Taylor, W. R., Chadee, D. N., Allis, C. D., Wright, J. A., and Davie, J. R. Fibroblasts transformed by combinations of ras, myc and mutant p53 exhibit increased phosphorylation of histone H1 that is independent of metastatic potential. *FEBS Lett*, 377: 51-53, 1995.
61. Ogden, S. K., Lee, K. C., Wernke-Dollries, K., Stratton, S. A., Aronow, B., and Barton, M. C. p53 targets chromatin structure alteration to repress alpha-fetoprotein gene expression. *J Biol Chem*, 276: 42057-42062, 2001.
62. Kim, E. and Deppert, W. The complex interactions of p53 with target DNA: we learn as we go. *Biochem Cell Biol*, 81: 141-150, 2003.
63. Ivanchenko, M., Zlatanova, J., and van Holde, K. Histone H1 preferentially binds to superhelical DNA molecules of higher compaction. *Biophys J*, 72: 1388-1395, 1997.
64. Gobert, C., Skladanowski, A., and Larsen, A. K. The interaction between p53 and DNA topoisomerase I is regulated differently in cells with wild-type and mutant p53. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96: 10355-10360, 1999.
65. Cowell, I. G., Okorokov, A. L., Cutts, S. A., Padget, K., Bell, M., Milner, J., and Austin, C. A. Human topoisomerase IIalpha and IIbeta interact with the C-terminal region of p53. *Exp Cell Res*, 255: 86-94, 2000.
66. Downs, J. A., Kosmidou, E., Morgan, A., and Jackson, S. P. Suppression of homologous recombination by the *Saccharomyces cerevisiae* linker histone. *Mol Cell*, 11: 1685-1692, 2003.
67. Traverso, G., Bettegowda, C., Kraus, J., Speicher, M. R., Kinzler, K. W., Vogelstein, B., and Lengauer, C. Hyper-recombination and genetic

- instability in BLM-deficient epithelial cells. *Cancer Res*, 63: 8578-8581, 2003.
68. Okorokov, A. L., Rubbi, C. P., Metcalfe, S., and Milner, J. The interaction of p53 with the nuclear matrix is mediated by F-actin and modulated by DNA damage. *Oncogene*, 21: 356-367, 2002.
 69. Cook, J. L., Zhang, Z., Alam, J., and Re, R. N. Effects of chromosomal integration site upon p53 interactions with DNA consensus sequence homologies. *Oncogene*, 18: 2373-2379, 1999.
 70. Rubbi, C. P. and Milner, J. p53 is a chromatin accessibility factor for nucleotide excision repair of DNA damage. *Embo J*, 22: 975-986, 2003.
 71. Kumari, A., Schultz, N., and Helleday, T. p53 protects from replication-associated DNA double-strand breaks in mammalian cells. *Oncogene*, 23: 2324-2329, 2004.
 72. Ye, X., Franco, A. A., Santos, H., Nelson, D. M., Kaufman, P. D., and Adams, P. D. Defective S phase chromatin assembly causes DNA damage, activation of the S phase checkpoint, and S phase arrest. *Mol Cell*, 11: 341-351, 2003.
 73. Whitelaw, E. and Martin, D. I. Retrotransposons as epigenetic mediators of phenotypic variation in mammals. *Nat Genet*, 27: 361-365, 2001.

2.7 Figure legends

Figure 5. Schematic representations of the constructs developed for this study.

(a) The arrangement of the marker and reporter genes is depicted by arrows, which indicate convergent directions of transcription. The *Hyg* gene is expressed from the HSV-*tk* gene promoter and terminates with the HSV-*tk* polyadenylation signal (not shown), whereas *Puro* expression is driven by the *PGK* gene promoter and terminates with *PGK* polyadenylation signal (not shown). This combination of promoters appears to decrease interference/suppression between convergent units (see text), and therefore was used to construct HR reporters.

(b) The HR reporter construct pCAdir is composed of 2 differentially mutated *Puro* genes arranged as direct repeats: *ScePuro*, which is a full length *Puro* gene with insertion of the I-Sce1 site in place of Eag1/BssHII restriction sites, and *Puro* Δ 5', a promoterless *Puro* gene. The promoterless *Puro* gene is deemed necessary to limit the number of actively transcribed units to 2 (see text).

(c) pCAinv is identical to pCAdir except that the 2 mutated *Puro* genes are arranged as inverted repeats.

These constructs assay for both RAD51-dependent (gene conversion and crossover) and RAD51-independent (replication slippage or SSA) HR pathways. The former can take place between either repeat, whereas the latter is limited to direct repeats. Either HR event would result in

reconstitution of a functional *Puro* gene through loss of the I-Sce1 site and gain of the Eag1/BssHII sites, restoring resistance to Puro.

Figure 6. Induction of p53 and p21 response to DNA damage.

Induction of DNA damage by a variety of agents is known to activate p53, which, in turns, acts as a transcriptional regulator of several target genes; the main one being the gene encoding the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 (29). Treatment of HCT-116 and MCF-7 cell clones with actinomycin D led to strongly increased p53 and p21 levels (Lane 1 in A and B). In contrast, β -actin expression was not affected by the induction of DNA damage. The p53 protein can be easily disrupted in MCF-7 or HCT-116 cells by expressing HPV16-E6 oncoprotein and this results in a lack of p21 gene transactivation upon DNA damage (Gupta et al., 1997; Mekeel et al., 1997b) (A and B).

(A) Western blot analysis of HCT-116 protein extracts isolated from actinomycin D (5 ng/ml)-treated, p53-positive and E6-expressing cell clones with antibodies to p53 and p21, respectively.

(B) Same as for panel A, except MCF-7 cells were treated with actinomycin D at 100 ng/ml. To control equal loading, the Western blots were reprobbed with β -actin antibody.

Figure 7. PCR analysis of Puro^R genomic DNA.

(A)(B) Gene conversion products with both inverted and direct repeat. The PCR primer pair Hyg4419/pUC469 amplifies 2,324 bp that can be cut with Eag1 into 1,283 bp and 1,041 bp (Fig. C, lanes 2 and 3).

(A) Inversion (crossover) with inverted repeats. The PCR primer pair Hyg1891 and pUC469 amplifies 2091 bp that can be cut with Eag1 into 2 fragments: 1050 pb and 1041 bp (not shown in Fig. C).

(B) Crossover/SSA deletion with direct repeats. The PCR primer pair pUC315 and pUC469 amplifies 1,836 bp that can be cut with Eag1 into 2 fragments: 822 bp and 1,041 bp (Fig. C, lanes 5 and 6).

(C) Gel electrophoresis of representative PCR products and their digesting. All PCR products were digested with I-Sce1 and Eag1. Lanes 1 and 4: 1 kbp DNA ladder, Lanes 2 and 5 represent I-Sce1 digestions, whereas lanes 3 and 6 illustrate Eag1 digestions of conversion and deletion products, respectively.

Figure 5. Schematic representations of the constructs developed for this study

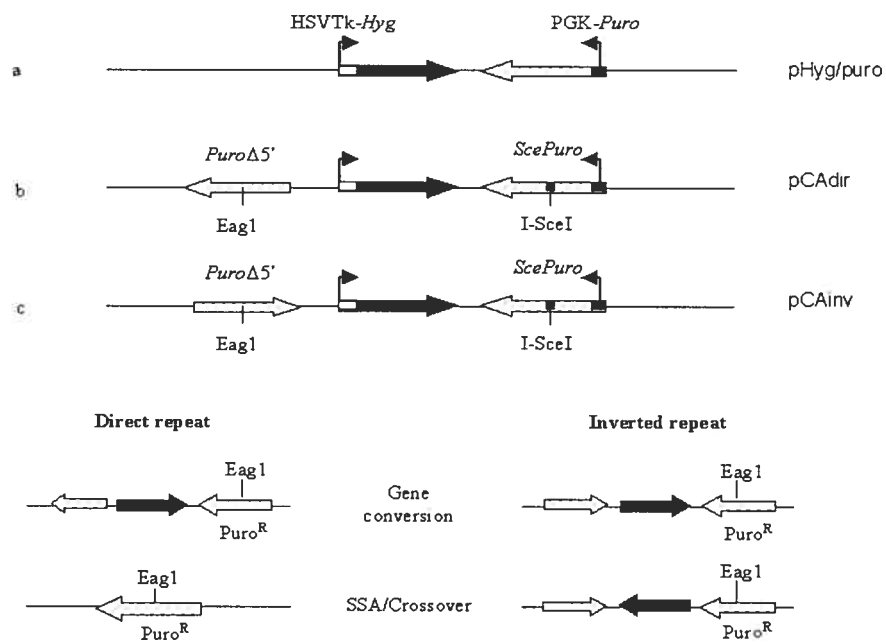


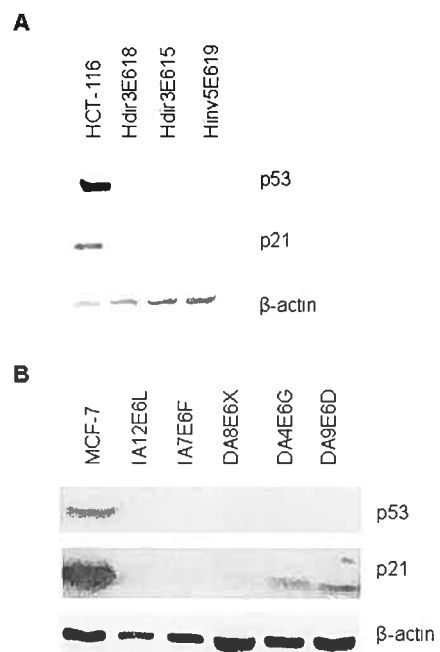
Figure 6. Induction of p53 and p21 response to DNA damage.

Figure 7. PCR analysis of Puro^R genomic DNA.

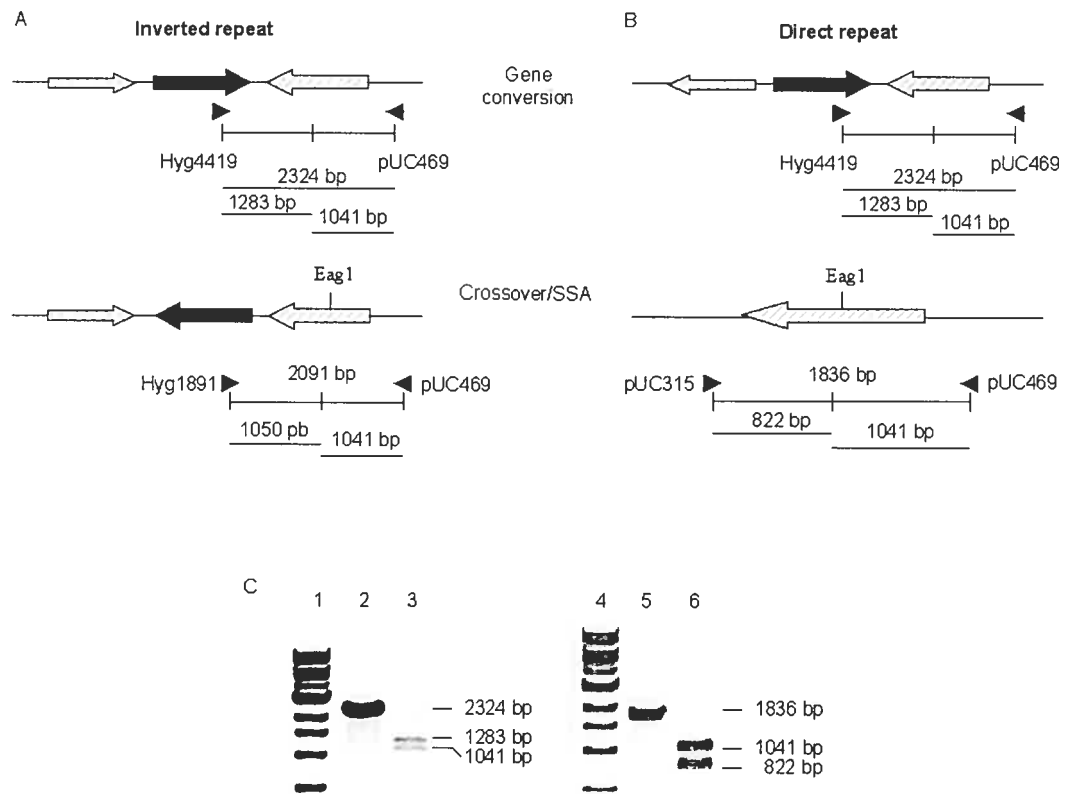


Table 1. Effect of p53 on spontaneous intra-chromosomal HR

Cell lines	Response to DNA damage		HR rate (x 10 ⁻⁶ /cell/generation)
	p53	p21	
MCF-7	+	+	
Direct repeat			
DirA9	+	+	0.5
DirA9/E6D	-	-	0.2
DirA8	+	+	18.5
DirA8/E6X	-	-	15.3
Inverted repeat			
InvA12	+	+	131.6
InvA1/2E6L	-	-	111.5
InvA7	+	+	71.6
InvA7/E6F	-	-	47.5
HCT116	+	+	
Direct repeat			
Hdir3	+	+	33,6
Hdir3/E615	-	-	25.5
Inverted repeat			
Hinv5	+	+	0.7
Hinv5/E619	-	-	1.3

HR rate (HR event/cell/generation) was measured as described (Capizzi and Jameson, 1973).

Chapitre 3

Matériels et Méthodes

3. Matériels et méthodes

3.1 Extraction de l'ADN génomique

L'extraction de l'ADN génomique des cellules a été faite selon la méthode de « salting out » (Current protocols in molecular biology, section 2.2). Après avoir rincé les cellules au PBS puis incubées pendant 10 minutes avec un de tampon de lyse (1 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 5 mM NaCl, 10 % Sarkosyl et 10 mg/mL protéinase K (Gibco-BRL), les lysats ont été transférés dans des tubes eppendorf et incubés 24 h à 56°C. Des étapes d'extraction au phénol-chloroforme et de précipitation à l'éthanol, 95% ont servi à assurer la pureté de l'ADN. La récupération de l'ADN s'est faite à l'aide d'une tige de verre. Les sels présents dans l'ADN ont été éliminés en rinçant l'ADN extrait à l'éthanol 70% en premier lieu et à l'éthanol 95% pour éliminer l'eau. L'ADN à finalement été séché et ressuspendu dans du TE (1 mM EDTA pH8,0; 10 mM Tris-HCl pH 7,6) contenant 300 ng/mL de RNase A (Boehringer-Mannheim).

