

Direction des bibliothèques

AVIS

Ce document a été numérisé par la Division de la gestion des documents et des archives de l'Université de Montréal.

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

This document was digitized by the Records Management & Archives Division of Université de Montréal.

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

**Rôles de BRCA1 dans la régulation de la recombinaison homologue : Implications
pour le maintien de la stabilité du génome humain et la carcinogénèse**

par
Isabelle Cousineau

Programme de Biologie Moléculaire
Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté de Médecine
En vue de l'obtention du grade de
Philosophiae Doctor (Ph. D.)
en biologie moléculaire

Décembre, 2007

© Isabelle Cousineau, 2007



Université de Montréal
Faculté de Médecine

Cette thèse intitulée :

**Rôles de BRCA1 dans la régulation de la recombinaison homologue : Implications
pour le maintien de la stabilité du génome humain et la carcinogenèse**

par

Isabelle Cousineau

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes:

Président-Rapporteur
Directeur de recherche
Membre du jury
Examineur externe

Dr Richard Bertrand
Dr Abdellah Belmaaza
Dr Anne-Marie Mes-Masson
Dr Michel Lebel

Résumé

Le cancer du sein est un des cancers affectant le plus grand nombre de femmes à travers le monde. À eux seuls, les gènes de susceptibilité BRCA1 et BRCA2 sont responsables de la grande majorité des cancers du sein et de l'ovaire héréditaires. Une caractéristique des tumeurs associées à BRCA1 et BRCA2 est la présence d'instabilité génomique. L'hypothèse courante veut que l'instabilité génomique soit causée par une diminution dans le nombre d'événements de réparation des cassures double brin. Toutefois, étant donné que ce type de lésion est létal pour la cellule lorsque non réparée, ce modèle explique difficilement comment les cellules BRCA1- et BRCA2-déficientes accumulent de l'instabilité génomique. Nos recherches nous ont permis de démontrer que BRCA1/2 remplissent une double fonction pour maintenir l'intégrité du génome. Ils favorisent tout d'abord la cohésion entre les chromatides sœurs et la réparation précise des cassures double brin par recombinaison homologue, en activant RAD51. De plus, ils inhibent ce mécanisme afin d'éviter l'hyper-recombinaison spontanée, un phénotype mutagénique. BRCA1/2 favorisent donc le mécanisme de réparation le plus approprié en fonction du type de lésion. Ainsi, en absence de ces protéines, des mutations et réarrangements chromosomiques s'accumulent, ce qui favoriserait le développement du cancer.

La séquence d'événements qui conduit à la perte de l'allèle sauvage et au développement du cancer chez les hétérozygotes, demeure inconnue. Les hypothèses courantes, basées sur la surexpression dans des cellules sauvages, veulent que l'haploinsuffisance ou la fonction dominante-négative du mutant affecte la fonction des BRCA1 et BRCA2 sauvages résiduels, quoique les mutations soient rares dans les cancers sporadiques. Cependant, il existe très peu de modèles cellulaires adéquats pour tester ces hypothèses, c'est pourquoi nous avons utilisé les cellules MCF-7, une lignée de cancer du sein humain ne possédant qu'un seul allèle de BRCA1. Nos récents travaux nous ont permis de démontrer que l'haploinsuffisance de BRCA1 à elle seule entraîne une dérégulation de ses fonctions dans le maintien de la stabilité génomique. Ainsi, les femmes qui montrent une diminution d'expression de BRCA1, due à la présence d'un allèle non-

fonctionnel hérité ou due à une modification épigénétique spontanée, peuvent subir des réarrangements chromosomiques et sont donc prédisposées à la perte de l'allèle sauvage et au développement du cancer.

Enfin, comment une protéine ubiquitaire et occupant une fonction aussi essentielle dans le maintien de la stabilité du génome humain prédispose quasi uniquement au développement du cancer du sein et de l'ovaire? Plusieurs évidences soulignent l'importance de l'estrogène dans le développement tumoral associé à BRCA1 et BRCA2. BRCA1 régule négativement la transcription dépendante du récepteur à l'estrogène. Cependant, ceci n'explique pas comment BRCA2 pourrait prédisposer aux cancers du sein et de l'ovaire. Une autre hypothèse voudrait que les dommages à l'ADN causés par l'estrogène affectent la stabilité du génome. Consistant avec cette hypothèse, nous avons démontré que BRCA1 est essentiel à la gestion du stress estrogénique en régulant les échanges entre les chromatides sœurs assurant ainsi le maintien de la stabilité du génome. Nos observations peuvent également avoir un impact sur le traitement des patients atteints de cancer et sur la prévention.

Mots clés

BRCA1, BRCA2, Réparation de l'ADN, Recombinaison homologue, Cancer, Échanges entre chromatides sœurs, Instabilité génomique, RAD51, Estrogène

Summary

Breast cancer has the highest incidence among women in the world. The susceptibility genes BRCA1 and BRCA2 are responsible for the great majority of hereditary breast and ovarian cancers. A characteristic feature of BRCA1 and BRCA2 tumours is the presence of genomic instability. A widespread hypothesis invokes that genomic instability is caused by a deficiency in the number of DNA double-strand break repair, a well characterized function of BRCA1 and BRCA2. However, given that this type of lesion is lethal to the cell when unrepaired, this model does not explain how BRCA1- and BRCA2-deficient cells escape apoptosis and accumulate genomic instability. Our findings demonstrate that BRCA1/2 have a dual function in the maintenance of genome integrity. First, they stimulate sister chromatid cohesion/alignment to ensure error-free repair of double-strand breaks by RAD51-mediated homologous recombination. Second, they inhibit this mechanism to prevent spontaneous hyper-recombination, a mutator phenotype, channelling DNA damage to appropriate repair mechanisms. In the absence of these proteins, mutations and chromosomal rearrangements would accumulate, favouring tumour development.

The sequence of events leading to the loss of the remaining wild-type allele and to cancer apparition in heterozygotes has been unclear. Current hypotheses invoke that haploinsufficiency or dominant-negative mutations may affect the function of the residual wild-type BRCA1 and BRCA2 alleles. However, these hypotheses were based on BRCA1/2 over-expression in wild-type cells and thus do not mimic the heterozygous state. Therefore, we employed the human breast cancer MCF-7 cell line known to have only one BRCA1 allele. Our findings show that BRCA1 haploinsufficiency alone can compromise the maintenance of genome stability, indicating that women who show a reduction in BRCA1 expression, owing to the presence of a non-functional inherited allele or to an epigenetic modification, would accumulate chromosomal rearrangements and have a higher risk of losing the remaining BRCA1 functional allele leading to cancer development.

Finally, it remains unclear how mutations in such ubiquitous proteins, occupying such an essential function in human genomic stability, predispose almost exclusively to breast and ovarian cancer. Several lines of evidence underline the importance of estrogen in tumour development linked to BRCA1 and BRCA2. Although BRCA1 can negatively regulate transcriptional activation of the estrogen receptor, this does not explain the tissue-specificity of BRCA2 tumour suppressive property. Given that estrogen metabolites can induce DNA damage and genome instability, we tested the hypothesis that BRCA1 and BRCA2 may protect estrogen-responsive tissues against such metabolites. Our findings indeed indicate that BRCA1 regulates sister chromatid exchanges in response to estrogenic stress. Our observations may also have implications for the medical management of cancer patients and cancer prevention.

Key words

BRCA1, BRCA2, DNA repair, Homologous recombination, Cancer, Sister chromatid exchange, Genomic instability, RAD51, Estrogen

Table des matières

Résumé.....	i
Mots clés.....	iii
Abstract.....	iv
Key words.....	vi
Table des Matières.....	vii
Liste des figures.....	xii
Liste des tableaux.....	xv
Abréviations.....	xvii
Remerciements.....	xx

Chapitre 1 : Introduction

1.1 Le cancer chez la femme.....	1
1.2 Les gènes de susceptibilités <i>BRCA1</i> et <i>BRCA2</i>	2
1.3 Structures et fonctions de <i>BRCA1</i> et <i>BRCA2</i>	3
1.4 Mécanismes de réparation de l'ADN et recombinaison.....	8
1.4.1 Recombinaison Homologue.....	9
1.4.1.1 Étape d'initiation.....	9
1.4.1.2 L'invasion RAD51-dépendante.....	10
1.4.1.3 La résolution.....	12
1.4.1.4 Importance de la recombinaison homologue.....	13
1.4.1.5 Risques associés à la recombinaison homologue.....	13
1.4.1.6 Systèmes de mesure de la recombinaison homologue.....	19
1.4.1.6.1 Échanges entre les chromatides sœurs.....	19
1.1.1.6.2 Plasmides rapporteurs.....	21
1.4.1.7 Importance de <i>BRCA1</i> dans la recombinaison homologue.....	23
1.4.1.8 Implication de <i>BRCA2</i> dans la recombinaison homologue.....	29