3.2 Analyse des recombinants par PCR

L'ADN extrait des recombinants a été analysé par PCR pour déterminer la nature de l'évènement de recombinaison. L'analyse de ces évènements a été faite à l'aide de trois paires d'amorces spécifiques (voir chapitre 2 « Materials and Methods »). Les réactions de PCR ont été effectuées selon le protocole suivante : 400 ng d'ADN génomique, 200 µM dNTP, 2,5% DMSO, 1,5 mM MgCl₂, 100 ng de chaque amorce, le tampon et 2,6 unités de l'ADN polymérase du kit « Expand High Fidelity PCR System » (Boehringer Mannheim). Les cycles de la réaction de PCR ont été programmés comme suit : 2 minutes de dénaturation à 95°C, 30 cycles d'amplification incluant une étape de dénaturation de 30 secondes à 95°C, une étape d'appariement d'une minute à 56°C et une étape de synthèse d'une minute à 72°C. Finalement, une période de synthèse d'ADN de 10 minutes à 72°C permet

de finaliser les réactions amorcées. Les produits de PCR sont par la suite analysés sur gel d'agarose 0,7%.

3.3 Induction de la cassure double brin

Nous avons induit la cassure double brin en transfectant le vecteur p β actineScel exprimant la méganucléase I-SceI. Comme contrôle de transfection ainsi que d'induction des cassures double-brins, nous avons utilisé le plasmide pFRED25, exprimant GFP (green fluorescent protein). Toutes les transfections ont été effectuées à l'aide du réactif fugene6 (Boehringer Mannheim) avec 6 μ l de fugene6 pour 3 μ g d'ADN, selon les recommandations du fournisseur. Pour permettre une induction efficace des cassures double-brins, la sélection à la puromycine a été appliquée 10 jours posttransférations. Après 15 jours de sélection, les colonies puro^R sont comptées et la fréquence de RH est établie. L'induction de la RH par I-SceI est le ratio entre les fréquences de RH induite et spontanée (transfecté avec pFRED25).

Chapitre 4

Résultats

4. Résultats

4.1 Le suppresseur de tumeur p53 n'est pas directement impliqué dans l'inhibition de la RH induite par I-Scel.

Dans le but d'évaluer le rôle de p53 dans la réparation des CDBs par RH, nous avons exprimé I-Scel dans les clones p53 +/+ et p53 -/- contenant des répétitions directes (pCAdir) et inverses (pCAinv). Lorsque nous avons induit la RH entre des répétitions directes, nous avons obtenu des résultats divergents entre les lignées cellulaires HCT116 et MCF-7 (figure 8). Dans les cellules MCF-7, nous avons trouvé que p53 n'a aucun effet significatif sur l'induction de la RH par les CDBs, avec une induction par I-SCEI de 11.8 fois pour p53 +/+, et de 13.3 pour p53 -/-. À l'opposé, dans les cellules HCT116, l'induction de la RH est de 22.0 fois pour p53 +/+, et de 34.7 pour p53 -/-. Dans le cas des répétitions inverses, il n'y avait pas d'induction de la RH dans deux clones MCF-7 p53 +/+. L'expression de la protéine HPV16-E6, a provoquée dans un des clones de 62.3 fois et de seulement de 3.0 fois dans le second clone. Dans les cellules HCT116, l'induction par I-SCE I est similaire entre les clones p53 +/+ (82.0) et p53 -/- (83.9 fois). Ces résultats nous ont portés à croire que l'influence de p53 sur la réparation des CDBs par RH n'est pas due à un rôle direct de la protéine p53 sur la RH.

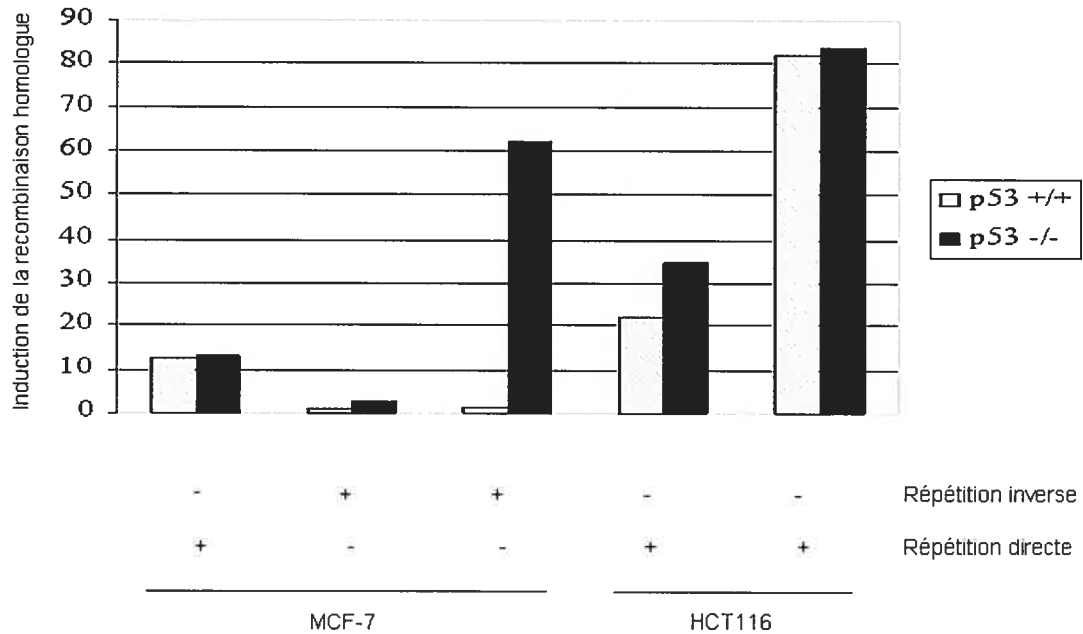


Figure 8. Induction relative de la recombinaison homologue par des CDBs en lignée cellulaire humaine.

Induction de la RH par l'expression de I-SCEI en cellules p53 positives et exprimant la protéine HPV16-E6. L'expression du GFP a été utilisée comme contrôle de transfection. L'induction de la RH représente le ratio entre le nombre de clones I-SCEI pur⁺ et le nombre de clones GFP pur⁺. Toutes les expériences d'inductions de la RH dans les cellules p53 positive et p53/E6 ont été faites en parallèle.

Chapitre 5

Discussion

5. Discussion

L'approche expérimentale utilisée pour cette étude nous a permis d'étudier le rôle de p53 sur la RH à un site unique dans le génome. Cette approche permet d'éliminer les variations de la RH entre différents sites génomiques. La lignée p53 -/- dérive donc directement de sa lignée parentale p53 +/- contenant une copie unique du plasmide rapporteur. Les résultats obtenus lors de cette étude montrent que p53 n'a pas d'effet inhibiteur sur la recombinaison homologue intrachromosomique spontanée ou induite par des CDBs. Ce manque d'effet de p53 a été observé pour des séquences répétitions inverses et directes, indiquant que p53 n'affecte ni la RH Rad51-dépendante, ni la RH Rad51-indépendante.

5.1 L'expression de la protéine HPV16-E6 n'affecte pas le taux de recombinaison spontanée

Des études faites par plusieurs équipes ont montré l'importance de p53 dans l'inhibition de la RH (voir introduction). Les augmentations de la RH de l'ordre de 5 à 200 fois ont été obtenues par l'expression des protéines HPV16-E6, SV40 large T, et p53 mutantes. Le mécanisme par lequel p53 pourrait agir comme inhibiteur serait en contrôlant la recombinaison Rad51. En effet, lors d'études *in vitro*, p53 interagit avec et inhibe Rad51. Cependant, lorsque nous avons évalué le taux de RH intrachromosomique dans les cellules MCF-7 exprimant ou non la protéine HPV16-E6, nous n'avons pu détecter de différences significatives entre les taux de RH en présence et en absence de p53 (Table 1). Pour confirmer ces résultats, et pour éliminer la probabilité que cette absence d'inhibition ne fût pas due à un effet de clonalité dans les cellules MCF-7, nous avons répété ces expériences dans la lignée cellulaire humaine p53 positive HCT116 (Table 1). Tel qu'attendu, nous n'avons trouvé aucune différence significative dans les taux de RH

entre les HCT116 p53 +/+ et les HCT116 p53 -/-. Il est intéressant de noter qu'une étude précédente, conduite par l'équipe de Simon Powell, sur la relation entre p53 et la RH, dans les cellules MCF-7, en absence et en présence de HPV16-E6, a montrée une augmentation du taux de la RH intrachromosomique d'approximativement 200 fois en absence de p53 (Mekeel et al., 1997a).

Mais si p53 n'inhibe pas la RH, quelle est la signification des interactions avec Rad51? Il est possible que l'inhibition de Rad51 par p53 observée *in vitro* n'a aucune signification biologique. Il est aussi possible que l'interaction ait une activité biologique indépendante de la RH.

5.2 La dégradation de p53 par la protéine HPV16-E6 affecte la réparation des CDBs à certains sites génomiques.

Les CDBs se produisent régulièrement dans le génome. Une incapacité à réparer fidèlement les CDBs entraîne de l'instabilité génomique (voir introduction). Heureusement, les cellules ont des mécanismes permettant la réparation de ces dommages; le plus fidèle d'entre eux est la RH. Pour déterminer si l'instabilité génomique associée à une perte de p53 est due à une incapacité à réparer correctement les CDBs par RH, nous avons induit des CDBs avec la nucléase I-SCEI. Les résultats obtenus indiquent une variabilité des inductions de la RH en fonction du site génomique (figure 8). En effet, deux clones sur cinq ont la même induction en absence et en présence de p53, alors que deux autres montrent une induction plus forte en absence de p53, et un clone ne présente aucune induction. Cette variation se produit à la fois pour les répétitions directes et les répétitions inverses. Ces résultats sont en conflit avec les résultats précédemment publiés indiquant que la perte de p53 entraînait une augmentation de l'induction de la RH par I-SCEI (Akyuz et al., 2002a). Or ces résultats semblent en conflit avec le rôle de p53 dans le maintien de la stabilité du génome, car comme il a été mentionné précédemment, la RH est

le mécanisme le plus fidèle pour réparer les CDBs. Ce conflit apparent peut être résolu en offrant une explication alternative aux résultats obtenus par Akyuz et al. (2002). Dans cette étude, l'induction de la RH par I-SCEI est pratiquement inexistante en présence de p53, alors qu'elle est significative en absence de p53. Dans ce cas, l'inhibition pourrait aussi être due à une incapacité de I-SCEI de « couper » l'ADN, ce qui aurait pour effet de prévenir l'induction de la RH. À cet effet, il a récemment été démontré que l'absence de p53 est associée à une augmentation des CDBs (Kumari et al., 2004b). Il se peut que cette « sensibilité » de l'ADN aux CDBs soit un reflet de l'état de la chromatine; une chromatine moins compacte serait plus susceptible à être endommagée (Wu et al., 1999). Notons que la perte d'un p53 fonctionnel entraîne une relaxation de la chromatine (voir introduction), ce qui faciliterait la formation de dommages, notamment par I-SCEI. Cette hypothèse expliquerait aussi la variabilité observée lorsque nous avons induit la RH par I-SCEI. En effet, la perte de p53 affecterait la chromatine à certains sites alors que d'autres sites ne seraient pas affectés.

5.3 P53 et la RH, comment expliquer les contradictions.

Comment peut-on expliquer le conflit entre nos résultats, où la perte de p53 n'a aucun effet sur la recombinaison homologe, et les résultats précédemment publiés où la perte de p53 entraînait une augmentation du taux de RH pouvant atteindre des facteurs de plus de 200 fois.

Pour tenter d'expliquer ces divergences, nous avons comparé la structure des essais de recombinaison utilisés précédemment, avec l'essai utilisé pour cette étude. Les essais utilisés lors d'études précédentes, dépendaient exclusivement de promoteurs viraux pour exprimer les gènes rapporteurs (Akyuz et al., 2002a; Bertrand et al., 1997a; Boehden et al., 2003a; Dudenhoffer et al., 1999a; Janz and Wiesmuller, 2002; Lu et al., 2003a; Mekeel et al., 1997a; Saintigny and Lopez, 2002; Saintigny et al.,

1999a; Sengupta et al., 2003a; Wiesmuller et al., 1996; Willers et al., 2000a; Willers et al., 2000c). Or, le gène rapporteur *puromycin*, utilisé dans notre étude, est sous le contrôle du promoteur humain *PGK*. Parmi les promoteurs viraux utilisés, on retrouve le promoteur du HSV-*tk*, du SV40, du CMV, ainsi que des promoteurs LTR. Ces promoteurs, ainsi que d'autres promoteurs viraux et cellulaires, ont été démontrés comme pouvant être réprimés par p53 (Ho and Benchimol, 2003a; Subler et al., 1992a). En affectant négativement la transcription, p53 pourrait indirectement affecter la RH puisqu'il a déjà été démontré que des niveaux élevés de transcription peuvent affecter positivement la RH spontanée (Nickoloff, 1992; Nickoloff and Reynolds, 1990; Thomas and Rothstein, 1989).

Les mécanismes par lesquels p53 réprime la transcription ne sont pas entièrement élucidés. Par contre, les évidences en faveur d'un rôle du remodelage de la chromatine dans la répression p53 dépendante, sont de plus en plus importantes (Ho and Benchimol, 2003a). La présence de p53 aux promoteurs réprimés de manière p53 dépendante, a été associée à une diminution locale de l'acétylation des histones H3. Cette diminution des H3 acétylées semble être dépendante des HDACs, puisque l'utilisation de la trichostatin A (TSA), un inhibiteur des HDACs, permet d'empêcher la répression p53 dépendante (Ho and Benchimol, 2003a). Les effets des HDACs sur l'activité de répression de p53, peuvent être expliqués par l'observation que p53 s'associe avec le complexe HDAC-mSin3a, par l'intermédiaire de mSin3a (Murphy et al., 1999a). De plus, p53 interagit avec p300/CBP, un cofacteur transcriptionnelle pouvant interagir avec les HDAC, et capable de modifier la structure de la chromatine (Grossman, 2001). P53 peut aussi affecter la compaction de la chromatine en modulant la méthylation de l'ADN. En effet, l'inactivation de p53 a été associée à une déméthylation et la réactivation de promoteurs précédemment inactivés (Ho and Benchimol, 2003a; Jackson-Grusby et al., 2001a; Nasr et al., 2003a). Cette modulation de la méthylation peut en partie être Médie par la

Répression transcriptionnelle de DNMT1, par p53, ce qui peut modifier la méthylation de l'ADN et par conséquent la structure de la chromatine (Peterson et al., 2003). Il est important de noter que les formes mutantes de p53 impliquées dans l'augmentation de la RH, sont aussi impliquées dans la perte de répression transcriptionnelle p53 dépendante (Akyuz et al., 2002a; Mekeel et al., 1997a; Saintigny et al., 1999a; Willers et al., 2000c). Les formes mutantes de p53 utilisées lors des études sur la RH sont mutées dans les domaines N-terminal, C-terminale, et riche en proline. Ces mêmes domaines jouent un rôle important dans la répression transcriptionnelle (Ho and Benchimol, 2003a).