1.4.2 Non-homologous end-joining.....	32
1.4.3 Single-strand annealing.....	36
1.5 Autres activités de BRCA1 et BRCA2 impliquées dans la régulation de la recombinaison homologue et le maintien de la stabilité génomique.....	38
1.5.1 Contrôle du cycle cellulaire.....	38
1.5.2 Régulation de la transcription.....	42
1.5.3 Remodelage de la chromatine.....	46
1.5.4 Apoptose.....	48
1.5.5 Ubiquitine-ligase.....	48
1.6 Prédilection au cancer héréditaire chez les hétérozygotes.....	53
1.7 Spécificité de tissus.....	58
1.8 Objectifs.....	63
1.8.1 Déterminer comment les cellules BRCA1-déficientes accumulent des réarrangements chromosomiques.....	63
1.8.2 Comment l'haploinsuffisance de BRCA1 affecte la stabilité génomique?.....	64
1.8.3 En quoi BRCA1 affecte la réponse cellulaire au stress estrogénique?.....	64

Chapitre 2: Matériel et Méthodes

2.1 Visualisation des échanges entre chromatides sœurs.....	65
---	----

**Chapitre 3 : BRCA1 regulates RAD51 function in response to DNA damage and suppresses spontaneous sister chromatid replication slippage : implications for sister chromatid cohesion, genome stability and carcinogenesis
(Cancer Research, vol. 65(24) : 11384-11391, 2005)**

Résumé.....	67
Abstract.....	68
Introduction.....	69
Materials and methods.....	72
Results.....	75
Discussion.....	85
Acknowledgments.....	89
References.....	90

**Chapitre 4 : BRCA1 haploinsufficiency, but not heterozygosity for a BRCA1-truncating mutation, deregulates homologous recombination
(Cell Cycle, vol 6(8) : 962-971, 2007)**

Résumé.....	96
Abstract.....	97
Introduction.....	98
Materials and methods.....	102
Results.....	105
Discussion.....	116
Acknowledgments.....	120
References.....	121

Chapitre 5 : Résultats supplémentaires

5.1 BRCA1 protège contre l'instabilité génomique associée à l'estrogène.....	126
--	-----

Chapitre 6 : Discussion

6.1 Avantages de notre substrat de recombinaison.....	130
6.2 Objectif 1 : Déterminer comment les cellules BRCA1-déficientes accumulent des réarrangements chromosomiques.....	131
6.2.1 Implication de BRCA1 et BRCA2 dans la réparation des cassures doubles brin.....	132
6.2.2 Importance de l'hyper-recombinaison dans le processus de carcinogenèse.....	134
6.2.3 Quel type de dommage induit l'hyper-recombinaison ?.....	139
6.2.4 Régulation de la RH en fonction du type de dommage.....	143
6.2.5 Implication de BRCA1 et BRCA2 dans la cohésion et son importance dans le maintien de la stabilité génomique.....	148
6.3 Objectif 2 : Comment l'haploinsuffisance de BRCA1 affecte la stabilité génomique?.....	149
6.3.1 Modèle d'initiation de la carcinogenèse.....	153
6.4 Objectif 3 : En quoi BRCA1 affecte la réponse cellulaire au stress estrogénique?.....	156

Chapitre 7 : Perspectives

7.1 Comment BRCA1 peut à la fois promouvoir et inhiber la recombinaison homologe?.....	161
7.1.1 Contrôle de la RH via les kinases ATM, ATR et c-ABL.....	161
7.1.2 Contrôle de la RH via le clivage des intermédiaires de recombinaison.....	164
7.2 Est-ce que l'haploinsuffisance accroît la perte d'hétérozygoté?.....	166

7.3	Quelle propriété de l'estrogène entraîne l'augmentation des échanges entre les chromatides soeurs?.....	169
7.4	Est-ce que BRCA1 affecte la recombinaison homologue spontanée et les échanges entre les chromatides sœurs en stimulant la réparation des dommages à l'ADN en amont de la fourche de réplication?.....	171
7.5	Effet de différents mutants ou polymorphismes de signification inconnue.....	172
7.6	Conclusion: prévention et thérapies.....	173

Chapitre 8 : Références..... 175

Chapitre 9 : Annexes

Annexe I:	MSH2-deficient human cells exhibit a defect in the accurate termination of homology-directed repair of DNA double-strand breaks (Cancer Research, vol. 63 : 3334-3339, 2003).....	223
Annexe II:	Disruption of p53 by viral oncoprotein HPV16-E6 does not deregulate chromosomal homologous recombination in a transcriptional interference-free assay system (Cell Cycle, vol. 4(6) : 831-837, 2005).....	230
Annexe III:	BRCA2 regulates homologous recombination in response to DNA damage: implication for genome stability and carcinogenesis (Cancer Research, vol. 65(10) : 4117-4125, 2005).....	238

Liste des figures

Chapitre 1 : Introduction

Figure 1. Répartition des différents cancers chez la femme canadienne.....	3
Figure 2. Représentation schématique des différents domaines de BRCA1 ainsi que de ses interactions protéines-protéines.....	4
Figure 3. Représentation schématique des différents domaines de BRCA2 ainsi que de ses interactions avec d'autres protéines.....	5
Figure 4. Modèle de réparation d'une cassure double brin par recombinaison homologue RAD51-dépendante.....	11
Figure 5. Le complexe de cohésines.....	15
Figure 6. Organisation de la chromatine.....	16
Figure 7. Exemples d'instabilité génomique générée par la recombinaison homologue entre des séquences répétitives.....	18
Figure 8. Mécanisme d'apparition des échanges entre chromatides sœurs.....	20
Figure 9. Recombinaison entre séquences répétées directes ou inversées.....	23
Figure 10. Fonctions de BRCA1 dans la signalisation/réparation des dommages à l'ADN.....	27
Figure 11. Modèle conceptuel pour la réparation d'une cassure double brin par réparation non-homologue.....	33
Figure 12. Modèle de réparation d'une cassure double brin par appariement simple brin.....	37
Figure 13. Implications de BRCA1 dans le contrôle du cycle cellulaire suite aux dommages à l'ADN.....	41
Figure 14. Importance de BRCA1 dans l'ubiquitination suite aux dommages à l'ADN.....	50
Figure 15. Causes postulées de l'instabilité génomique induite par l'estrogène.....	61

Chapitre 3 : BRCA1 régule la recombinaison homologue

Figure 1. Chromosomal homologous recombination between direct repeats.....	76
Figure 2. Stable expression of BRCA1 in HCC1937 recombination reporter cell lines.....	77
Figure 3. PCR analysis of homologous recombination products.....	81
Figure 4. A model for BRCA1 and BRCA2 in genome stability maintenance..	87

Chapitre 4 : L'haploinsuffisance de BRCA1 dérégule la recombinaison homologue

Figure 1. Stable expression of wild-type <i>BRCA1</i> in MCF-7 recombination reporter cell lines.....	106
Figure 2. Homologous recombination (HR) between direct and inverted repeats.....	107
Figure 3. Stable expression of <i>BRCA1 5382insC</i> in HCC1937 recombination reporter cell lines.....	110
Figure 4. Stable expression of <i>BRCA1 5382insC</i> in MCF-7 recombination reporter cell lines.....	112
Figure 5. Clonogenic survival assay for MMC.....	115

Chapitre 5 : Résultats supplémentaires

Figure 16. Exemple de visualisation des échanges entre chromatides sœurs dans les MCF-7.....	129
---	-----

Chapitre 6 : Discussion

Figure 17. Modèle d'initiation de la carcinogenèse.....	136
Figure 18. Modèle de régulation de la recombinaison homologue spontanée par BRCA1.....	141

Figure 19. Anormalités chromosomiques reliées à un défaut dans le processus de décaténation.....	143
Figure 20. Importance du clivage des branches d'ADN simple brin.....	147
Figure 21. Modèle d'initiation de la carcinogenèse en fonction de l'haploinsuffisance.....	155
Figure 22. Rôles de BRCA1 dans la gestion du stress estrogénique.....	160

Chapitre 7 : Perspectives

Figure 23. BRCA1/2 pourraient réguler la recombinaison homologue via les kinases impliquées dans la signalisation des différents dommages à l'ADN.....	162
Figure 24. Substrats de recombinaison pour évaluer l'importance de BRCA1 dans la stabilisation et/ou le clivage des branches d'ADN non-homologues.....	166

Liste des tableaux

Chapitre 1 : Introduction

Table I. Liste des protéines interagissant avec BRCA1.....	5
Table II. Liste des protéines interagissant avec BRCA2.....	6
Table III. Résumé des effets de BRCA1 sur la recombinaison non-homologue en fonction du type d'essai utilisé.....	36
Table IV. Revue de littérature sur la sensibilité aux radiations ionisantes des hétérozygotes pour BRCA1/2.....	55

Chapitre 3 : BRCA1 régule la recombinaison homologue

Table 1. Effect of BRCA1 on spontaneous homologous recombination.....	78
Table 2. Effect of BRCA1 on homologous recombination pathways.....	80
Table 3. Effect of BRCA1 on I- <i>SceI</i> -induced homologous recombination.....	82