Une seconde caractéristique de notre essai est l'orientation de la transcription du gène marqueur, l'hygromycine, et le gène rapporteur, la puromycine. Ces deux gènes sont orientés de façon convergente, minimisant ainsi l'interférence/suppression transcriptionnelle entre leurs promoteurs respectifs, et par conséquent la répression du gène de la puromycine par le gène adjacent d'hygromycine. Dans tous les essais utilisés pour étudier la RH, le marqueur de la RH était placé en séquence directe, et généralement en amont, avec un promoteur adjacent. Or, la suppression de promoteur se produit lorsqu'une unité transcriptionnelle en 3' réprime une deuxième unité transcriptionnelle située en 5' (Emerman and Temin, 1984; Emerman and Temin, 1986a; Emerman and Temin, 1986b). Les mécanismes impliqués dans la suppression de promoteur ne sont pas encore compris, mais il a été suggéré que la transcription induit des modifications dans la topologie de l'ADN : un super enroulement négatif de l'ADN en amont du promoteur et un super enroulement positif en aval du promoteur, ce qui entraîne la modification de la chromatine environnante et prévient à la machinerie transcriptionnelle l'accès aux promoteurs adjacent (Villemure et al., 2001a; Wu et al., 1988). Cette modification de la chromatine est dépendante des HDAC puisqu'il y a une réactivation des promoteurs environnants en présence de TSA (Villemure et al., 2001a). Or, p53 reconnaît certaines structures

particulières de l'ADN tel que l'ADN surenroulé, p53 pourrait donc influencer sur l'interférence transcriptionnelle en permettant le recrutement des HDAC aux sites d'interférences. Ceci peut affecter la RH par trois mécanismes différents. En premier lieu, la structure de la chromatine sur le promoteur en amont peut influencer la RH en modulant la transcription du gène marqueur, en l'occurrence la puromycine. En deuxième lieu, une chromatine plus compacte sur le gène rapporteur peut prévenir l'appariement homologue entre deux séquences, et prévenir la RH (Aguilera et al., 2000; Kotani and Kmiec, 1994; Kotani et al., 1994; Muniyappa et al., 1991; Ramdas et al., 1991). Troisièmement, une structure plus compacte de la chromatine protège l'ADN contre des agents susceptibles d'endommager celle-ci (Khanna and Jackson, 2001a).

Les évidences indiquant un rôle pour p53 dans le contrôle de la chromatine ne se limitent toutefois pas à des modifications locales. Certaines études impliquent p53 dans le maintien de la chromatine globale. En effet, l'inactivation de p53, l'expression de la protéine HPV16-E6 ou d'un dominant négatif, induit la relaxation de la chromatine, tel que démontré par une sensibilité accrue de l'ADN aux nucléases micrococcale (Smith et al., 1998a). Un mécanisme par lequel la perte de la fonction de p53 peut induire une telle relaxation est la capacité de p53 à s'associer avec des éléments de la matrice nucléaire, notamment les « matrix attachment regions » (MARs) (Jiang et al., 2001; Okorokov et al., 2002a; Smith et al., 1998a). Les formes mutantes de p53 peuvent aussi s'associer aux MARs, probablement due à un gain de fonction de p53 (Deppert, 1996; Deppert et al., 2000). La forme mutante de p53 peut aussi induire une augmentation de la phosphorylation des histones H1 (Taylor et al., 1995a). D'autre part, il est possible que la structure locale de la chromatine puisse affecter la fonction de p53 comme facteur de transcription, comme remodelleur de la chromatine ou dans la réparation de l'ADN. En effet, p53 peut activer, réprimer, ou n'avoir aucun effet sur l'expression d'un gène rapporteur selon le site d'intégration de sa

séquence de reconnaissance, (Cook et al., 1999a). Ceci implique que p53 peut avoir des fonctions différentes selon le site génomique où il doit agir.

L'hypothèse, suggérant une fonction de p53 au niveau de la chromatine, est supportée par nos résultats sur la réparation des cassures double-brins. Nous avons trouvé que p53 peut n'avoir aucun effet, ou encore il peut réprimer la réparation des cassures double-brin. De plus, l'augmentation observée de la stimulation de la RH en absence de p53 n'est probablement pas due à une perte de la répression de la RH. Il se peut que dans les cellules p53 wt, l'absence d'induction de la RH soit due à une inhibition complète de la réparation par recombinaison homologue. Nous croyons cependant cette hypothèse improbable étant donné le caractère protecteur de p53 vis-à-vis la stabilité du génome, et la haute fidélité de la RH dans la réparation des cassures double-brins. Pour expliquer cette absence d'induction de la RH, nous croyons plutôt qu'il y a une absence de coupure par I-SCEI, due probablement à une structure de la chromatine empêchant l'accès de I-SCEI à sa séquence de reconnaissance. En présence de HPV16-E6, une relaxation de la chromatine donnerait alors accès à I-SCEI à son site de reconnaissance entraînant alors la CDB, permettant la stimulation de la RH. À cet effet, il a été démontré que l'absence de p53 est associée avec une augmentation des CDBs associées à des défauts de réplication (Kumari et al., 2004b). Il est à noter, qu'une autre étude semble avoir des résultats similaires aux nôtres; en présence de p53, il n'y a pas d'induction de la RH, alors qu'en absence de p53, il y a une induction significative de la RH (Akyuz et al., 2002a). Ces variations clonales dans l'inhibition de la réparation par RH montre que p53 n'est pas impliqué directement dans la suppression de la réparation des CDBs par RH. Les effets que p53 a sur la réparation des CDBs sont plutôt des conséquences indirectes d'autres activités que p53 peut avoir.

En accord avec certaines études précédentes, montrant que la seule inactivation de p53 n'est pas suffisante pour stimuler la RH ectopique et induire des réarrangements chromosomiques (Aubrecht et al., 1999; Bunz et al., 2002a; Dominguez-Bendala et al., 2003a; Willers et al., 2001a), il est donc possible que l'inhibition de la RH n'est pas due à un rôle direct de p53 dans la recombinaison, mais plutôt à une modulation de la chromatine. Ce mécanisme pourrait expliquer les divergences dans les résultats publiés, tout en tenant compte des essais utilisés. Il est intéressant de noter que les essais de recombinaison n'ayant pas détecté d'effet sur la recombinaison homologue semblent aussi, par leur structure, moins enclins à subir la suppression de promoteur. D'autres parts, en tant que facteur de remodelage de la chromatine, p53 pourrait maintenir la stabilité du génome en prévenant l'apparition de dommages à l'ADN. Une relaxation de l'ADN induite par l'inactivation p53 pourrait alors entraîner des dommages à l'ADN qui à leurs tours peuvent induire la RH et la formation de réarrangements génomiques.

Dans l'ensemble, nos résultats indiquent que p53 n'est pas impliqué dans la régulation du taux de recombinaison. Des études subséquentes sur le rôle de p53 dans la modulation de la chromatine seraient de première importance étant donné son impact potentiel sur le maintien de l'intégrité du génome, la transcription, la réparation de l'ADN, la recombinaison homologue, la carcinogenèse, et le développement de thérapie anticancéreuse. De plus, nos résultats suggèrent la prudence lors de l'utilisation d'essais de réactivation de gène pour étudier les processus de réparation de l'ADN. Les investigateurs doivent prendre en ligne de compte les effets de position, d'interférences entre promoteurs, ainsi que la transcription, lors de la conception de leurs essais. Étant donné qu'une proportion importante des protéines impliquées dans la réparation de l'ADN, est aussi impliquée dans des complexes de remodelage de la chromatine et de transcription, il est donc important de ne pas confondre les effets sur la

réparation avec d'autres effets pouvant affecter indirectement les résultats obtenus.

References

- Adler, V., Pincus, M.R., Minamoto, T., Fuchs, S.Y., Bluth, M.J., Brandt-Rauf, P.W., Friedman, F.K., Robinson, R.C., Chen, J.M., Wang, X.W., Harris, C.C. and Ronai, Z. (1997) Conformation-dependent phosphorylation of p53. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 1686-1691.
- Agarwal, M.L., Agarwal, A., Taylor, W.R., Chernova, O., Sharma, Y. and Stark, G.R. (1998) A p53-dependent S-phase checkpoint helps to protect cells from DNA damage in response to starvation for pyrimidine nucleotides. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 14775-14780.
- Aguilera, A., Chavez, S. and Malagon, F. (2000) Mitotic recombination in yeast: elements controlling its incidence. *Yeast*, **16**, 731-754.
- Ahn, J.Y., Schwarz, J.K., Piwnica-Worms, H. and Canman, C.E. (2000) Threonine 68 phosphorylation by ataxia telangiectasia mutated is required for efficient activation of Chk2 in response to ionizing radiation. *Cancer Res*, **60**, 5934-5936.
- Akyuz, N., Boehden, G.S., Susse, S., Rimek, A., Preuss, U., Scheidtmann, K.H. and Wiesmuller, L. (2002a) DNA substrate dependence of p53-mediated regulation of double-strand break repair. *Mol Cell Biol*, **22**, 6306-6317.
- Akyuz, N., Boehden, G.S., Susse, S., Rimek, A., Preuss, U., Scheidtmann, K.H. and Wiesmuller, L. (2002b) DNA substrate dependence of p53-mediated regulation of double-strand break repair. *Mol Cell Biol*, Vol. **22**, pp. 6306-6317.
- Alani, E., Lee, S., Kane, M.F., Griffith, J. and Kolodner, R.D. (1997) *Saccharomyces cerevisiae* MSH2, a mispaired base recognition protein, also recognizes Holliday junctions in DNA. *J Mol Biol*, **265**, 289-301.
- Alarcon-Vargas, D. and Ronai, Z. (2002) p53-Mdm2--the affair that never ends. *Carcinogenesis*, **23**, 541-547.
- Allison, S.J. and Milner, J. (2003) Loss of p53 Has Site-Specific Effects on Histone H3 Modification, Including Serine 10 Phosphorylation Important for Maintenance of Ploidy. *Cancer Res*, **63**, 6674-6679.
- Amundson, S.A., Do, K.T., Shahab, S., Bittner, M., Meltzer, P., Trent, J. and Fornace, A.J., Jr. (2000) Identification of potential mRNA biomarkers in

peripheral blood lymphocytes for human exposure to ionizing radiation. *Radiat Res*, **154**, 342-346.

- Aubrecht, J., Secretan, M.B., Bishop, A.J. and Schiestl, R.H. (1999) Involvement of p53 in X-ray induced intrachromosomal recombination in mice. *Carcinogenesis*, **20**, 2229-2236.
- Bakalkin, G., Selivanova, G., Yakovleva, T., Kiseleva, E., Kashuba, E., Magnusson, K.P., Szekely, L., Klein, G., Terenius, L. and Wiman, K.G. (1995) p53 binds single-stranded DNA ends through the C-terminal domain and internal DNA segments via the middle domain. *Nucleic Acids Res*, **23**, 362-369.
- Bakalkin, G., Yakovleva, T., Selivanova, G., Magnusson, K.P., Szekely, L., Kiseleva, E., Klein, G., Terenius, L. and Wiman, K.G. (1994) p53 binds single-stranded DNA ends and catalyzes DNA renaturation and strand transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 413-417.
- Baker, S.J., Preisinger, A.C., Jessup, J.M., Paraskeva, C., Markowitz, S., Willson, J.K., Hamilton, S. and Vogelstein, B. (1990) p53 gene mutations occur in combination with 17p allelic deletions as late events in colorectal tumorigenesis. *Cancer Res*, **50**, 7717-7722.
- Banin, S., Moyal, L., Shieh, S., Taya, Y., Anderson, C.W., Chessa, L., Smorodinsky, N.I., Prives, C., Reiss, Y., Shiloh, Y. and Ziv, Y. (1998) Enhanced phosphorylation of p53 by ATM in response to DNA damage. *Science*, **281**, 1674-1677.
- Baynton, K., Otterlei, M., Bjoras, M., von Kobbe, C., Bohr, V.A. and Seeberg, E. (2003) WRN interacts physically and functionally with the recombination mediator protein RAD52. *J Biol Chem*, **278**, 36476-36486.
- Belmaaza, A. and Chartrand, P. (1994) One-sided invasion events in homologous recombination at double-strand breaks. *Mutat Res*, **314**, 199-208.
- Bennett, M., Macdonald, K., Chan, S.W., Luzio, J.P., Simari, R. and Weissberg, P. (1998) Cell surface trafficking of Fas: a rapid mechanism of p53-mediated apoptosis. *Science*, **282**, 290-293.
- Bertrand, P., Rouillard, D., Boulet, A., Levalois, C., Soussi, T. and Lopez, B.S. (1997a) Increase of spontaneous intrachromosomal homologous recombination in mammalian cells expressing a mutant p53 protein. *Oncogene*, **14**, 1117-1122.
- Bertrand, P., Rouillard, D., Boulet, A., Levalois, C., Soussi, T. and Lopez, B.S. (1997b) Increase of spontaneous intrachromosomal homologous

recombination in mammalian cells expressing a mutant p53 protein. *Oncogene*, Vol. 14, pp. 1117-1122.