Chapitre 4 : L'haploinsuffisance de BRCA1 dérégule la recombinaison homologue

Table I. Reduced BRCA1 level increases spontaneous homologous recombination (HR) but reduces I- <i>SceI</i> -induced HR.....	108
Table II. <i>BRCA1 5382insC</i> has no effect on spontaneous or I- <i>SceI</i> -induced homologous recombination (HR) in HCC1937 cell lines.....	111
Table III. <i>BRCA1 5382insC</i> has no effect on spontaneous or I- <i>SceI</i> -induced homologous recombination in MCF-7 cells.....	113
Table IV. Effect of <i>BRCA1 5382insC</i> on distinct homologous recombination pathways.....	114

Chapitre 5 : Résultats supplémentaires

Table V. Effet de BRCA1 sur l'influence de l'estradiol mesurée par le nombre d'échanges entre chromatides sœurs par cellules dans les MCF7.....128

Abréviations

ADN : Acide déoxyribonucléique
ADNc : Acide déoxyribonucléique complémentaire
ARN : Acide ribonucléique
ARNpol II : ARN polymérase II
ATM : Muté dans l'Ataxia Telangiectasia
ATR : Relié à 'muté dans l'Ataxia Telangiectasia'
BACH1 : Hélicase associée à BRCA1
BASC: Complexe de surveillance du génome associé à BRCA1
BAP1 : Protéine associée à BRCA1 et hydrolysant les ubiquitines
BARD1 : Protéine au domaine RING associée à BRCA1
BER : Excision de base
BIC : Centre d'information sur le cancer du sein (breast cancer information core)
BRAF35 : Facteur associé à BRCA2
BRCA1 : Gène 1 de susceptibilité au cancer du sein
(breast cancer susceptibility gene 1)
BRCA2 : Gène 2 de susceptibilité au cancer du sein
(breast cancer susceptibility gene 2)
BRCT : Répétition en C-terminal de BRCA1
BrdU : 5'bromodéoxyuridine
CAF-1 : Facteur d'assemblage de la chromatine
CDB : Cassure double brin
CDK : Kinase dépendante des cyclines
CSB : Cassure simple brin
CG : Conversion Génique
CO : Crossover
CtIP : Protéine interagissant avec CtBP (protéine de liaison au C-terminal)
DNA-PK : Protéine kinase dépendante de l'ADN
DSB : Double-strand break (cassure double brin)
DSS1 : Absent dans la maladie split hand/split foot

ER α : Récepteur de l'estrogène α
FANCA : Anémie de Fanconi groupe de complémentation A
FPG : Fluorescence plus Giemsa
G418 : Néomycine
G418^R : Résistant à la néomycine
GFP : Green Fluorescent Protein (protéine à fluorescence verte)
HDAC1/2 : Histone déacétylase 1/2
HR : Recombinaison homologue
HTERT : Transcriptase inverse de la télomérase humaine
Hyg : Hygromycine
Hyg : Gène de résistance à l'hygromycine
IR : Radiation ionisante
kDa : Kilo dalton
kpb : Kilo paires de bases
MDC1 : Mediator of DNA damage checkpoint 1 (médiateur des points de contrôles des dommages à l'ADN)
MMC : Mitomycin C
MMR : Réparation de bases mal appariées
MRN : MRE11/RAD50/NBS1
MSH : Homologue de Mut S
c-MYC : Oncogène myelocytomatosis
NER : Réparation par excision de nucléotide
NES : Signal d'exportation nucléaire
NHEJ : Recombinaison non-homologue
NLS : Signal de localisation nucléaire
OB : Liaison oligonucléotide/oligosaccharide
PBL : Lymphocytes de sang périphérique
P/CAF : p300/CBP et facteurs associés
PALB2 : Partenaire et localisateur de BRCA2
PCNA : Antigène nucléaire de prolifération cellulaire
PCR : Réaction de polymérisation en chaîne

PFGE : Électrophorèse sur gel en champs pulsé
PLK1 : Polo-Like Kinase 1 (kinase similaire à polo)
Puro : Puromycine
Puro : Gène de résistance à la puromycine
Puro^R : Résistant à la puromycine
RB : Rétinoblastome
RH : Recombinaison homologue
RI : Radiation ionisante
RING : Domaine similaire au doigt de zinc
RNA Pol II : ARN polymérase II
RPA : Protéine de réplication A
RT-PCR : Transcription inverse-réaction de polymérisation en chaîne
S : Phase de synthèse d'ADN
SCR : Recombinaison entre chromatides soeurs
SCRS : Glissement lors de la réplication des chromatides soeurs
SMC : Maintien de la structure chromosomique
SQ : Sérine/glutamine
SSA : Appariement simple brin
SSB : Bris simple brin
SSBR : Réparation de bris simple brin
ssDNA : ADN simple brin
TopoII : Topoisomérase II
UbcH5 : Enzyme conjugatrice d'ubiquitine H5
UV : Radiations ultraviolettes

Remerciements

J'aimerais remercier en premier lieu mon directeur de recherche, Dr Abdellah Belmaaza. Il m'a appuyé tout au long de ma maîtrise et de mon doctorat. Il a su me conseiller tout en me laissant une grande liberté, ce qui m'a permis d'évoluer scientifiquement. Je remercie également mes collègues de travail qui on passé à un moment ou à un autre dans le laboratoire et dont la collaboration a été un précieux atout, Christine Abaji, Jean-François Lemelin, Raphaëlle Stenne ainsi que Katia Caceres. Je tiens à remercier tous les membres de l'institut du cancer de Montréal pour leur support technique et leur patience à répondre à mes mille et une questions. Particulièrement dans les moments où j'ai été la seule étudiante au laboratoire, leur présence m'a été très précieuse. Je tiens à souligner spécialement l'aide de Roxanne Lussier qui a été d'une patience d'ange à mes débuts, Philippe Gannon pour son soutien informatique de et la contribution générale de Catherine Chabot qui a su m'appuyer à tout moment. L'institut du cancer de Montréal a constitué pour moi un foyer idéal pour le perfectionnement de mes aptitudes en recherche.

J'aimerais remercier les membres de mon comité de thèse, le Dr Richard Bertrand, le Dr Anne-Marie Mes-Masson et le Dr Éric Milot qui m'ont suivi durant toute ma formation doctorale. Je voudrais aussi remercier les différents organismes qui ont contribué au financement de mon projet de recherche. Tout d'abord, le programme de biologie moléculaire qui m'a démontré un appui constant, l'institut du cancer de Montréal qui m'a soutenu dans un moment crucial, la faculté des études supérieures de l'université de Montréal, Canderel, le centre de recherche du CHUM ainsi que la fondation Robert-Bourassa. J'aimerais également souligner la contribution financière constante de mon directeur de recherche.

Je remercie également ma famille. Leur fierté a grandement contribué à me redonner de la motivation dans les moments plus difficiles. Finalement, j'adresse un gros merci à mon conjoint Patrick pour son support inestimable. Il a su, au jour le jour, me donner la confiance et le sourire nécessaire pour me rendre jusqu'au bout de ce projet qui me tenait à coeur, celui d'obtenir mon doctorat.

Chapitre 1. Introduction

1.1 Le cancer chez la femme

Au Canada, 38% des femmes seront directement touchées par le cancer dans leur vie. Parmi tous les types de cancers, le cancer du sein est le plus répandu à travers le monde. Une canadienne sur 9 en sera atteinte, ce qui représente 22 300 personnes par année. L'espérance de vie 5 ans après le diagnostique est estimée à 86% pour 2007, ce qui en fait une cause importante de mortalité, avec une canadienne sur 25 qui en mourra. Par opposition, le cancer de l'ovaire est beaucoup moins répandu mais il affiche un taux de survie à 5 ans avoisinant les 38%, ce qui en fait également une cause de mortalité importante. Les femmes canadiennes sont parmi les plus à risque au monde avec 2/3 plus de chance de développer un cancer du sein que celles d'Amérique latine, d'Afrique ou d'Asie. Le nombre d'enfants, l'âge à la première grossesse, l'allaitement et l'exposition aux hormones synthétiques peuvent en partie expliquer cet écart et souligne l'importance de l'estrogène dans le développement tumoral. De plus, les femmes ayant une histoire familiale de cancer du sein et/ou de l'ovaire sont plus à risque de développer cette maladie puisque environ 10% des cas sont d'origine héréditaire (Figure 1)(National Cancer Institut of Canada : Cancer statistics 2007, ISSN 0835-2976, 1-3).

Certaines stratégies préventives s'offrent aux femmes appartenant à des familles à haut risque. Parmi ces stratégies, on retrouve évidemment le suivi personnalisé pour favoriser la détection précoce, une stratégie qui a fait ses preuves dans l'amélioration des statistiques sur le traitement du cancer mais qui malheureusement ne permet pas de prévenir l'apparition de cette maladie. L'ablation des ovaires tôt dans la vie de la patiente ou la mastectomie bilatérale représentent les stratégies préventives les plus efficaces (4, 5). Toutefois, peu de femmes optent pour ces chirurgies invasives (6). Dans ces cas, la chimiothérapie préventive peut représenter une alternative intéressante. Cette technique repose sur l'interruption des voies de signalisation de l'estrogène, principalement grâce à l'administration d'anti-estrogènes tel que le tamoxifène (7). Cette stratégie préventive souligne encore une fois l'importance de l'exposition à l'estrogène dans l'incidence du cancer du sein et de l'ovaire (8).

1.2 Les gènes de susceptibilités *BRCA1* et *BRCA2*

Jusqu'à ce jour, peu de gènes ont été reconnus comme étant des déterminants majeurs dans le cancer du sein et de l'ovaire héréditaire. En 1990, le premier gène de susceptibilité au cancer du sein, *BRCA1* (*Gène de susceptibilité au cancer du sein 1* [*Breast Cancer Susceptibility Gene 1*]), a été identifié et localisé sur le chromosome 17q21.3 (9, 10). Il a par la suite été établi qu'un *BRCA1* mutant est présent dans plusieurs familles à haut risque et plus de 300 mutations faux-sens ont été identifiées (10). En 1994, un second gène de susceptibilité au cancer du sein, *BRCA2*, a été localisé sur le chromosome 13q12-13 (11). Il est estimé que 50 à 80% des individus porteurs d'une mutation germinale dans l'un ou l'autre de ces gènes développent le cancer du sein avant l'âge de 70 ans (12-14). Des mutations dans les gènes *BRCA1* et *BRCA2* sont responsables d'environ 80% des cas de cancer du sein dans les familles à haut risque (Figure 1)(13, 15-17) et une délétion ou une diminution d'expression de *BRCA1* et *BRCA2* est fréquemment observée dans la forme sporadique de cette maladie (Figure 1)(18-20). Ces gènes seraient également responsables d'une prédisposition au cancer de l'ovaire (12). Les tumeurs issues des individus prédisposés montrent la perte d'hétérozygotie de l'allèle sauvage et la rétention de l'allèle mutant, ce qui indique que *BRCA1* et *BRCA2* sont des gènes suppresseurs de tumeurs (21-25). Malgré l'absence quasi totale de mutations des gènes *BRCA* dans le cancer sporadique, la réduction ou la perte complète d'expression observée, apporte une évidence supplémentaire quant à l'importance de *BRCA1* et *BRCA2* dans la carcinogenèse du sein et de l'ovaire, autant sporadique qu'héréditaire. Toutefois, le mode d'action exact de ces gènes dans la protection anti-tumorale demeure inconnu.

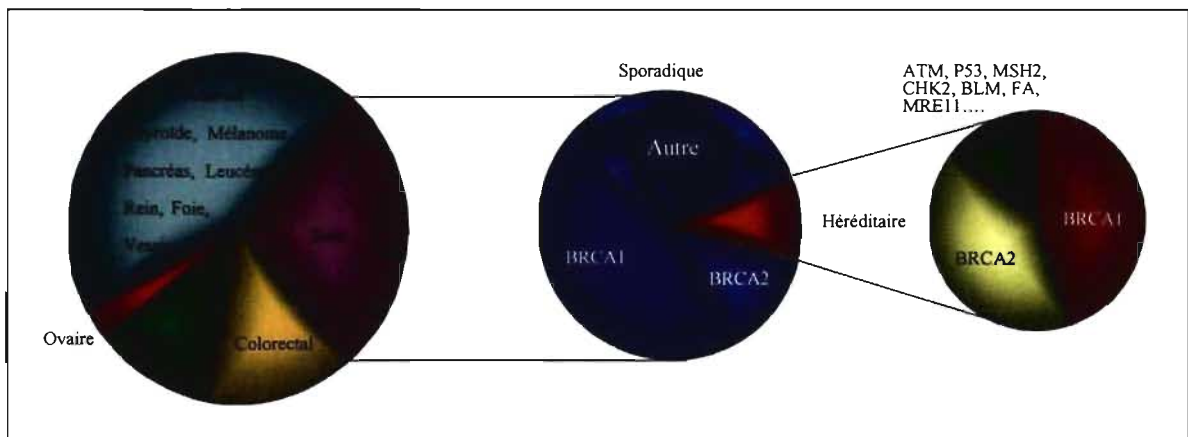


Figure 1. Répartition des différents cancers chez la femme canadienne. Le cancer du sein représente le cancer ayant la plus grande incidence chez la femme canadienne. À l'intérieur de ce type de cancer se retrouvent principalement des cancers sporadiques (représentés par différents bleus) qui incluent une diminution d'expression de *BRCA1* ou de *BRCA2*. Parmi les cancers héréditaires, dans les familles à haut risque, la majorité des cas sont reliés à une défectuosité de *BRCA1* ou de *BRCA2*, les autres étant associés à une défectuosité dans différentes protéines impliquées dans la signalisation/réparation des dommages à l'ADN (National Cancer Institute of Canada : Cancer statistics 2007, ISSN 0835-2976, 26-28).

1.3 Structures et fonctions de *BRCA1* et *BRCA2*

BRCA1 et *BRCA2* sont deux gènes ubiquitaires. *BRCA1* contient 24 exons qui codent pour une protéine de 1863 acides aminés chez l'humain et de 1812 acides aminés chez la souris (10). Le niveau de conservation de la séquence chez les mammifères est faible à l'exception de certains domaines fonctionnels identifiables (Figure 2). *BRCA1* a la capacité d'interagir avec de nombreuses protéines impliquées dans des fonctions biologiques très variées comme l'ubiquitination, la transcription, le remodelage de la chromatine, le contrôle du cycle cellulaire, l'apoptose et la signalisation/réparation des dommages à l'ADN (Table I). Le produit du gène *BRCA2*, quant à lui, est composé de 27 exons encodant une protéine de 3418 résidus chez l'humain et de 3328 chez la souris. *BRCA2* constitue un des plus grands polypeptides du protéome (29). *BRCA2* ne présente que peu de similarités avec les protéines connues, mais certains motifs et régions d'interactions protéiques sont conservés (Figure 3, Table II).