- Bi, W., Park, S.S., Shaw, C.J., Withers, M.A., Patel, P.I. and Lupski, J.R. (2003) Reciprocal crossovers and a positional preference for strand exchange in recombination events resulting in deletion or duplication of chromosome 17p11.2. *Am J Hum Genet*, Vol. 73, pp. 1302-1315.
- Bird, A.W., Yu, D.Y., Pray-Grant, M.G., Qiu, Q., Harmon, K.E., Megee, P.C., Grant, P.A., Smith, M.M. and Christman, M.F. (2002) Acetylation of histone H4 by Esa1 is required for DNA double-strand break repair. *Nature*, Vol. 419, pp. 411-415.
- Bischoff, F.Z., Yim, S.O., Pathak, S., Grant, G., Siciliano, M.J., Giovanella, B.C., Strong, L.C. and Tainsky, M.A. (1990) Spontaneous abnormalities in normal fibroblasts from patients with Li-Fraumeni cancer syndrome: aneuploidy and immortalization. *Cancer Res*, **50**, 7979-7984.
- Bishop, A.J., Barlow, C., Wynshaw-Boris, A.J. and Schiestl, R.H. (2000) Atm deficiency causes an increased frequency of intrachromosomal homologous recombination in mice. *Cancer Res*, Vol. 60, pp. 395-399.
- Bishop, A.J., Hollander, M.C., Kosaras, B., Sidman, R.L., Fornace, A.J., Jr. and Schiestl, R.H. (2003) Atm-, p53-, and Gadd45a-deficient mice show an increased frequency of homologous recombination at different stages during development. *Cancer Res*, **63**, 5335-5343.
- Bochar, D.A., Wang, L., Beniya, H., Kinev, A., Xue, Y., Lane, W.S., Wang, W., Kashanchi, F. and Shiekhattar, R. (2000) BRCA1 is associated with a human SWI/SNF-related complex: linking chromatin remodeling to breast cancer. *Cell*, **102**, 257-265.
- Boehden, G.S., Akyuz, N., Roemer, K. and Wiesmuller, L. (2003a) p53 mutated in the transactivation domain retains regulatory functions in homology-directed double-strand break repair. *Oncogene*, **22**, 4111-4117.
- Boehden, G.S., Akyuz, N., Roemer, K. and Wiesmuller, L. (2003b) p53 mutated in the transactivation domain retains regulatory functions in homology-directed double-strand break repair. *Oncogene*, Vol. 22, pp. 4111-4117.
- Boehden, G.S., Restle, A., Marschalek, R., Stocking, C. and Wiesmuller, L. (2004) Recombination at chromosomal sequences involved in leukemogenic rearrangements is differentially regulated by p53. *Carcinogenesis*.

- Boocock, G.R., Morrison, J.A., Popovic, M., Richards, N., Ellis, L., Durie, P.R. and Rommens, J.M. (2003) Mutations in SBDS are associated with Shwachman-Diamond syndrome. *Nat Genet*, Vol. 33, pp. 97-101.
- Bouffler, S.D., Kemp, C.J., Balmain, A. and Cox, R. (1995) Spontaneous and ionizing radiation-induced chromosomal abnormalities in p53-deficient mice. *Cancer Res*, **55**, 3883-3889.
- Brugarolas, J., Chandrasekaran, C., Gordon, J.I., Beach, D., Jacks, T. and Hannon, G.J. (1995) Radiation-induced cell cycle arrest compromised by p21 deficiency. *Nature*, **377**, 552-557.
- Buchhop, S., Gibson, M.K., Wang, X.W., Wagner, P., Sturzbecher, H.W. and Harris, C.C. (1997) Interaction of p53 with the human Rad51 protein. *Nucleic Acids Res*, **25**, 3868-3874.
- Bunz, F., Dutriax, A., Lengauer, C., Waldman, T., Zhou, S., Brown, J.P., Sedivy, J.M., Kinzler, K.W. and Vogelstein, B. (1998) Requirement for p53 and p21 to sustain G2 arrest after DNA damage. *Science*, **282**, 1497-1501.
- Bunz, F., Fauth, C., Speicher, M.R., Dutriax, A., Sedivy, J.M., Kinzler, K.W., Vogelstein, B. and Lengauer, C. (2002a) Targeted inactivation of p53 in human cells does not result in aneuploidy. *Cancer Res*, **62**, 1129-1133.
- Bunz, F., Fauth, C., Speicher, M.R., Dutriax, A., Sedivy, J.M., Kinzler, K.W., Vogelstein, B. and Lengauer, C. (2002b) Targeted inactivation of p53 in human cells does not result in aneuploidy. *Cancer Res*, Vol. 62, pp. 1129-1133.
- Canman, C.E. and Lim, D.S. (1998) The role of ATM in DNA damage responses and cancer. *Oncogene*, **17**, 3301-3308.
- Canman, C.E., Lim, D.S., Cimprich, K.A., Taya, Y., Tamai, K., Sakaguchi, K., Appella, E., Kastan, M.B. and Siliciano, J.D. (1998) Activation of the ATM kinase by ionizing radiation and phosphorylation of p53. *Science*, **281**, 1677-1679.
- Capizzi, R.L. and Jameson, J.W. (1973) A table for the estimation of the spontaneous mutation rate of cells in culture. *Mutat Res*, Vol. 17, pp. 147-148.
- Carrier, F., Georgel, P.T., Pourquier, P., Blake, M., Kontny, H.U., Antinore, M.J., Gariboldi, M., Myers, T.G., Weinstein, J.N., Pommier, Y. and Fornace, A.J., Jr. (1999) Gadd45, a p53-responsive stress protein, modifies DNA accessibility on damaged chromatin. *Mol Cell Biol*, **19**, 1673-1685.

- Carrington, M. and Cullen, M. (2004) Justified chauvinism: advances in defining meiotic recombination through sperm typing. *Trends Genet*, Vol. 20, pp. 196-205.
- Cavenee, W.K., Dryja, T.P., Phillips, R.A., Benedict, W.F., Godbout, R., Gallie, B.L., Murphree, A.L., Strong, L.C. and White, R.L. (1983) Expression of recessive alleles by chromosomal mechanisms in retinoblastoma. *Nature*, Vol. 305, pp. 779-784.
- Chan, T.A., Hermeking, H., Lengauer, C., Kinzler, K.W. and Vogelstein, B. (1999) 14-3-3Sigma is required to prevent mitotic catastrophe after DNA damage. *Nature*, **401**, 616-620.
- Chehab, N.H., Malikzay, A., Appel, M. and Halazonetis, T.D. (2000) Chk2/hCds1 functions as a DNA damage checkpoint in G(1) by stabilizing p53. *Genes Dev*, **14**, 278-288.
- Chen, C.F., Chen, P.L., Zhong, Q., Sharp, Z.D. and Lee, W.H. (1999) Expression of BRC repeats in breast cancer cells disrupts the BRCA2-Rad51 complex and leads to radiation hypersensitivity and loss of G(2)/M checkpoint control. *J Biol Chem*, **274**, 32931-32935.
- Chen, P.L., Chen, Y.M., Bookstein, R. and Lee, W.H. (1990) Genetic mechanisms of tumor suppression by the human p53 gene. *Science*, **250**, 1576-1580.
- Cho, Y., Gorina, S., Jeffrey, P.D. and Pavletich, N.P. (1994) Crystal structure of a p53 tumor suppressor-DNA complex: understanding tumorigenic mutations. *Science*, **265**, 346-355.
- Chowdary, D.R., Dermody, J.J., Jha, K.K. and Ozer, H.L. (1994) Accumulation of p53 in a mutant cell line defective in the ubiquitin pathway. *Mol Cell Biol*, **14**, 1997-2003.
- Ciechanover, A. (1998) The ubiquitin-proteasome pathway: on protein death and cell life. *Embo J*, **17**, 7151-7160.
- Cook, J.L., Zhang, Z., Alam, J. and Re, R.N. (1999a) Effects of chromosomal integration site upon p53 interactions with DNA consensus sequence homologies. *Oncogene*, **18**, 2373-2379.
- Cook, J.L., Zhang, Z., Alam, J. and Re, R.N. (1999b) Effects of chromosomal integration site upon p53 interactions with DNA consensus sequence homologies. *Oncogene*, Vol. 18, pp. 2373-2379.
- Cooper, D.M., Schimenti, K.J. and Schimenti, J.C. (1998) Factors affecting ectopic gene conversion in mice. *Mamm Genome*, **9**, 355-360.

- Coverley, D., Kenny, M.K., Munn, M., Rupp, W.D., Lane, D.P. and Wood, R.D. (1991) Requirement for the replication protein SSB in human DNA excision repair. *Nature*, **349**, 538-541.
- Cowell, I.G., Okorokov, A.L., Cutts, S.A., Padgett, K., Bell, M., Milner, J. and Austin, C.A. (2000) Human topoisomerase IIalpha and IIbeta interact with the C-terminal region of p53. *Exp Cell Res*, Vol. 255, pp. 86-94.
- Cromie, G.A., Connelly, J.C. and Leach, D.R. (2001) Recombination at double-strand breaks and DNA ends: conserved mechanisms from phage to humans. *Mol Cell*, **8**, 1163-1174.
- Davies, A.A., Masson, J.Y., McIlwraith, M.J., Stasiak, A.Z., Stasiak, A., Venkitaraman, A.R. and West, S.C. (2001) Role of BRCA2 in control of the RAD51 recombination and DNA repair protein. *Mol Cell*, **7**, 273-282.
- Deng, C., Zhang, P., Harper, J.W., Elledge, S.J. and Leder, P. (1995) Mice lacking p21CIP1/WAF1 undergo normal development, but are defective in G1 checkpoint control. *Cell*, **82**, 675-684.
- Deppert, W. (1996) Binding of MAR-DNA elements by mutant p53: possible implications for its oncogenic functions. *J Cell Biochem*, **62**, 172-180.
- Deppert, W., Gohler, T., Koga, H. and Kim, E. (2000) Mutant p53: "gain of function" through perturbation of nuclear structure and function? *J Cell Biochem Suppl*, **Suppl 35**, 115-122.
- Dobosy, J.R. and Selker, E.U. (2001) Emerging connections between DNA methylation and histone acetylation. *Cell Mol Life Sci*, Vol. 58, pp. 721-727.
- Dominguez-Bendala, J., Priddle, H., Clarke, A. and McWhir, J. (2003a) Elevated expression of exogenous Rad51 leads to identical increases in gene-targeting frequency in murine embryonic stem (ES) cells with both functional and dysfunctional p53 genes. *Experimental Cell Research*, **286**, 298-307.
- Dominguez-Bendala, J., Priddle, H., Clarke, A. and McWhir, J. (2003b) Elevated expression of exogenous Rad51 leads to identical increases in gene-targeting frequency in murine embryonic stem (ES) cells with both functional and dysfunctional p53 genes. *Exp Cell Res*, Vol. 286, pp. 298-307.
- Donehower, L.A., Harvey, M., Slagle, B.L., McArthur, M.J., Montgomery, C.A., Jr., Butel, J.S. and Bradley, A. (1992) Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. *Nature*, **356**, 215-221.

- Dorer, D.R. and Henikoff, S. (1997) Transgene repeat arrays interact with distant heterochromatin and cause silencing in cis and trans. *Genetics*, **147**, 1181-1190.
- Downs, J.A., Kosmidou, E., Morgan, A. and Jackson, S.P. (2003) Suppression of homologous recombination by the *Saccharomyces cerevisiae* linker histone. *Mol Cell*, Vol. 11, pp. 1685-1692.
- Dudenhoffer, C., Kurth, M., Janus, F., Deppert, W. and Wiesmuller, L. (1999a) Dissociation of the recombination control and the sequence-specific transactivation function of P53. *Oncogene*, **18**, 5773-5784.
- Dudenhoffer, C., Kurth, M., Janus, F., Deppert, W. and Wiesmuller, L. (1999b) Dissociation of the recombination control and the sequence-specific transactivation function of P53. *Oncogene*, Vol. 18, pp. 5773-5784.
- Dudenhoffer, C., Rohaly, G., Will, K., Deppert, W. and Wiesmuller, L. (1998) Specific mismatch recognition in heteroduplex intermediates by p53 suggests a role in fidelity control of homologous recombination. *Mol Cell Biol*, **18**, 5332-5342.
- Dutta, A., Ruppert, J.M., Aster, J.C. and Winchester, E. (1993) Inhibition of DNA replication factor RPA by p53. *Nature*, **365**, 79-82.
- el-Deiry, W.S., Tokino, T., Velculescu, V.E., Levy, D.B., Parsons, R., Trent, J.M., Lin, D., Mercer, W.E., Kinzler, K.W. and Vogelstein, B. (1993) WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell*, **75**, 817-825.
- Eliyahu, D., Michalovitz, D., Eliyahu, S., Pinhasi-Kimhi, O. and Oren, M. (1989) Wild-type p53 can inhibit oncogene-mediated focus formation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **86**, 8763-8767.
- Emerman, M. and Temin, H.M. (1984) Genes with promoters in retrovirus vectors can be independently suppressed by an epigenetic mechanism. *Cell*, **39**, 449-467.
- Emerman, M. and Temin, H.M. (1986a) Comparison of promoter suppression in avian and murine retrovirus vectors. *Nucleic Acids Res*, **14**, 9381-9396.
- Emerman, M. and Temin, H.M. (1986b) Quantitative analysis of gene suppression in integrated retrovirus vectors. *Mol Cell Biol*, **6**, 792-800.
- Eszterhas, S.K., Bouhassira, E.E., Martin, D.I. and Fiering, S. (2002a) Transcriptional interference by independently regulated genes occurs

in any relative arrangement of the genes and is influenced by chromosomal integration position. *Mol Cell Biol*, **22**, 469-479.

- Eszterhas, S.K., Bouhassira, E.E., Martin, D.I. and Fiering, S. (2002b) Transcriptional interference by independently regulated genes occurs in any relative arrangement of the genes and is influenced by chromosomal integration position. *Mol Cell Biol*, Vol. 22, pp. 469-479.
- Eyford, J.E., Thorlacius, S., Valgardsdottir, R., Gretarsdottir, S., Steinarsdottir, M. and Anamthawat-Jonsson, K. (1995) TP53 abnormalities and genetic instability in breast cancer. *Acta Oncol*, **34**, 663-667.
- Ezquieta, B., Cueva, E., Oyarzabal, M., Oliver, A., Varela, J.M. and Jariago, C. (2002) Gene conversion (655G splicing mutation) and the founder effect (Gln318Stop) contribute to the most frequent severe point mutations in congenital adrenal hyperplasia (21-hydroxylase deficiency) in the Spanish population. *Clin Genet*, Vol. 62, pp. 181-188.
- Fisher, D.E. (2001) The p53 tumor suppressor: critical regulator of life & death in cancer. *Apoptosis*, **6**, 7-15.
- Flatt, P.M., Tang, L.J., Scatena, C.D., Szak, S.T. and Pietenpol, J.A. (2000) p53 regulation of G(2) checkpoint is retinoblastoma protein dependent. *Mol Cell Biol*, **20**, 4210-4223.
- Ford, J.M. and Hanawalt, P.C. (1995) Li-Fraumeni syndrome fibroblasts homozygous for p53 mutations are deficient in global DNA repair but exhibit normal transcription-coupled repair and enhanced UV resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 8876-8880.
- Ford, J.M. and Hanawalt, P.C. (1997) Expression of wild-type p53 is required for efficient global genomic nucleotide excision repair in UV-irradiated human fibroblasts. *J Biol Chem*, **272**, 28073-28080.
- Frebourg, T. and Friend, S.H. (1992) Cancer risks from germline p53 mutations. *J Clin Invest*, **90**, 1637-1641.
- Freedman, D.A. and Levine, A.J. (1998) Nuclear export is required for degradation of endogenous p53 by MDM2 and human papillomavirus E6. *Mol Cell Biol*, **18**, 7288-7293.
- Fuchs, S.Y., Adler, V., Buschmann, T., Wu, X. and Ronai, Z. (1998a) Mdm2 association with p53 targets its ubiquitination. *Oncogene*, **17**, 2543-2547.

- Fuchs, S.Y., Adler, V., Buschmann, T., Yin, Z., Wu, X., Jones, S.N. and Ronai, Z. (1998b) JNK targets p53 ubiquitination and degradation in nonstressed cells. *Genes Dev*, **12**, 2658-2663.
- Fuchs, S.Y., Adler, V., Pincus, M.R. and Ronai, Z. (1998c) MEKK1/JNK signaling stabilizes and activates p53. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 10541-10546.
- Fukasawa, K., Wiener, F., Vande Woude, G.F. and Mai, S. (1997) Genomic instability and apoptosis are frequent in p53 deficient young mice. *Oncogene*, **15**, 1295-1302.
- Gebow, D., Miselis, N. and Liber, H.L. (2000) Homologous and nonhomologous recombination resulting in deletion: effects of p53 status, microhomology, and repetitive DNA length and orientation. *Mol Cell Biol*, Vol. 20, pp. 4028-4035.
- Gersten, K.M. and Kemp, C.J. (1997a) Normal meiotic recombination in p53-deficient mice. *Nat Genet*, **17**, 378-379.
- Gersten, K.M. and Kemp, C.J. (1997b) Normal meiotic recombination in p53-deficient mice. *Nat Genet*, Vol. 17, pp. 378-379.
- Gobert, C., Skladanowski, A. and Larsen, A.K. (1999) The interaction between p53 and DNA topoisomerase I is regulated differently in cells with wild-type and mutant p53. *Proc Natl Acad Sci U S A*, Vol. 96, pp. 10355-10360.
- Gondo, Y., Nakamura, K., Nakao, K., Sasaoka, T., Ito, K., Kimura, M. and Katsuki, M. (1994) Gene replacement of the p53 gene with the lacZ gene in mouse embryonic stem cells and mice by using two steps of homologous recombination. *Biochem Biophys Res Commun*, **202**, 830-837.
- Gostissa, M., Hengstermann, A., Fogal, V., Sandy, P., Schwarz, S.E., Scheffner, M. and Del Sal, G. (1999) Activation of p53 by conjugation to the ubiquitin-like protein SUMO-1. *Embo J*, **18**, 6462-6471.
- Gross, M., Hanenberg, H., Lobitz, S., Friedl, R., Herterich, S., Dietrich, R., Gruhn, B., Schindler, D. and Hoehn, H. (2002) Reverse mosaicism in Fanconi anemia: natural gene therapy via molecular self-correction. *Cytogenet Genome Res*, Vol. 98, pp. 126-135.
- Grossman, S.R. (2001) p300/CBP/p53 interaction and regulation of the p53 response. *Eur J Biochem*, **268**, 2773-2778.
- Gu, W. and Roeder, R.G. (1997) Activation of p53 sequence-specific DNA binding by acetylation of the p53 C-terminal domain. *Cell*, **90**, 595-606.

- Guo, Z., Kumagai, A., Wang, S.X. and Dunphy, W.G. (2000) Requirement for Atr in phosphorylation of Chk1 and cell cycle regulation in response to DNA replication blocks and UV-damaged DNA in *Xenopus* egg extracts. *Genes Dev*, **14**, 2745-2756.
- Gupta, M., Fan, S., Zhan, Q., Kohn, K.W., O'Connor, P.M. and Pommier, Y. (1997) Inactivation of p53 increases the cytotoxicity of camptothecin in human colon HCT116 and breast MCF-7 cancer cells. *Clin Cancer Res*, Vol. 3, pp. 1653-1660.
- Gurley, K.E., Vo, K. and Kemp, C.J. (1998) DNA double-strand breaks, p53, and apoptosis during lymphomagenesis in scid/scid mice. *Cancer Res*, **58**, 3111-3115.
- Haber, J.E. (2000) Partners and pathways repairing a double-strand break. *Trends Genet*, **16**, 259-264.
- Hall-Jackson, C.A., Cross, D.A., Morrice, N. and Smythe, C. (1999) ATR is a caffeine-sensitive, DNA-activated protein kinase with a substrate specificity distinct from DNA-PK. *Oncogene*, **18**, 6707-6713.
- Harper, J.W., Adami, G.R., Wei, N., Keyomarsi, K. and Elledge, S.J. (1993) The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell*, **75**, 805-816.
- Hartwell, L.H. and Kastan, M.B. (1994) Cell cycle control and cancer. *Science*, **266**, 1821-1828.
- Hartwell, L.H. and Weinert, T.A. (1989) Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. *Science*, **246**, 629-634.
- Harvey, M., Sands, A.T., Weiss, R.S., Hegi, M.E., Wiseman, R.W., Pantazis, P., Giovanella, B.C., Tainsky, M.A., Bradley, A. and Donehower, L.A. (1993) In vitro growth characteristics of embryo fibroblasts isolated from p53-deficient mice. *Oncogene*, **8**, 2457-2467.
- Hasegawa, K. and Nakatsuji, N. (2002a) Insulators prevent transcriptional interference between two promoters in a double gene construct for transgenesis. *FEBS Lett*, **520**, 47-52.
- Hasegawa, K. and Nakatsuji, N. (2002b) Insulators prevent transcriptional interference between two promoters in a double gene construct for transgenesis. *FEBS Lett*, Vol. 520, pp. 47-52.
- Haupt, Y., Maya, R., Kazaz, A. and Oren, M. (1997) Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature*, **387**, 296-299.

- Hauptschein, R.S., Gaidano, G., Rao, P.H., Scotto, L., Edwards, Y.H., Chaganti, R.S. and Dalla-Favera, R. (2000) An apparent interlocus gene conversion-like event at a putative tumor suppressor gene locus on human chromosome 6q27 in a Burkitt's lymphoma cell line. *DNA Res*, Vol. 7, pp. 261-272.
- Helleday, T. (2003) Pathways for mitotic homologous recombination in mammalian cells. *Mutat Res*, Vol. 532, pp. 103-115.
- Henry-Mowatt, J., Jackson, D., Masson, J.Y., Johnson, P.A., Clements, P.M., Benson, F.E., Thompson, L.H., Takeda, S., West, S.C. and Caldecott, K.W. (2003) XRCC3 and Rad51 modulate replication fork progression on damaged vertebrate chromosomes. *Mol Cell*, Vol. 11, pp. 1109-1117.
- Hirao, A., Cheung, A., Duncan, G., Girard, P.M., Elia, A.J., Wakeham, A., Okada, H., Sarkissian, T., Wong, J.A., Sakai, T., De Stanchina, E., Bristow, R.G., Suda, T., Lowe, S.W., Jeggo, P.A., Elledge, S.J. and Mak, T.W. (2002) Chk2 is a tumor suppressor that regulates apoptosis in both an ataxia telangiectasia mutated (ATM)-dependent and an ATM-independent manner. *Mol Cell Biol*, **22**, 6521-6532.
- Hirao, A., Kong, Y.Y., Matsuoka, S., Wakeham, A., Ruland, J., Yoshida, H., Liu, D., Elledge, S.J. and Mak, T.W. (2000) DNA damage-induced activation of p53 by the checkpoint kinase Chk2. *Science*, **287**, 1824-1827.
- Ho, J. and Benchimol, S. (2003a) Transcriptional repression mediated by the p53 tumour suppressor. *Cell Death Differ*, **10**, 404-408.
- Ho, J. and Benchimol, S. (2003b) Transcriptional repression mediated by the p53 tumour suppressor. *Cell Death Differ*, Vol. 10, pp. 404-408.
- Hollander, M.C., Kovalsky, O., Salvador, J.M., Kim, K.E., Patterson, A.D., Haines, D.C. and Fornace, A.J., Jr. (2001) Dimethylbenzanthracene carcinogenesis in Gadd45a-null mice is associated with decreased DNA repair and increased mutation frequency. *Cancer Res*, **61**, 2487-2491.
- Hollstein, M., Rice, K., Greenblatt, M.S., Soussi, T., Fuchs, R., Sorlie, T., Hovig, E., Smith-Sorensen, B., Montesano, R. and Harris, C.C. (1994) Database of p53 gene somatic mutations in human tumors and cell lines. *Nucleic Acids Res*, **22**, 3551-3555.
- Hollstein, M., Sidransky, D., Vogelstein, B. and Harris, C.C. (1991) p53 mutations in human cancers. *Science*, **253**, 49-53.

- Honda, R. and Yasuda, H. (2000) Activity of MDM2, a ubiquitin ligase, toward p53 or itself is dependent on the RING finger domain of the ligase. *Oncogene*, **19**, 1473-1476.
- Hwang, B.J., Ford, J.M., Hanawalt, P.C. and Chu, G. (1999) Expression of the p48 xeroderma pigmentosum gene is p53-dependent and is involved in global genomic repair. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 424-428.
- Innocente, S.A., Abrahamson, J.L., Cogswell, J.P. and Lee, J.M. (1999) p53 regulates a G2 checkpoint through cyclin B1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 2147-2152.
- Ip, Y.T. and Davis, R.J. (1998) Signal transduction by the c-Jun N-terminal kinase (JNK)--from inflammation to development. *Curr Opin Cell Biol*, **10**, 205-219.
- Ivanchenko, M., Zlatanova, J. and van Holde, K. (1997) Histone H1 preferentially binds to superhelical DNA molecules of higher compaction. *Biophys J*, Vol. 72, pp. 1388-1395.
- Iwamoto, K.S., Mizuno, T., Seyama, T. and Kyoizumi, S. (1999) Mutant p53: epigenetic mutator of the T-cell receptor via induction of methylation. *Mol Carcinog*, **25**, 113-121.
- Jacks, T., Remington, L., Williams, B.O., Schmitt, E.M., Halachmi, S., Bronson, R.T. and Weinberg, R.A. (1994) Tumor spectrum analysis in p53-mutant mice. *Curr Biol*, **4**, 1-7.
- Jackson, P., Bos, E. and Braithwaite, A.W. (1993) Wild-type mouse p53 down-regulates transcription from different virus enhancer/promoters. *Oncogene*, **8**, 589-597.
- Jackson-Grusby, L., Beard, C., Possemato, R., Tudor, M., Fambrough, D., Csankovszki, G., Dausman, J., Lee, P., Wilson, C., Lander, E. and Jaenisch, R. (2001a) Loss of genomic methylation causes p53-dependent apoptosis and epigenetic deregulation. *Nat Genet*, **27**, 31-39.
- Jackson-Grusby, L., Beard, C., Possemato, R., Tudor, M., Fambrough, D., Csankovszki, G., Dausman, J., Lee, P., Wilson, C., Lander, E. and Jaenisch, R. (2001b) Loss of genomic methylation causes p53-dependent apoptosis and epigenetic deregulation. *Nat Genet*, Vol. 27, pp. 31-39.
- Janus, F., Albrechtsen, N., Dornreiter, I., Wiesmuller, L., Grosse, F. and Deppert, W. (1999) The dual role model for p53 in maintaining genomic integrity. *Cell Mol Life Sci*, **55**, 12-27.

- Janz, C., Susse, S. and Wiesmuller, L. (2002a) p53 and recombination intermediates: role of tetramerization at DNA junctions in complex formation and exonucleolytic degradation. *Oncogene*, **21**, 2130-2140.
- Janz, C., Susse, S. and Wiesmuller, L. (2002b) p53 and recombination intermediates: role of tetramerization at DNA junctions in complex formation and exonucleolytic degradation. *Oncogene*, Vol. 21, pp. 2130-2140.
- Janz, C. and Wiesmuller, L. (2002) Wild-type p53 inhibits replication-associated homologous recombination. *Oncogene*, **21**, 5929-5933.
- Jeffrey, P.D., Gorina, S. and Pavletich, N.P. (1995) Crystal structure of the tetramerization domain of the p53 tumor suppressor at 1.7 angstroms. *Science*, **267**, 1498-1502.
- Jeffreys, A.J. and May, C.A. (2004) Intense and highly localized gene conversion activity in human meiotic crossover hot spots. *Nat Genet*, Vol. 36, pp. 151-156.
- Jiang, M., Axe, T., Holgate, R., Rubbi, C.P., Okorokov, A.L., Mee, T. and Milner, J. (2001) p53 binds the nuclear matrix in normal cells: binding involves the proline-rich domain of p53 and increases following genotoxic stress. *Oncogene*, **20**, 5449-5458.
- Jiang, W., Ananthaswamy, H.N., Muller, H.K. and Kripke, M.L. (1999) p53 protects against skin cancer induction by UV-B radiation. *Oncogene*, **18**, 4247-4253.
- Johnson, R.A., Ince, T.A. and Scotto, K.W. (2001) Transcriptional repression by p53 through direct binding to a novel DNA element. *J Biol Chem*, **276**, 27716-27720.
- Johnson, R.D. and Jasin, M. (2000) Sister chromatid gene conversion is a prominent double-strand break repair pathway in mammalian cells. *EMBO J.*, **19**, 3398-3407.
- Jonkman, M.F., Scheffer, H., Stulp, R., Pas, H.H., Nijenhuis, M., Heeres, K., Owaribe, K., Pulkkinen, L. and Uitto, J. (1997) Revertant mosaicism in epidermolysis bullosa caused by mitotic gene conversion. *Cell*, Vol. 88, pp. 543-551.
- Karow, J.K., Constantinou, A., Li, J.L., West, S.C. and Hickson, I.D. (2000) The Bloom's syndrome gene product promotes branch migration of holliday junctions. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 6504-6508.
- Karran, P. (2000) DNA double strand break repair in mammalian cells. *Curr Opin Genet Dev*, **10**, 144-150.