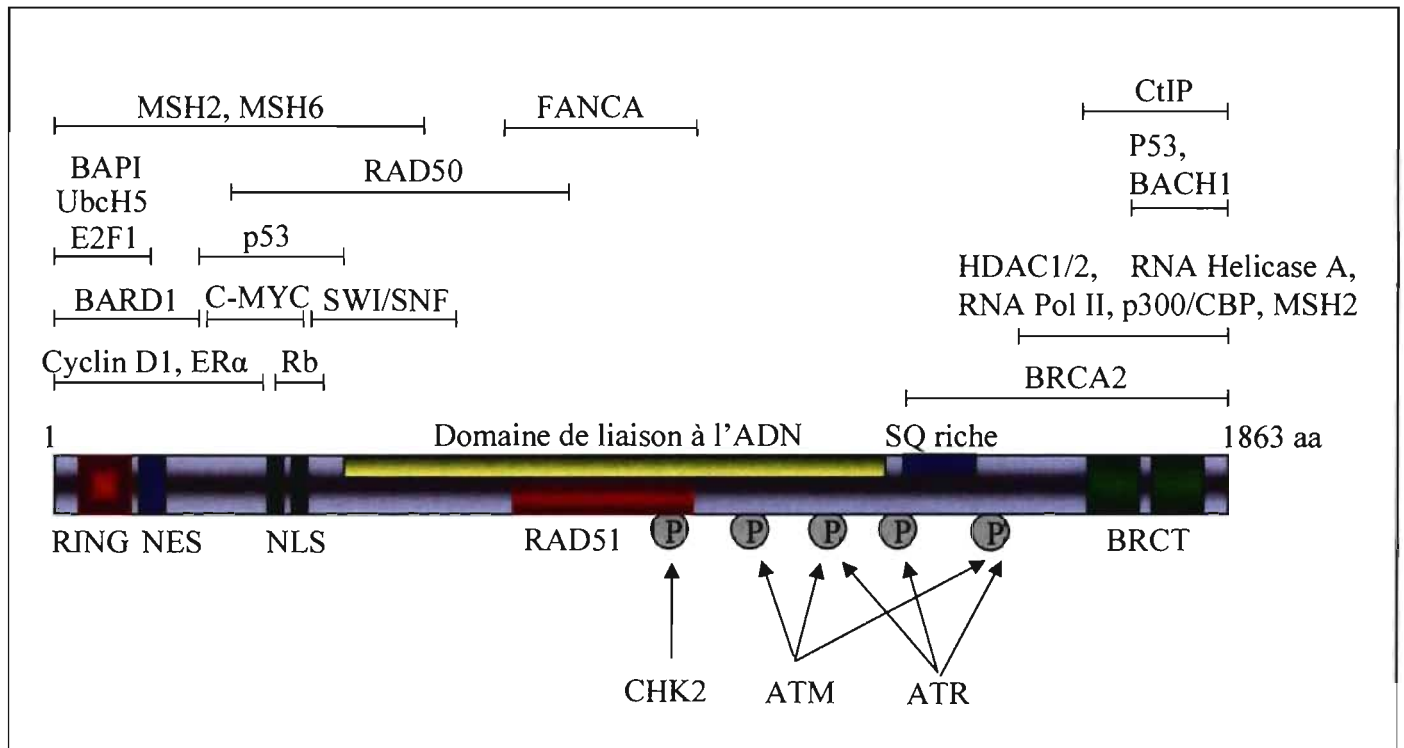


Figure 2. Représentation schématique des différents domaines de BRCA1 ainsi que de ses interactions protéines-protéines. Abréviations : ATM, muté dans l'ataxia telangiectasia; ATR, relié à 'muté dans l'ataxia telegiectasia'; BACH1, hélicase associée à BRCA1; BAPI, protéine associée à BRCA1 et hydrolysant les ubiquitines; BARD1, protéine au domaine RING associée à BRCA1; BRCA2, gène de susceptibilité au cancer du sein 2; BRCT, répétition en C-terminal de BRCA1; CtIP, protéine interagissant avec CtBP (protéine de liaison au C-terminal); ER α , récepteur de l'estrogène α ; FANCA, anémie de Fanconi groupe de complémentation A; HDAC1/2, histone déacétylase 1 et 2; MSH2/6, homologue de Mut S; c-MYC, oncogène myelocytomatos; NES, signal d'exportation nucléaire; NLS, signal de localisation nucléaire; Rb, rétinoblastome; RING, domaine similaire au doigt de zinc; RNA Pol II, ARN polymérase II; SQ, sérine/glutamine; UbcH5, enzyme conjugatrice d'ubiquitine H5.

Le domaine RING est impliqué dans les interactions protéines-protéines. BRCA1 contient également deux régions BRCT en C-terminal, qui consistent en un domaine globulaire fréquemment retrouvé chez les protéines impliquées dans la réparation de l'ADN ou le contrôle du cycle cellulaire et qui sert de domaine de reconnaissance pour les phosphoprotéines.

Table I. Liste des protéines interagissant avec BRCA1

Fonctions biologiques	Partenaires protéiques
Ubiquitination	BARD1, BAP1, UbcH5
Transcription	RNA polymérase II holoenzyme, RNA hélicase A, CBP/p300, CtIP, p53, Récepteur Estrogène α , Récepteur Androgène, ZBRK1, ATF1, STAT1, c-MYC, AKT, STK15, BRCT-repeat inhibitor of hTERT expression, Smad3, Cst50
Remodelage de la chromatine	HDAC1/2, SWI/SNF, HAT
Contrôle du cycle cellulaire	CDC2, p21, E2F1, RB, 14-3-3 σ , WEE1, MAD2
Apoptose	Bcl2, FasL, GADD45, p53
Signalisation et réparation de l'ADN	ATM, ATR, RAD51, RAD50/MRE11/NBS, BRCA2, CHK1, CHK2, c-ABL, Famille Fanconi anemie, MSH2, MSH6, MLH1, BLM, H2AX, PCNA, BACH1, DNA Replication factor C

(26, 30)



Figure 3. Représentation schématique des différents domaines de BRCA2 ainsi que de ses interactions avec d'autres protéines. Abréviations : BRCA1, gène de susceptibilité au cancer du sein 1; DSS1, absent dans la maladie split hand/split foot; FANCD2, anémie de Fanconi groupe de complémentation D2; NLS, signal de localisation nucléaire; P/CAF, p300/CBP et facteurs associés; PALB2, partenaire et localisateur de BRCA2; Replievements OB, motifs de liaison oligonucléotide/oligosaccharide; RPA, protéine de réplication A.

Le motif BRC est constitué de 30 à 40 acides aminés, relativement homologues, répétés 8 fois et codés par l'exon 11 (résidus 990 à 2100) (31, 32). Ces motifs sont conservés à travers les espèces et ont la capacité de lier directement la recombinaise RAD51 (33, 34). En plus des BRC, BRCA2 possède un autre site de liaison à RAD51 en C-terminal (35, 36). Les replievements OB sont généralement présents dans les protéines capables de lier l'ADN simple brin comme RPA. Parmi ces replievements, on retrouve une structure en forme de tour qui a la capacité de lier l'ADN double brin. Ces domaines permettent probablement à BRCA2 de lier la jonction entre l'ADN simple brin et double brin formée lors d'une CDB.

Table II. Liste des protéines interagissant avec BRCA2

Fonctions biologiques	Partenaires protéiques
Remodelage de la chromatine/transcription	P/CAF
Contrôle du cycle cellulaire	BRAF35, BUBR1
Réparation de l'ADN	RAD51, BRCA1, RPA, DSS1, FANCD2
Fonction inconnue	EMSY, PALB2

Afin de mieux comprendre leurs fonctions, des souris déficientes en BRCA1 et BRCA2 ont été générées. Les premières études ont démontré qu'une mutation homozygote de ces gènes entraîne la mort durant l'embryogenèse précoce, due à de l'instabilité génomique et à un défaut de prolifération (37-41). Ce défaut de prolifération est associé à un arrêt du cycle cellulaire provoqué par des niveaux d'expression élevés de p53 et de p21 (37, 42-45). En effet, cet arrêt de prolifération entraînant la mort embryonnaire peut être outrepassée par une mutation dans les gènes p53 ou p21 (38, 46). La différenciation ne semble toutefois pas être affectée (37). L'instabilité génomique observée dans les cellules déficientes en BRCA1 inclut des translocations, délétions, duplications, inversions, bris chromosomiques, chromosomes acentriques/dicentriques, triradiaux/quadriradiaux et de l'aneuploïdie (42, 47-50). De telles marques d'instabilité génomique sont des caractéristiques de tous les cancers humains et reflètent un défaut au niveau du contrôle de la recombinaison homologue (RH) mitotique et de la ségrégation des chromosomes (51). Ces caractéristiques sont également typiques de certains syndromes humains liés à une mutation dans des gènes essentiels au maintien de la stabilité du génome tels que l'ataxie télangiectasie (ATM), le syndrome de Bloom (BLM) ou de Werner (WRN) et l'anémie de Fanconi (FANC).

Il a été démontré par la suite, que BRCA1 et BRCA2 s'associe avec RAD51, une protéine similaire à RecA chez les bactéries et qui est essentielle à la RH (33, 52). BRCA1, BRCA2 et RAD51 colocalisent en foci nucléaires dans les cellules mitotiques et méiotiques (52). Ces foci, dont la fonction exacte demeure inconnue, se forment durant la phase de synthèse d'ADN (S), possiblement aux fourches de réplication, puisqu'ils

sont marqués par PCNA (l'antigène nucléaire de prolifération cellulaire [proliferating cell nuclear antigen]) et suite aux dommages à l'ADN (52, 53). BRCA1 et BRCA2 forment de tels foci également avec BARD1 (protéine au domaine RING associée à BRCA1 [BRCA1-associated ring domain 1]), un autre suppresseur de tumeurs ayant une fonction dans la RH (54-56)(voir sections 1.4.1.7 et 1.4.1.8). BRCA1 a aussi été retrouvé dans un large complexe qui contient plusieurs protéines directement impliquées dans la RH, le BASC (complexe de surveillance du génome associé à BRCA1) (57). Le BASC contient entre autre le complexe MRE11/RAD50/NBS1 (MRN), ATM, ATR, BLM et MSH2/MSH6.

De plus, les cellules humaines ou de souris déficientes pour BRCA1/2 montrent un haut niveau de sensibilité aux radiations ionisantes (RI) et aux agents chimiothérapeutiques capables d'induire des dommages à l'ADN (58-60). Parmi ces agents, on retrouve la mitomycine C et le cisplatine, deux agents pontants l'ADN et qui introduisent des cassures double brin (CDB) d'une façon dépendante du cycle cellulaire. (56, 59-65). Effectivement, après un traitement par un agent capable d'induire des pontages entre les brins d'ADN, des CDB sont formées exclusivement durant la phase S, probablement lors du passage de la fourche de réplication (66). L'élimination de ces dommages reposerait sur la RH (67-69). Il a également été démontré que l'hyper-sensibilité aux RI des cellules BRCA1-déficientes de souris peut être renversée par l'expression ectopique de BRCA1 et que cette expression restaure l'aptitude cellulaire à réparer les CDB par RH (62, 63, 70). Toutes ces observations ont suggéré une implication pour les gènes BRCA1/2 dans la réparation de l'ADN et plus particulièrement dans la RH.

Cette hypothèse a par la suite été supportée par la démonstration de l'importance de BRCA1, tout comme de BRCA2, dans la réparation par RH d'une CDB dans les cellules embryonnaires de souris (61-63).