- Kastan, M.B., Lim, D.S., Kim, S.T., Xu, B. and Canman, C. (2000) Multiple signaling pathways involving ATM. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, **65**, 521-526.
- Khanna, K.K. and Jackson, S.P. (2001a) DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. *Nat Genet*, **27**, 247-254.
- Khanna, K.K. and Jackson, S.P. (2001b) DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. *Nat Genet*, Vol. 27, pp. 247-254.
- Kim, E. and Deppert, W. (2003) The complex interactions of p53 with target DNA: we learn as we go. *Biochem Cell Biol*, Vol. 81, pp. 141-150.
- Knudson, A.G., Jr. (1971) Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **68**, 820-823.
- Ko, L.J. and Prives, C. (1996) p53: puzzle and paradigm. *Genes Dev*, **10**, 1054-1072.
- Kotani, H. and Kmiec, E.B. (1994) Transcription activates RecA-promoted homologous pairing of nucleosomal DNA. *Mol Cell Biol*, **14**, 1949-1955.
- Kotani, H., Sekiguchi, J.M., Dutta, S. and Kmiec, E.B. (1994) Genetic recombination of nucleosomal templates is mediated by transcription. *Mol Gen Genet*, **244**, 410-419.
- Kubbutat, M.H., Jones, S.N. and Vousden, K.H. (1997) Regulation of p53 stability by Mdm2. *Nature*, **387**, 299-303.
- Kubbutat, M.H., Ludwig, R.L., Ashcroft, M. and Vousden, K.H. (1998) Regulation of Mdm2-directed degradation by the C terminus of p53. *Mol Cell Biol*, **18**, 5690-5698.
- Kumari, A., Schultz, N. and Helleday, T. (2004a) p53 protects from replication-associated DNA double-strand breaks in mammalian cells. *Oncogene*, Vol. 23, pp. 2324-2329.
- Kumari, A., Schultz, N. and Helleday, T. (2004b) p53 protects from replication-associated DNA double-strand breaks in mammalian cells. *Oncogene*, **23**, 2324-2329.
- Kumari, S.R., Mendoza-Alvarez, H. and Alvarez-Gonzalez, R. (1998) Functional interactions of p53 with poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) during apoptosis following DNA damage: covalent poly(ADP-ribosylation) of p53 by exogenous PARP and noncovalent binding of

p53 to the M(r) 85,000 proteolytic fragment. *Cancer Res*, **58**, 5075-5078.

Labuda, D., Zietkiewicz, and Mitchell, G.A. (1995) Alu elements as a source of genomic variation: deleterious and evolutionary novelties. In Maraia, J.R. (ed.), *The impact of short interspersed elements (SINEs) on the host genome*. R.G. Landes company, Austin, pp. 1-24.

Lakin, N.D. and Jackson, S.P. (1999) Regulation of p53 in response to DNA damage. *Oncogene*, **18**, 7644-7655.

Lane, D.P. and Crawford, L.V. (1979) T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. *Nature*, **278**, 261-263.

Lane, D.P., Lu, X., Hupp, T. and Hall, P.A. (1994) The role of the p53 protein in the apoptotic response. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, **345**, 277-280.

Lavigueur, A., Maltby, V., Mock, D., Rossant, J., Pawson, T. and Bernstein, A. (1989) High incidence of lung, bone, and lymphoid tumors in transgenic mice overexpressing mutant alleles of the p53 oncogene. *Mol Cell Biol*, **9**, 3982-3991.

Lavin, M.F. and Shiloh, Y. (1996) Ataxia-telangiectasia: a multifaceted genetic disorder associated with defective signal transduction. *Curr Opin Immunol*, **8**, 459-464.

Lee, J.M., Abrahamson, J.L., Kandel, R., Donehower, L.A. and Bernstein, A. (1994) Susceptibility to radiation-carcinogenesis and accumulation of chromosomal breakage in p53 deficient mice. *Oncogene*, **9**, 3731-3736.

Lee, S., Cavallo, L. and Griffith, J. (1997) Human p53 binds Holliday junctions strongly and facilitates their cleavage. *J Biol Chem*, **272**, 7532-7539.

Lee, S., Elenbaas, B., Levine, A. and Griffith, J. (1995) p53 and its 14 kDa C-terminal domain recognize primary DNA damage in the form of insertion/deletion mismatches. *Cell*, **81**, 1013-1020.

Levine, A.J. (1997a) p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell*, **88**, 323-331.

Levine, A.J. (1997b) p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell*, Vol. 88, pp. 323-331.

Li, B. and Comai, L. (2002) Displacement of DNA-PKcs from DNA ends by the Werner syndrome protein. *Nucleic Acids Res*, **30**, 3653-3661.

- Li, G., Tron, V. and Ho, V. (1998) Induction of squamous cell carcinoma in p53-deficient mice after ultraviolet irradiation. *J Invest Dermatol*, **110**, 72-75.
- Liang, L., Shao, C., Deng, L., Mendonca, M.S., Stambrook, P.J. and Tischfield, J.A. (2002) Radiation-induced genetic instability in vivo depends on p53 status. *Mutat Res*, **502**, 69-80.
- Lieber, M.R., Ma, Y., Pannicke, U. and Schwarz, K. (2003) Mechanism and regulation of human non-homologous DNA end-joining. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **4**, 712-720.
- Liefshitz, B., Parket, A., Maya, R. and Kupiec, M. (1995) The role of DNA repair genes in recombination between repeated sequences in yeast. *Genetics*, **140**, 1199-1211.
- Linke, S.P., Sengupta, S., Khabie, N., Jeffries, B.A., Buchhop, S., Miska, S., Henning, W., Pedoux, R., Wang, X.W., Hofseth, L.J., Yang, Q., Garfield, S.H., Sturzbecher, H.W. and Harris, C.C. (2003) p53 interacts with hRAD51 and hRAD54, and directly modulates homologous recombination. *Cancer Res*, **63**, 2596-2605.
- Linzer, D.I. and Levine, A.J. (1979) Characterization of a 54K dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells. *Cell*, **17**, 43-52.
- Liu, L., Scolnick, D.M., Trievel, R.C., Zhang, H.B., Marmorstein, R., Halazonetis, T.D. and Berger, S.L. (1999) p53 sites acetylated in vitro by PCAF and p300 are acetylated in vivo in response to DNA damage. *Mol Cell Biol*, **19**, 1202-1209.
- Liu, Q., Guntuku, S., Cui, X.S., Matsuoka, S., Cortez, D., Tamai, K., Luo, G., Carattini-Rivera, S., DeMayo, F., Bradley, A., Donehower, L.A. and Elledge, S.J. (2000) Chk1 is an essential kinase that is regulated by Atr and required for the G(2)/M DNA damage checkpoint. *Genes Dev*, **14**, 1448-1459.
- Livingstone, L.R., White, A., Sprouse, J., Livanos, E., Jacks, T. and Tlsty, T.D. (1992) Altered cell cycle arrest and gene amplification potential accompany loss of wild-type p53. *Cell*, **70**, 923-935.
- Lomonosov, M., Anand, S., Sangrithi, M., Davies, R. and Venkitaraman, A.R. (2003) Stabilization of stalled DNA replication forks by the BRCA2 breast cancer susceptibility protein. *Genes Dev*, Vol. 17, pp. 3017-3022.

- Lopes, U.G., Erhardt, P., Yao, R. and Cooper, G.M. (1997) p53-dependent induction of apoptosis by proteasome inhibitors. *J Biol Chem*, **272**, 12893-12896.
- Lozano, G. and Elledge, S.J. (2000) p53 sends nucleotides to repair DNA. *Nature*, **404**, 24-25.
- Lu, X., Lozano, G. and Donehower, L.A. (2003a) Activities of wildtype and mutant p53 in suppression of homologous recombination as measured by a retroviral vector system. *Mutat Res*, **522**, 69-83.
- Lu, X., Lozano, G. and Donehower, L.A. (2003b) Activities of wildtype and mutant p53 in suppression of homologous recombination as measured by a retroviral vector system. *Mutat Res*, Vol. 522, pp. 69-83.
- Macleod, K. (2000) Tumor suppressor genes. *Curr Opin Genet Dev*, **10**, 81-93.
- Maki, C.G., Huijbrechtse, J.M. and Howley, P.M. (1996) In vivo ubiquitination and proteasome-mediated degradation of p53(1). *Cancer Res*, **56**, 2649-2654.
- Malkin, D., Li, F.P., Strong, L.C., Fraumeni, J.F., Jr., Nelson, C.E., Kim, D.H., Kassel, J., Gryka, M.A., Bischoff, F.Z., Tainsky, M.A. and et al. (1990) Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms. *Science*, **250**, 1233-1238.
- Maloisel, L. and Rossignol, J.L. (1998) Suppression of crossing-over by DNA methylation in *Ascomobolus*. *Genes Dev*, Vol. 12, pp. 1381-1389.
- Marmorstein, L.Y., Ouchi, T. and Aaronson, S.A. (1998) The BRCA2 gene product functionally interacts with p53 and RAD51. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 13869-13874.
- Marsischky, G.T., Lee, S., Griffith, J. and Kolodner, R.D. (1999) 'Saccharomyces cerevisiae MSH2/6 complex interacts with Holliday junctions and facilitates their cleavage by phage resolution enzymes. *J Biol Chem*, **274**, 7200-7206.
- Matsuoka, S., Huang, M. and Elledge, S.J. (1998) Linkage of ATM to cell cycle regulation by the Chk2 protein kinase. *Science*, **282**, 1893-1897.
- Matsuoka, S., Rotman, G., Ogawa, A., Shiloh, Y., Tamai, K. and Elledge, S.J. (2000) Ataxia telangiectasia-mutated phosphorylates Chk2 in vivo and in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 10389-10394.
- Mazzei, R., Gambardella, A., Conforti, F.L., Magariello, A., Patitucci, A., Gabriele, A.L., Sprovieri, T., Labate, A., Valentino, P., Bono, F.,

- Bonavita, S., Zappia, M., Muglia, M. and Quattrone, A. (2004) Gene conversion events in adult-onset spinal muscular atrophy. *Acta Neurol Scand*, Vol. 109, pp. 151-154.
- Meek, D.W. (1998) Multisite phosphorylation and the integration of stress signals at p53. *Cell Signal*, **10**, 159-166.
- Mekeel, K.L., Tang, W., Kachnic, L.A., Luo, C.M., DeFrank, J.S. and Powell, S.N. (1997a) Inactivation of p53 results in high rates of homologous recombination. *Oncogene*, **14**, 1847-1857.
- Mekeel, K.L., Tang, W., Kachnic, L.A., Luo, C.M., DeFrank, J.S. and Powell, S.N. (1997b) Inactivation of p53 results in high rates of homologous recombination. *Oncogene*, Vol. 14, pp. 1847-1857.
- Melchionna, R., Chen, X.B., Blasina, A. and McGowan, C.H. (2000) Threonine 68 is required for radiation-induced phosphorylation and activation of Cds1. *Nat Cell Biol*, **2**, 762-765.
- Mihara, M., Erster, S., Zaika, A., Petrenko, O., Chittenden, T., Pancoska, P. and Moll, U.M. (2003) p53 has a direct apoptogenic role at the mitochondria. *Mol Cell*, **11**, 577-590.
- Modrich, P. and Lahue, R. (1996) Mismatch repair in replication fidelity, genetic recombination, and cancer biology. *Annu Rev Biochem*, **65**, 101-133.
- Morrison, C., Vagnarelli, P., Sonoda, E., Takeda, S. and Earnshaw, W.C. (2003) Sister chromatid cohesion and genome stability in vertebrate cells. *Biochem Soc Trans*, **31**, 263-265.
- Moynahan, M.E., Chiu, J.W., Koller, B.H. and Jasin, M. (1999) Brca1 controls homology-directed DNA repair. *Mol Cell*, **4**, 511-518.
- Moynahan, M.E., Pierce, A.J. and Jasin, M. (2001) BRCA2 is required for homology-directed repair of chromosomal breaks. *Mol Cell*, **7**, 263-272.
- Muller, S., Berger, M., Lehembre, F., Seeler, J.S., Haupt, Y. and Dejean, A. (2000) c-Jun and p53 activity is modulated by SUMO-1 modification. *J Biol Chem*, **275**, 13321-13329.
- Mummenbrauer, T., Janus, F., Muller, B., Wiesmuller, L., Deppert, W. and Grosse, F. (1996) p53 Protein exhibits 3'-to-5' exonuclease activity. *Cell*, **85**, 1089-1099.
- Muniyappa, K., Ramdas, J., Mythili, E. and Galande, S. (1991) Homologous pairing between nucleosome cores on a linear duplex DNA and

nucleoprotein filaments of RecA protein-single stranded DNA. *Biochimie*, **73**, 187-190.

- Murphy, M., Ahn, J., Walker, K.K., Hoffman, W.H., Evans, R.M., Levine, A.J. and George, D.L. (1999a) Transcriptional repression by wild-type p53 utilizes histone deacetylases, mediated by interaction with mSin3a. *Genes Dev*, **13**, 2490-2501.
- Murphy, M., Ahn, J., Walker, K.K., Hoffman, W.H., Evans, R.M., Levine, A.J. and George, D.L. (1999b) Transcriptional repression by wild-type p53 utilizes histone deacetylases, mediated by interaction with mSin3a. *Genes Dev*, Vol. 13, pp. 2490-2501.
- Nasr, A.F., Nutini, M., Palombo, B., Guerra, E. and Alberti, S. (2003a) Mutations of TP53 induce loss of DNA methylation and amplification of the TROP1 gene. *Oncogene*, **22**, 1668-1677.
- Nasr, A.F., Nutini, M., Palombo, B., Guerra, E. and Alberti, S. (2003b) Mutations of TP53 induce loss of DNA methylation and amplification of the TROP1 gene. *Oncogene*, Vol. 22, pp. 1668-1677.
- Ng, H.H. and Bird, A. (1999) DNA methylation and chromatin modification. *Curr Opin Genet Dev*, Vol. 9, pp. 158-163.
- Nickoloff, J.A. (1992) Transcription enhances intrachromosomal homologous recombination in mammalian cells. *Mol Cell Biol*, **12**, 5311-5318.
- Nickoloff, J.A. and Reynolds, R.J. (1990) Transcription stimulates homologous recombination in mammalian cells. *Mol Cell Biol*, **10**, 4837-4845.
- Nicolaidis, P. and Petersen, M.B. (1998) Origin and mechanisms of non-disjunction in human autosomal trisomies. *Hum Reprod*, Vol. 13, pp. 313-319.
- Offer, H., Milyavsky, M., Erez, N., Matas, D., Zurer, I., Harris, C.C. and Rotter, V. (2001a) Structural and functional involvement of p53 in BER in vitro and in vivo. *Oncogene*, **20**, 581-589.
- Offer, H., Zurer, I., Banfalvi, G., Reha'k, M., Falcovitz, A., Milyavsky, M., Goldfinger, N. and Rotter, V. (2001b) p53 modulates base excision repair activity in a cell cycle-specific manner after genotoxic stress. *Cancer Res*, **61**, 88-96.
- Ogden, S.K., Lee, K.C., Wernke-Dollries, K., Stratton, S.A., Aronow, B. and Barton, M.C. (2001a) p53 targets chromatin structure alteration to repress alpha-fetoprotein gene expression. *J Biol Chem*, **276**, 42057-42062.

- Ogden, S.K., Lee, K.C., Wernke-Dollries, K., Stratton, S.A., Aronow, B. and Barton, M.C. (2001b) p53 targets chromatin structure alteration to repress alpha-fetoprotein gene expression. *J Biol Chem*, Vol. 276, pp. 42057-42062.
- Okorokov, A.L., Rubbi, C.P., Metcalfe, S. and Milner, J. (2002a) The interaction of p53 with the nuclear matrix is mediated by F-actin and modulated by DNA damage. *Oncogene*, **21**, 356-367.
- Okorokov, A.L., Rubbi, C.P., Metcalfe, S. and Milner, J. (2002b) The interaction of p53 with the nuclear matrix is mediated by F-actin and modulated by DNA damage. *Oncogene*, Vol. 21, pp. 356-367.
- Onclercq-Delic, R., Calsou, P., Delteil, C., Salles, B., Papadopoulo, D. and Amor-Gueret, M. (2003) Possible anti-recombinogenic role of Bloom's syndrome helicase in double-strand break processing. *Nucleic Acids Res*, **31**, 6272-6282.
- Oren, M. (2003) Decision making by p53: life, death and cancer. *Cell Death Differ*, **10**, 431-442.
- Paulovich, A.G., Toczyski, D.P. and Hartwell, L.H. (1997) When checkpoints fail. *Cell*, **88**, 315-321.
- Peterson, E.J., Bogler, O. and Taylor, S.M. (2003) p53-mediated repression of DNA methyltransferase 1 expression by specific DNA binding. *Cancer Res*, **63**, 6579-6582.
- Prabhu, V.P., Simons, A.M., Iwasaki, H., Gai, D., Simmons, D.T. and Chen, J. (2002) p53 blocks RuvAB promoted branch migration and modulates resolution of Holliday junctions by RuvC. *J Mol Biol*, **316**, 1023-1032.
- Prado, F., Cortes-Ledesma, F., Huertas, P. and Aguilera, A. (2003) Mitotic recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet*, Vol. 42, pp. 185-198.
- Purdie, C.A., Harrison, D.J., Peter, A., Dobbie, L., White, S., Howie, S.E., Salter, D.M., Bird, C.C., Wyllie, A.H., Hooper, M.L. and et al. (1994) Tumour incidence, spectrum and ploidy in mice with a large deletion in the p53 gene. *Oncogene*, **9**, 603-609.
- Ramdas, J., Mythili, E. and Muniyappa, K. (1991) Nucleosomes on linear duplex DNA allow homologous pairing but prevent strand exchange promoted by RecA protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**, 1344-1348.
- Robles, A.I., Linke, S.P. and Harris, C.C. (2002) The p53 network in lung carcinogenesis. *Oncogene*, **21**, 6898-6907.

- Rodriguez, M.S., Desterro, J.M., Lain, S., Midgley, C.A., Lane, D.P. and Hay, R.T. (1999) SUMO-1 modification activates the transcriptional response of p53. *Embo J*, **18**, 6455-6461.
- Roth, J., Dobbstein, M., Freedman, D.A., Shenk, T. and Levine, A.J. (1998) Nucleo-cytoplasmic shuttling of the hdm2 oncoprotein regulates the levels of the p53 protein via a pathway used by the human immunodeficiency virus rev protein. *Embo J*, **17**, 554-564.
- Rubbi, C.P. and Milner, J. (2003a) p53 is a chromatin accessibility factor for nucleotide excision repair of DNA damage. *EMBO J.*, **22**, 975-986.
- Rubbi, C.P. and Milner, J. (2003b) p53 is a chromatin accessibility factor for nucleotide excision repair of DNA damage. *Embo J*, Vol. 22, pp. 975-986.
- Saintigny, Y. and Lopez, B.S. (2002) Homologous recombination induced by replication inhibition, is stimulated by expression of mutant p53. *Oncogene*, **21**, 488-492.
- Saintigny, Y., Makienko, K., Swanson, C., Emond, M.J. and Monnat, R.J., Jr. (2002) Homologous recombination resolution defect in werner syndrome. *Mol Cell Biol*, **22**, 6971-6978.
- Saintigny, Y., Rouillard, D., Chaput, B., Soussi, T. and Lopez, B.S. (1999a) Mutant p53 proteins stimulate spontaneous and radiation-induced intrachromosomal homologous recombination independently of the alteration of the transactivation activity and of the G1 checkpoint. *Oncogene*, **18**, 3553-3563.
- Saintigny, Y., Rouillard, D., Chaput, B., Soussi, T. and Lopez, B.S. (1999b) Mutant p53 proteins stimulate spontaneous and radiation-induced intrachromosomal homologous recombination independently of the alteration of the transactivation activity and of the G1 checkpoint. *Oncogene*, Vol. 18, pp. 3553-3563.
- Sakaguchi, K., Herrera, J.E., Saito, S., Miki, T., Bustin, M., Vassilev, A., Anderson, C.W. and Appella, E. (1998) DNA damage activates p53 through a phosphorylation-acetylation cascade. *Genes Dev*, **12**, 2831-2841.
- Sakaguchi, K., Saito, S., Higashimoto, Y., Roy, S., Anderson, C.W. and Appella, E. (2000) Damage-mediated phosphorylation of human p53 threonine 18 through a cascade mediated by a casein 1-like kinase. Effect on Mdm2 binding. *J Biol Chem*, **275**, 9278-9283.

- Scheffner, M., Werness, B.A., Huibregtse, J.M., Levine, A.J. and Howley, P.M. (1990) The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell*, **63**, 1129-1136.
- Scully, R., Anderson, S.F., Chao, D.M., Wei, W., Ye, L., Young, R.A., Livingston, D.M. and Parvin, J.D. (1997) BRCA1 is a component of the RNA polymerase II holoenzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 5605-5610.
- Scully, R. and Livingston, D.M. (2000) In search of the tumour-suppressor functions of BRCA1 and BRCA2. *Nature*, **408**, 429-432.
- Seeberg, E., Eide, L. and Bjoras, M. (1995) The base excision repair pathway. *Trends Biochem Sci*, **20**, 391-397.
- Sengupta, S., Linke, S.P., Pedoux, R., Yang, Q., Farnsworth, J., Garfield, S.H., Valerie, K., Shay, J.W., Ellis, N.A., Wasylyk, B. and Harris, C.C. (2003a) BLM helicase-dependent transport of p53 to sites of stalled DNA replication forks modulates homologous recombination. *Embo J*, **22**, 1210-1222.
- Sengupta, S., Linke, S.P., Pedoux, R., Yang, Q., Farnsworth, J., Garfield, S.H., Valerie, K., Shay, J.W., Ellis, N.A., Wasylyk, B. and Harris, C.C. (2003b) BLM helicase-dependent transport of p53 to sites of stalled DNA replication forks modulates homologous recombination. *Embo J*, Vol. 22, pp. 1210-1222.
- Shao, C., Deng, L., Henegariu, O., Liang, L., Stambrook, P.J. and Tischfield, J.A. (2000) Chromosome instability contributes to loss of heterozygosity in mice lacking p53. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 7405-7410.
- Sherr, C.J. and Roberts, J.M. (1995) Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases. *Genes Dev*, **9**, 1149-1163.
- Shieh, S.Y., Ahn, J., Tamai, K., Taya, Y. and Prives, C. (2000) The human homologs of checkpoint kinases Chk1 and Cds1 (Chk2) phosphorylate p53 at multiple DNA damage-inducible sites. *Genes Dev*, **14**, 289-300.
- Shieh, S.Y., Ikeda, M., Taya, Y. and Prives, C. (1997) DNA damage-induced phosphorylation of p53 alleviates inhibition by MDM2. *Cell*, **91**, 325-334.
- Shieh, S.Y., Taya, Y. and Prives, C. (1999) DNA damage-inducible phosphorylation of p53 at N-terminal sites including a novel site, Ser20, requires tetramerization. *Embo J*, **18**, 1815-1823.

- Shimura, T., Inoue, M., Taga, M., Shiraishi, K., Uematsu, N., Takei, N., Yuan, Z.M., Shinohara, T. and Niwa, O. (2002a) p53-dependent S-phase damage checkpoint and pronuclear cross talk in mouse zygotes with X-irradiated sperm. *Mol Cell Biol*, **22**, 2220-2228.
- Shimura, T., Toyoshima, M., Taga, M., Shiraishi, K., Uematsu, N., Inoue, M. and Niwa, O. (2002b) The novel surveillance mechanism of the Trp53-dependent s-phase checkpoint ensures chromosome damage repair and preimplantation-stage development of mouse embryos fertilized with x-irradiated sperm. *Radiat Res*, **158**, 735-742.
- Siliciano, J.D., Canman, C.E., Taya, Y., Sakaguchi, K., Appella, E. and Kastan, M.B. (1997) DNA damage induces phosphorylation of the amino terminus of p53. *Genes Dev*, **11**, 3471-3481.
- Sionov, R.V. and Haupt, Y. (1999) The cellular response to p53: the decision between life and death. *Oncogene*, **18**, 6145-6157.
- Skalski, V., Lin, Z.Y., Choi, B.Y. and Brown, K.R. (2000) Substrate specificity of the p53-associated 3'-5' exonuclease. *Oncogene*, **19**, 3321-3329.
- Slebos, R.J. and Taylor, J.A. (2001) A novel host cell reactivation assay to assess homologous recombination capacity in human cancer cell lines. *Biochem Biophys Res Commun*, **281**, 212-219.
- Smith, M.L., Bortnick, R.A., Sheikh, M.S. and Fornace, A.J., Jr. (1998a) Chromatin relaxation by overexpression of mutant p53, HPV16-E6, or cyclin G transgenes. *Exp Cell Res*, **242**, 235-243.
- Smith, M.L., Bortnick, R.A., Sheikh, M.S. and Fornace, A.J., Jr. (1998b) Chromatin relaxation by overexpression of mutant p53, HPV16-E6, or cyclin G transgenes. *Exp Cell Res*, Vol. 242, pp. 235-243.
- Smith, M.L., Chen, I.T., Zhan, Q., O'Connor, P.M. and Fornace, A.J., Jr. (1995) Involvement of the p53 tumor suppressor in repair of u.v.-type DNA damage. *Oncogene*, **10**, 1053-1059.
- Smith, M.L., Ford, J.M., Hollander, M.C., Bortnick, R.A., Amundson, S.A., Seo, Y.R., Deng, C.X., Hanawalt, P.C. and Fornace, A.J., Jr. (2000) p53-mediated DNA repair responses to UV radiation: studies of mouse cells lacking p53, p21, and/or gadd45 genes. *Mol Cell Biol*, **20**, 3705-3714.
- Smith, N.D., Rubenstein, J.N., Eggener, S.E. and Kozlowski, J.M. (2003) The p53 tumor suppressor gene and nuclear protein: basic science review and relevance in the management of bladder cancer. *J Urol*, **169**, 1219-1228.

- Snouwaert, J.N., Gowen, L.C., Latour, A.M., Mohn, A.R., Xiao, A., DiBiase, L. and Koller, B.H. (1999) BRCA1 deficient embryonic stem cells display a decreased homologous recombination frequency and an increased frequency of non-homologous recombination that is corrected by expression of a brca1 transgene. *Oncogene*, **18**, 7900-7907.
- Song, S., Gulliver, G.A. and Lambert, P.F. (1998) Human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncogenes abrogate radiation-induced DNA damage responses in vivo through p53-dependent and p53-independent pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 2290-2295.
- Sonoda, E., Takata, M., Yamashita, Y.M., Morrison, C. and Takeda, S. (2001) Homologous DNA recombination in vertebrate cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 8388-8394.
- Sturzbecher, H.W., Donzelmann, B., Henning, W., Knippschild, U. and Buchhop, S. (1996a) p53 is linked directly to homologous recombination processes via RAD51/RecA protein interaction. *Embo J*, **15**, 1992-2002.
- Sturzbecher, H.W., Donzelmann, B., Henning, W., Knippschild, U. and Buchhop, S. (1996b) p53 is linked directly to homologous recombination processes via RAD51/RecA protein interaction. *Embo J*, Vol. 15, pp. 1992-2002.
- Subler, M.A., Martin, D.W. and Deb, S. (1992a) Inhibition of viral and cellular promoters by human wild-type p53. *J Virol*, **66**, 4757-4762.
- Subler, M.A., Martin, D.W. and Deb, S. (1992b) Inhibition of viral and cellular promoters by human wild-type p53. *J Virol*, Vol. 66, pp. 4757-4762.
- Subramanian, D. and Griffith, J.D. (2002) Interactions between p53, hMSH2-hMSH6 and HMG I(Y) on Holliday junctions and bulged bases. *Nucl. Acids. Res.*, **30**, 2427-2434.
- Susse, S., Janz, C., Janus, F., Deppert, W. and Wiesmuller, L. (2000a) Role of heteroduplex joints in the functional interactions between human Rad51 and wild-type p53. *Oncogene*, **19**, 4500-4512.
- Susse, S., Janz, C., Janus, F., Deppert, W. and Wiesmuller, L. (2000b) Role of heteroduplex joints in the functional interactions between human Rad51 and wild-type p53. *Oncogene*, Vol. 19, pp. 4500-4512.
- Tayebi, N., Stubblefield, B.K., Park, J.K., Orvisky, E., Walker, J.M., LaMarca, M.E. and Sidransky, E. (2003) Reciprocal and nonreciprocal recombination at the glucocerebrosidase gene region: implications for complexity in Gaucher disease. *Am J Hum Genet*, Vol. 72, pp. 519-534.