Résumé des évidences reliant BRCA1 à la recombinaison homologue

- Les cellules BRCA1-déficientes montrent des aberrations chromosomiques comme des délétions, duplications, inversions, bris chromosomiques, chromosomes triradiaux/quadriradiaux et des acentriques/dicentriques, tous des marqueurs de recombinaison mitotique déficiente
- BRCA1 colocalise avec RAD51, BARD1, BRCA2, ATM, CHK2 et le complexe MRN, des protéines impliquées dans la recombinaison homologue
- Les cellules BRCA1-déficientes sont hyper-sensibles aux radiations ionisantes et aux agents pontant l'ADN, des traitements qui induisent des lésions qui nécessitent la recombinaison homologue pour être réparées
- BRCA1 favorise la réparation d'une cassure double brin par recombinaison homologue chez la souris

1.4 Mécanismes de réparation de l'ADN et recombinaison

La réparation adéquate des dommages à l'ADN est essentielle pour le maintien de l'intégrité du génome. Les cellules eucaryotes ont développé plusieurs mécanismes afin de réparer les différents types de lésions. Il y a les mécanismes impliqués lors de cassures simple brin (CSB) ou de dommages infligés à un seul des deux brins d'ADN et ceux requis pour réparer les lésions potentiellement beaucoup plus dangereuses que constituent les CDB. Lorsqu'un seul brin d'ADN est endommagé, le brin complémentaire intact peut être utilisé comme matrice afin de procéder à la réparation. Celle-ci peut s'effectuer par réparation de bris simple brin (single-strand break repair [SSBR]), excision de base (base excision repair [BER]), excision de nucléotide (nucleotide excision repair [NER]) ou réparation de bases mal appariées (mismatch repair [MMR]).

Les lésions double brin sont plus problématiques que les CSB puisque le brin complémentaire n'est pas disponible comme matrice pour effectuer la réparation. Les CDB peuvent être le résultat de dommages exogènes comme l'exposition aux RI et aux agents chimiothérapeutiques ou encore avoir une source endogène comme la dislocation de la fourche de réplication ou lors de la méiose. La réparation des CDB s'effectue par

recombinaison, un mécanisme qui peut être subdivisé en trois: la recombinaison non-homologue [non-homologous end-joining (NHEJ)], l'appariement d'ADN simple brin [single-strand annealing (SSA)] et la RH. Les deux derniers mécanismes reposent sur l'homologie de séquence pour guider la réparation alors que le NHEJ utilise peu ou pas du tout d'homologie (71). Ces voies de réparation sont conservées entre les espèces mais leur utilisation relative varie (72).

1.4.1 Recombinaison Homologue

Le RH utilise une région d'homologie extensive entre deux duplex d'ADN comme matrice pour re-synthétiser la séquence d'ADN située autour de 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 (71, 73). Elle est préférentiellement utilisée durant les phases S et G₂ du cycle cellulaire puisque la chromatide sœur est présente (74, 75). La RH peut être réciproque [crossover (CO)], où les deux molécules donnent et reçoivent de l'information génétique, ou non réciproque [conversion génique (CG)], dans laquelle la molécule endommagée reçoit de l'information génétique d'une molécule intacte qui demeure inchangée.

1.4.1.1 Étape d'initiation

Lors de l'initiation de l'événement de RH, par une CDB ou une CSB (76, 77), il y aura formation d'extrémités d'ADN 3' simple brin suite à la dégradation 5'→3' des extrémités de la cassure, probablement par le complexe protéique MRN, puisque la sous-unité MRE11 possède l'activité nucléolytique adéquate (78). Suite à l'exposition d'ADN simple brin, la protéine RPA (protéine de réplication A) est recrutée pour éviter la formation de structures secondaires (79). RAD52 a la capacité d'interagir avec RPA et a une grande affinité pour les extrémités d'ADN (Figure 4). Ces étapes sont communes avec l'événement de SSA. La compétition entre RAD52 et les protéines Ku du NHEJ, pour lier les extrémités de la CDB pourrait déterminer quelle voie de réparation sera employée, la RH/SSA ou le NHEJ, mais la façon dont ce choix est effectué demeure encore très controversé (80). L'étape suivante implique l'invasion d'un duplex d'ADN par l'extrémité 3' simple brin générée.

1.4.1.2 L'invasion RAD51-dépendante

La protéine RAD51 est une recombinaise de 37 kDa, essentielle à cette invasion. RAD51 interagit avec RAD52, qui augmente son affinité pour l'ADN, et remplace RPA sur l'ADN simple brin (81). RAD51 forme un filament nucléoprotéique hélicoïdal constitué de centaines de monomères sur l'ADN simple brin (82). RAD51 catalyse la recherche d'homologie, l'appariement et l'échange de brin ATP-dépendant, entre deux molécules d'ADN homologues. Cet événement entraîne le déplacement d'un brin pour ainsi former une boucle en forme de "D" et la formation d'un hétéroduplex d'ADN qui constitue un intermédiaire de recombinaison (83). La stabilité de l'intermédiaire est assurée par la synthèse d'ADN amorcée par l'extrémité 3' envahissante, ce qui débute l'échange d'informations génétiques (Figure 4)(84).

Une mutation dans le gène *RAD51* induit la mort embryonnaire (85-87). De plus, les cellules porteuses de telles mutations démontrent une hyper-sensibilité aux RI, de l'instabilité chromosomique, une accumulation de CDB durant la réplication et un arrêt du cycle cellulaire dans la phase G₂/M avant que les cellules entrent en apoptose. Ces observations reflètent l'importance de RAD51 dans la progression des fourches de réplication et la stabilité chromosomique en absence de dommages exogènes (88). Comme BRCA1 et BRCA2, la perte d'expression de RAD51 pourrait être un facteur important dans la prédisposition aux cancers héréditaires du sein et de l'ovaire, environ 30% des cancers du sein démontrent une diminution d'expression de cette recombinaise (48, 89). RAD51 est muté dans certains cancers du sein bilatéraux (90) et une perte d'hétérozygoté dans le locus de RAD51 ou RAD52 a été associé au développement du cancer du sein (91). La surexpression de la protéine RAD51, qui est suffisante pour stimuler la RH dans les cellules de mammifères (92), a également été associée au développement d'adénocarcinomes du pancréas (93) et de cancers du sein (94). Ces études suggèrent que la dérégulation de la RH, due autant à une augmentation qu'à une diminution de la fréquence, pourrait être impliquée dans la tumorigenèse et que les glandes mammaires sont particulièrement touchées en présence d'un défaut dans la RH.

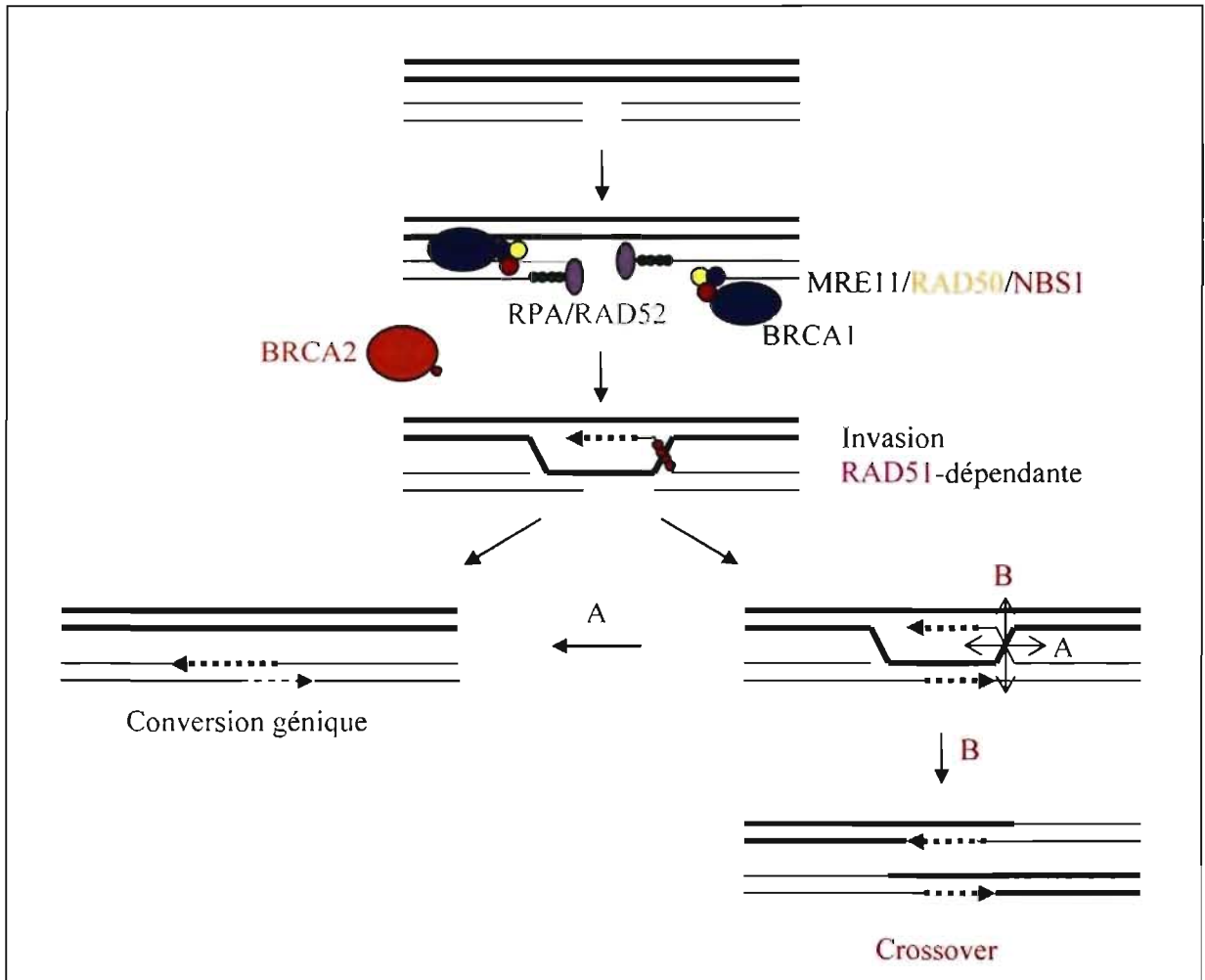


Figure 4: Modèle de réparation d'une cassure double brin par recombinaison homologue RAD51-dépendante. Les extrémités de la cassure double brin vont être dégradées par le complexe RAD50/MRE11/NBS1. Ce complexe interagit avec BRCA1 qui a la capacité de réguler son activité nucléolytique. Il y aura liaison de RPA sur l'ADN simple brin généré et de RAD52 sur les extrémités. La présence de RAD52 va favoriser le recrutement de RAD51 qui est régulé par BRCA2. On observe ensuite la formation du filament de nucléoprotéine par RAD51 et l'invasion. La synthèse va être amorcée par le brin receveur. L'intermédiaire de recombinaison ainsi formé pourra être résolu de différentes façons. Tout d'abord, le brin nouvellement synthétisé peut être libéré par des hélicases et retourner s'apparier avec l'extrémité 3' libre non-invasive, de manière à produire un événement non-réciproque de conversion génique. L'autre possibilité consiste dans l'appariement de l'extrémité 3' simple brin non-invasive avec le duplex homologue formant la boucle en forme de 'D' suivi de la synthèse pour ainsi former une jonction de Holliday. Cette intermédiaire de recombinaison peut être résolu de façon à générer un événement non-réciproque de conversion génique (A) ou en événement réciproque de crossover (B).

1.4.1.3 La résolution

Suite à l'invasion et à l'initiation de la synthèse d'ADN, il peut y avoir formation de jonctions de Holliday et résolution de celles-ci. Ces étapes de l'événement de réparation sont moins claires et plusieurs modèles ont été proposés au fil des années. Le modèle de Szostak *et al.* proposent que la deuxième extrémité 3' simple brin envahi également la molécule donneuse, soit par invasion RAD51/RAD52-dépendante, soit par appariement complémentaire, et forment un intermédiaire de recombinaison avec deux jonctions de Holliday (95). Théoriquement, la résolution de cet intermédiaire produit un ratio équivalent de CO et de CG (96). Cependant, la stabilité de leur génome indique que les cellules somatiques de mammifères ont développé un mécanisme qui inhibe la formation des CO et canalise ainsi la réparation des CDB vers la CG, mais la nature de ce mécanisme demeure inconnue (97-99). Effectivement, les événements de CO durant la mitose sont très rares et représentent moins de 7% des événements totaux. Le modèle de "one-sided invasion" a donc été proposé (99). Dans ce modèle, une des deux extrémités de la cassure envahit la molécule donneuse et amorce la synthèse d'ADN. L'intermédiaire ainsi produit peut donc être résolu en CG suite au relâchement de la molécule nouvellement synthétisée probablement à l'aide d'une hélicase et son appariement à la molécule non-envahissante de départ (Figure 4). Une autre possibilité implique l'appariement de l'extrémité 3' non-envahissante avec le duplex d'ADN formant la boucle en 'D'. Cet appariement va conduire à la formation d'une jonction de Holliday (100). La résolution de cet intermédiaire peut s'effectuer en coupant les brins internes croisés pour produire un événement non-réciproque de CG (Figure 4A) ou en coupant les brins externes et ainsi produire un événement réciproque de CO (Figure 4B). Dans ce modèle, la proportion de CG n'est pas seulement dépendante de la résolution de jonctions de Holliday mais aussi du dénouement du brin nouvellement synthétisé, ce qui pourrait expliquer le ratio non équivalent entre les deux types d'événements observés (99). L'hélicase BLM, déficiente dans le syndrome de Bloom, a effectivement un rôle dans l'inhibition de la formation des jonctions de Holliday et en son absence, les échanges réciproques entre chromatides sœurs sont observés plus fréquemment, ce qui appuie un tel modèle (101).

1.4.1.4 Importance de la recombinaison homologue

La RH est un processus très important pour la survie et l'évolution de tous les organismes. Durant la méiose, la RH assure la ségrégation ordonnée des chromosomes homologues suite à la formation de jonctions de Holliday ou de chiasmés, qui sont des intermédiaires de recombinaison ayant pour but de maintenir les chromosomes dans un alignement adéquat. De plus, la résolution de ces intermédiaires provoque la répartition des gènes parentaux sur les chromosomes et un réassortiment des allèles, créant ainsi la diversité génétique (102, 103). Durant la mitose, la RH permet de réparer les CDB et de réinitier la fourche de réplication (104). Toutefois, malgré son rôle capital dans la reproduction, l'évolution de l'espèce et la prolifération, la RH comporte certains risques.

1.4.1.5 Risques associés à la recombinaison homologue

Les événements de CO durant la mitose peuvent être mutagéniques si ils ne surviennent pas entre les chromatides sœurs correctement alignées, conduisant à des inversions de séquences, à des délétions ou à des translocations, ce qui contribuerait à l'instabilité génomique et à la transformation néoplasique (105). La CG, quant à elle, est habituellement considérée comme étant conservative mais uniquement lorsque le substrat utilisé comme matrice est 100% homologue et bien aligné. Toutefois, malgré qu'ils soient unidirectionnels, les événements de CG ne sont pas non plus exempts de risques puisqu'un tel événement peut causer l'inactivation d'un gène lorsqu'il survient entre les séquences répétées homologues d'un gène et d'un pseudo-gène, entre deux chromatides sœurs mal alignées, entre deux hétéroallèles ou entre des chromosomes non-homologues. Ces événements peuvent donc être impliqués dans la perte d'hétérozygoté. L'hyperconversion génique a déjà été associée à la perte d'hétérozygoté du gène du Rétinoblastome (RB) durant le processus de carcinogenèse, à l'inactivation de p53 par RH entre le gène et un pseudo-gène ou entre p53 et des séquences répétitives (106-108). Le SSA peut également être responsable de délétions de régions plus ou moins étendues situées entre deux régions d'homologies ainsi que de la délétion de l'une d'elles. De plus, les événements de glissement lors de la réplication des chromatides sœurs [sister chromatid replication slippage (SCRS)], un processus apparenté à la RH, peuvent entraîner des délétions (perte d'hétérozygoté) ou des duplications (amplification

génique) lorsque les chromatides sœurs sont mal alignées ou lorsqu'ils surviennent entre des séquences répétitives. Ce mécanisme peut également donner naissance à des translocations lorsqu'il survient entre des séquences homologues situées sur des chromosomes hétérologues. Ces produits, en plus d'être source d'instabilité chromosomique, peuvent former des chromosomes acentriques (délétion) ou dicentriques (duplication) qui seront dans l'incapacité de ségréguer correctement lors de la mitose et qui culmineront dans des défauts de ploïdie. Un excès de RH entraîne donc une augmentation des risques associés, ce qui confirme la nécessité de bien contrôler ce mécanisme afin d'assurer la stabilité du génome.

Les risques inhérents à la RH soulignent l'importance de la cohésion et de l'alignement adéquat entre les chromatides sœurs. Effectivement, la RH utilise préférentiellement comme substrat la chromatide sœur non endommagée puisqu'il s'agit d'un substrat 100% homologue. Pour que l'événement puisse s'effectuer adéquatement, sans que de l'information génétique ne soit perdue, ajoutée ou relocalisée, il faut que les chromatides sœurs soient bien alignées et en étroite proximité. Cette proximité est établie par la cohésion, une liaison physique entre les chromatides sœurs, au moment de leur synthèse en phase S jusqu'à leur séparation durant l'anaphase. Le complexe de cohésine contient entre autre deux ATPase, les SMC 1 et 3 (maintien de la structure chromosomique). Ces protéines sont chargées sur l'ADN et maintiennent les chromatides sœurs bien alignées et ce, jusqu'à l'entrée en anaphase où la séparase dégradera le complexe de cohésines (Figure 5). L'établissement de la cohésion est nécessaire à la ségrégation adéquate des chromosomes (109). De plus, la cohésion est étroitement couplée au processus de réplication et pourrait s'établir à proximité des fourches de réplication, une étape essentielle afin de limiter les réarrangements associés au SCRS.