- Taylor, W.R., Chadee, D.N., Allis, C.D., Wright, J.A. and Davie, J.R. (1995a) Fibroblasts transformed by combinations of ras, myc and mutant p53 exhibit increased phosphorylation of histone H1 that is independent of metastatic potential. *FEBS Letters*, **377**, 51-53.
- Taylor, W.R., Chadee, D.N., Allis, C.D., Wright, J.A. and Davie, J.R. (1995b) Fibroblasts transformed by combinations of ras, myc and mutant p53 exhibit increased phosphorylation of histone H1 that is independent of metastatic potential. *FEBS Lett*, Vol. 377, pp. 51-53.
- Taylor, W.R., DePrimo, S.E., Agarwal, A., Agarwal, M.L., Schonthal, A.H., Katula, K.S. and Stark, G.R. (1999) Mechanisms of G2 arrest in response to overexpression of p53. *Mol Biol Cell*, **10**, 3607-3622.
- Therrien, J.P., Drouin, R., Baril, C. and Drobetsky, E.A. (1999) Human cells compromised for p53 function exhibit defective global and transcription-coupled nucleotide excision repair, whereas cells compromised for pRb function are defective only in global repair. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 15038-15043.
- Thomas, B.J. and Rothstein, R. (1989) Elevated recombination rates in transcriptionally active DNA. *Cell*, **56**, 619-630.
- Thompson, L.H. and Schild, D. (2002) Recombinational DNA repair and human disease. *Mutat Res*, Vol. 509, pp. 49-78.
- Tibbetts, R.S., Brumbaugh, K.M., Williams, J.M., Sarkaria, J.N., Cliby, W.A., Shieh, S.Y., Taya, Y., Prives, C. and Abraham, R.T. (1999) A role for ATR in the DNA damage-induced phosphorylation of p53. *Genes Dev*, **13**, 152-157.
- Traverso, G., Bettegowda, C., Kraus, J., Speicher, M.R., Kinzler, K.W., Vogelstein, B. and Lengauer, C. (2003) Hyper-recombination and genetic instability in BLM-deficient epithelial cells. *Cancer Res*, Vol. 63, pp. 8578-8581.
- Tutt, A., Bertwistle, D., Valentine, J., Gabriel, A., Swift, S., Ross, G., Griffin, C., Thacker, J. and Ashworth, A. (2001) Mutation in Brca2 stimulates error-prone homology-directed repair of DNA double-strand breaks occurring between repeated sequences. *Embo J*, **20**, 4704-4716.
- van Brabant, A.J., Ye, T., Sanz, M., German, I.J., Ellis, N.A. and Holloman, W.K. (2000) Binding and melting of D-loops by the Bloom syndrome helicase. *Biochemistry*, **39**, 14617-14625.
- van Gent, D.C., Hoeijmakers, J.H. and Kanaar, R. (2001a) Chromosomal stability and the DNA double-stranded break connection. *Nat Rev Genet*, **2**, 196-206.

- van Gent, D.C., Hoeijmakers, J.H. and Kanaar, R. (2001b) Chromosomal stability and the DNA double-stranded break connection. *Nat Rev Genet*, Vol. 2, pp. 196-206.
- van Hoffen, A., Balajee, A.S., van Zeeland, A.A. and Mullenders, L.H.F. (2003) Nucleotide excision repair and its interplay with transcription. *Toxicology*, **193**, 79-90.
- Vaziri, H., West, M.D., Allsopp, R.C., Davison, T.S., Wu, Y.S., Arrowsmith, C.H., Poirier, G.G. and Benchimol, S. (1997) ATM-dependent telomere loss in aging human diploid fibroblasts and DNA damage lead to the post-translational activation of p53 protein involving poly(ADP-ribose) polymerase. *Embo J*, **16**, 6018-6033.
- Venkitaraman, A.R. (2001) Chromosome stability, DNA recombination and the BRCA2 tumour suppressor. *Curr Opin Cell Biol*, **13**, 338-343.
- Venkitaraman, A.R. (2004) Tracing the network connecting brca and fanconi anaemia proteins. *Nat Rev Cancer*, Vol. 4, pp. 266-276.
- Venot, C., Maratrat, M., Dureuil, C., Conseiller, E., Bracco, L. and Debussche, L. (1998) The requirement for the p53 proline-rich functional domain for mediation of apoptosis is correlated with specific PIG3 gene transactivation and with transcriptional repression. *Embo J*, **17**, 4668-4679.
- Villemure, J.F. (2003) MSH2-deficient human cells exhibit a defect in the accurate termination of homology-directed repair of DNA double-strand breaks. *Cancer Res*, Vol. 63, pp. 3334-3339.
- Villemure, J.F., Abaji, C., Cousineau, I. and Belmaaza, A. (2003) MSH2-deficient human cells exhibit a defect in the accurate termination of homology-directed repair of DNA double-strand breaks. *Cancer Res*, **63**, 3334-3339.
- Villemure, J.F. and Belmaaza, A. (1999) Effects of sequence divergence on the efficiency of extrachromosomal recombination in mismatch repair proficient and deficient mammalian cell lines. *Somat Cell Mol Genet*, Vol. 25, pp. 79-90.
- Villemure, J.F., Savard, N. and Belmaaza, A. (2001a) Promoter suppression in cultured mammalian cells can be blocked by the chicken beta-globin chromatin insulator 5'HS4 and matrix/scaffold attachment regions. *J Mol Biol*, **312**, 963-974.
- Villemure, J.F., Savard, N. and Belmaaza, A. (2001b) Promoter suppression in cultured mammalian cells can be blocked by the chicken beta-globin

- chromatin insulator 5'HS4 and matrix/scaffold attachment regions. *J Mol Biol*, Vol. 312, pp. 963-974.
- Vogelstein, B., Lane, D. and Levine, A.J. (2000) Surfing the p53 network. *Nature*, **408**, 307-310.
- Waga, S., Hannon, G.J., Beach, D. and Stillman, B. (1994) The p21 inhibitor of cyclin-dependent kinases controls DNA replication by interaction with PCNA. *Nature*, **369**, 574-578.
- Waga, S. and Stillman, B. (1998) Cyclin-dependent kinase inhibitor p21 modulates the DNA primer-template recognition complex. *Mol Cell Biol*, **18**, 4177-4187.
- Wahl, G.M. and Carr, A.M. (2001) The evolution of diverse biological responses to DNA damage: insights from yeast and p53. *Nat Cell Biol*, **3**, E277-286.
- Waldman, T., Kinzler, K.W. and Vogelstein, B. (1995) p21 is necessary for the p53-mediated G1 arrest in human cancer cells. *Cancer Res*, **55**, 5187-5190.
- Walker, K.K. and Levine, A.J. (1996) Identification of a novel p53 functional domain that is necessary for efficient growth suppression. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 15335-15340.
- Wang, L., Cui, Y., Lord, B.I., Roberts, S.A., Potten, C.S., Hendry, J.H. and Scott, D. (1996) Gamma-ray-induced cell killing and chromosome abnormalities in the bone marrow of p53-deficient mice. *Radiat Res*, **146**, 259-266.
- Wang, X.W., Yeh, H., Schaeffer, L., Roy, R., Moncollin, V., Egly, J.M., Wang, Z., Freidberg, E.C., Evans, M.K., Taffe, B.G. and et al. (1995) p53 modulation of TFIIH-associated nucleotide excision repair activity. *Nat Genet*, **10**, 188-195.
- Wang, X.W., Zhan, Q., Coursen, J.D., Khan, M.A., Kontny, H.U., Yu, L., Hollander, M.C., O'Connor, P.M., Fornace, A.J., Jr. and Harris, C.C. (1999) GADD45 induction of a G2/M cell cycle checkpoint. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 3706-3711.
- Welsh, P.L., Owens, K.N. and King, M.C. (2000) Insights into the functions of BRCA1 and BRCA2. *Trends Genet*, **16**, 69-74.
- West, S.C. (2003) Molecular views of recombination proteins and their control. *Nat Rev Mol Cell Biol*, Vol. 4, pp. 435-445.

- Whitelaw, E. and Martin, D.I. (2001) Retrotransposons as epigenetic mediators of phenotypic variation in mammals. *Nat Genet*, Vol. 27, pp. 361-365.
- Wiesmuller, L., Cammenga, J. and Deppert, W.W. (1996) In vivo assay of p53 function in homologous recombination between simian virus 40 chromosomes. *J Virol*, **70**, 737-744.
- Willers, H., McCarthy, E.E., Alberti, W., Dahm-Daphi, J. and Powell, S.N. (2000a) Loss of wild-type p53 function is responsible for upregulated homologous recombination in immortal rodent fibroblasts. *Int J Radiat Biol*, **76**, 1055-1062.
- Willers, H., McCarthy, E.E., Alberti, W., Dahm-Daphi, J. and Powell, S.N. (2000b) Loss of wild-type p53 function is responsible for upregulated homologous recombination in immortal rodent fibroblasts. *Int J Radiat Biol*, Vol. 76, pp. 1055-1062.
- Willers, H., McCarthy, E.E., Hubbe, P., Dahm-Daphi, J. and Powell, S.N. (2001a) Homologous recombination in extrachromosomal plasmid substrates is not suppressed by p53. *Carcinogenesis*, **22**, 1757-1763.
- Willers, H., McCarthy, E.E., Hubbe, P., Dahm-Daphi, J. and Powell, S.N. (2001b) Homologous recombination in extrachromosomal plasmid substrates is not suppressed by p53. *Carcinogenesis*, Vol. 22, pp. 1757-1763.
- Willers, H., McCarthy, E.E., Wu, B., Wunsch, H., Tang, W., Taghian, D.G., Xia, F. and Powell, S.N. (2000c) Dissociation of p53-mediated suppression of homologous recombination from G1/S cell cycle checkpoint control. *Oncogene*, **19**, 632-639.
- Willers, H., McCarthy, E.E., Wu, B., Wunsch, H., Tang, W., Taghian, D.G., Xia, F. and Powell, S.N. (2000d) Dissociation of p53-mediated suppression of homologous recombination from G1/S cell cycle checkpoint control. *Oncogene*, Vol. 19, pp. 632-639.
- Wood, R.D., Mitchell, M., Sgouros, J. and Lindahl, T. (2001) Human DNA repair genes. *Science*, **291**, 1284-1289.
- Wright, J.A., Keegan, K.S., Herendeen, D.R., Bentley, N.J., Carr, A.M., Hoekstra, M.F. and Concannon, P. (1998) Protein kinase mutants of human ATR increase sensitivity to UV and ionizing radiation and abrogate cell cycle checkpoint control. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 7445-7450.

- Wu, H.Y., Shyy, S.H., Wang, J.C. and Liu, L.F. (1988) Transcription generates positively and negatively supercoiled domains in the template. *Cell*, **53**, 433-440.
- Wu, J., Xu, J. and Dedon, P.C. (1999) Modulation of enediyne-induced DNA damage by chromatin structures in transcriptionally active genes. *Biochemistry*, **38**, 15641-15646.
- Wu, L., Davies, S.L., Levitt, N.C. and Hickson, I.D. (2001) Potential role for the BLM helicase in recombinational repair via a conserved interaction with RAD51. *J Biol Chem*, **276**, 19375-19381.
- Wu, L. and Hickson, I.D. (2003) The Bloom's syndrome helicase suppresses crossing over during homologous recombination. *Nature*, **426**, 870-874.
- Xia, F., Taghian, D.G., DeFrank, J.S., Zeng, Z.C., Willers, H., Iliakis, G. and Powell, S.N. (2001) Deficiency of human BRCA2 leads to impaired homologous recombination but maintains normal nonhomologous end joining. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 8644-8649.
- Yamagata, K., Kato, J., Shimamoto, A., Goto, M., Furuichi, Y. and Ikeda, H. (1998) Bloom's and Werner's syndrome genes suppress hyperrecombination in yeast *sgs1* mutant: implication for genomic instability in human diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 8733-8738.
- Yang, Q., Zhang, R., Wang, X.W., Spillare, E.A., Linke, S.P., Subramanian, D., Griffith, J.D., Li, J.L., Hickson, I.D., Shen, J.C., Loeb, L.A., Mazur, S.J., Appella, E., Brosh, R.M., Jr., Karmakar, P., Bohr, V.A. and Harris, C.C. (2002) The processing of Holliday junctions by BLM and WRN helicases is regulated by p53. *J Biol Chem*, **277**, 31980-31987.
- Ye, X., Franco, A.A., Santos, H., Nelson, D.M., Kaufman, P.D. and Adams, P.D. (2003) Defective S phase chromatin assembly causes DNA damage, activation of the S phase checkpoint, and S phase arrest. *Mol Cell*, Vol. 11, pp. 341-351.
- Yin, Y., Tainsky, M.A., Bischoff, F.Z., Strong, L.C. and Wahl, G.M. (1992) Wild-type p53 restores cell cycle control and inhibits gene amplification in cells with mutant p53 alleles. *Cell*, **70**, 937-948.
- Yoshida, J., Umezumi, K. and Maki, H. (2003) Positive and negative roles of homologous recombination in the maintenance of genome stability in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, **164**, 31-46.

- Yuan, S.S., Lee, S.Y., Chen, G., Song, M., Tomlinson, G.E. and Lee, E.Y. (1999) BRCA2 is required for ionizing radiation-induced assembly of Rad51 complex in vivo. *Cancer Res*, **59**, 3547-3551.
- Zhan, Q., Antinore, M.J., Wang, X.W., Carrier, F., Smith, M.L., Harris, C.C. and Fornace, A.J., Jr. (1999) Association with Cdc2 and inhibition of Cdc2/Cyclin B1 kinase activity by the p53-regulated protein Gadd45. *Oncogene*, **18**, 2892-2900.
- Zhang, H., Somasundaram, K., Peng, Y., Tian, H., Bi, D., Weber, B.L. and El-Deiry, W.S. (1998) BRCA1 physically associates with p53 and stimulates its transcriptional activity. *Oncogene*, **16**, 1713-1721.
- Zhou, B.B. and Elledge, S.J. (2000) The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. *Nature*, **408**, 433-439.
- Zhou, J., Ahn, J., Wilson, S.H. and Prives, C. (2001) A role for p53 in base excision repair. *Embo J*, **20**, 914-923.
- Zink, D., Mayr, C., Janz, C. and Wiesmuller, L. (2002) Association of p53 and MSH2 with recombinative repair complexes during S phase. *Oncogene*, **21**, 4788-4800.