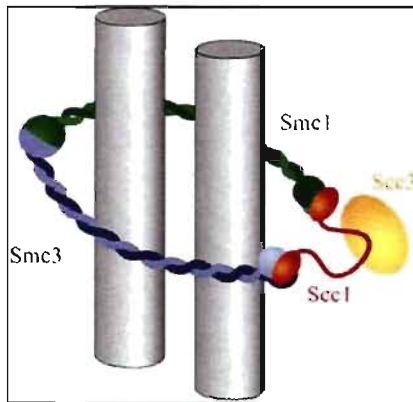


Figure 5. Le complexe de cohésines.

Les cohésines SMC1 et SMC3 font parti du complexe chargé de maintenir les chromatides sœur en étroite proximité et bien alignées. La cohésion est essentielle afin d'éviter les glissements lors de la réplication et favoriser le choix du partenaire adéquat lors de la RH afin de maintenir la stabilité du génome.

(<http://www.sciencemag.org/feature/data/prizes/gen/2004/haering.dtl>)

Consistant avec l'importance de la cohésion dans la réparation de l'ADN par RH, il a été établi que les protéines impliquées dans la cohésion, telles que le complexe de cohésines, sont essentielles pour la réparation des CDB. La première indication qui a relié la cohésion à la réparation des dommages à l'ADN est l'hyper-sensibilité aux RI des cellules mutées dans le complexe SMC. Cette hyper-sensibilité est observée dans tous les organismes testés, de la levure à l'humain (110-112). Le chargement *de novo* des cohésines au site de CDB est essentiel pour la réparation par RH des dommages induits par les RI mais non pour le processus de NHEJ, ce qui suggère que le maintien des chromatides sœurs en étroite proximité confère un biais vers la RH au détriment des autres mécanismes de réparation (110, 113). De plus, l'inhibition transcriptionnelle d'un cofacteur de SMC1/SMC3, SCC1, entraîne une diminution d'échange entre les chromatides sœurs et une augmentation des anomalies chromosomiques dans les cellules de poulet (114). Ces résultats ont été confirmés par l'observation d'une augmentation de la RH intrachromatide ou de la recombinaison ectopique lors d'un défaut dans la cohésion, ce qui suggère que le choix du partenaire est grandement affecté par la cohésion (115). Ces observations soulignent l'importance de la cohésion adéquate entre les chromatides sœurs afin de minimiser les risques de réarrangements chromosomiques reliés à la RH en favorisant l'utilisation de la chromatide sœur comme substrat de recombinaison pour ainsi contribuer au maintien de la stabilité du génome.

L'organisation de la chromatine peut également accentuer les risques associés à la RH. Effectivement, chez les eucaryotes, le génome est compartimenté en divers domaines par une série de boucles d'ADN reliées à la matrice nucléaire (Figure 6). Ces régions, qui varient en taille de 25 à 200 kpb, sont d'une importance particulière dans la régulation des différents processus cellulaires fondamentaux. Leur nature dynamique implique une modification dans le temps de leurs points d'ancrage au cours du cycle cellulaire, selon leur fonction (116, 117). Une quantité croissante d'évidences suggèrent que la réplication, la réparation et la transcription auraient lieu dans des foci reliés à la matrice nucléaire qui représenteraient un point de rencontre des différentes machineries cellulaires (118). La RH n'échappant pas à cette règle, plusieurs protéines impliquées dans ce mécanisme ont été retrouvées en association avec la matrice nucléaire telles que : BLM, RPA, les protéines mutées dans l'anémie de Fanconi et RAD51 (97, 119-121). L'induction de dommages à l'ADN par RI ou mitomycin C accentue la fraction de ces protéines liées à la matrice nucléaire (122, 123). De plus, les protéines BRCA1 et BRCA2 se trouvent en interaction avec la matrice nucléaire (124) et la réparation des pontages entre les brins d'ADN y aurait également lieu (125). Ces données suggèrent fortement que la RH pourrait avoir lieu aux points d'ancrage de la matrice nucléaire, une région de rapprochement entre des régions d'ADN de séquences éloignées. La proximité entre des séquences homologues entraîne une augmentation de la fréquence de recombinaison (126). La RH entre ces séquences éloignées pourrait expliquer les larges réarrangements chromosomiques souvent observés dans le cancer (26).

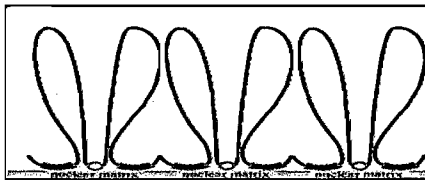


Figure 6. Organisation de la chromatine.

Les boucles d'ADN sont reliées à la matrice nucléaire, ce qui implique le rapprochement de régions d'ADN qui sont éloignées en séquences

En plus de l'organisation de la chromatine, on retrouve également comme facteur de risque dans le génome, une grande proportion de séquences répétitives. Effectivement, près de la moitié du génome est constitué de séquences répétitives (127). On y retrouve par exemple plus de 10^6 séquences Alu (128). Les séquences répétitives sont hautement recombino-géniques. Il a été démontré que les séquences Alu sont associées à l'induction de translocations (127) et que les séquences LINE peuvent être utilisées pour réparer une CDB survenue dans une séquence homologue (129). La RH non allélique impliquant les séquences répétitives est donc un mécanisme possible de réarrangements chromosomiques (Figure 7). Compte tenu de leur importance dans la stabilité du génome, ces séquences ont été associées à divers réarrangements impliqués dans des maladies humaines. Parmi les mieux connus, on retrouve la délétion médiée par les séquences Alu dans le locus du récepteur LDL responsable de l'hypocholestérolémie et les réarrangements impliquant le locus MLL, fréquents dans la leucémie myéloïde aiguë (105, 130). Vu leur ubiquité et leur capacité d'instaurer de l'instabilité, on peut se demander comment le génome réussit à conserver son intégrité malgré la présence de toutes ces séquences répétitives. Plusieurs de ces séquences ont accumulé une série de mutations neutres, ce qui a contribué à l'établissement d'un certain degré de divergence de séquence. Les séquences à plus forte proportion de divergence sont moins susceptibles d'être utilisées comme matrice lors du processus de RH et ce mécanisme de surveillance implique le système de MMR (131)(Annexe I).

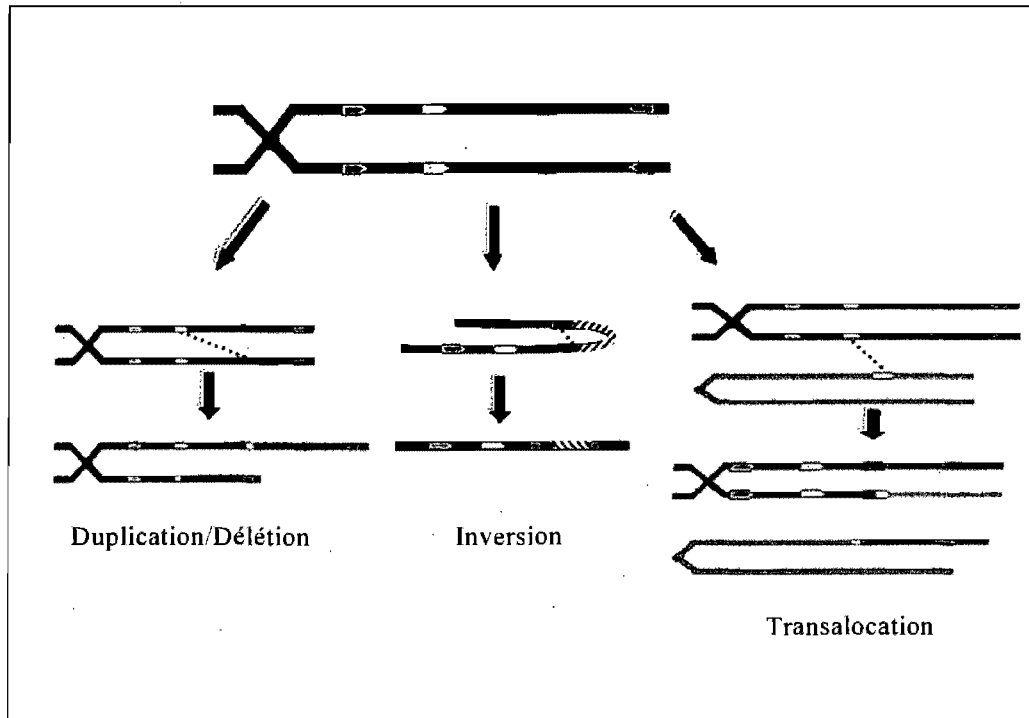


Figure 7. Exemples d'instabilité génomique générée par la recombinaison homologue entre des séquences répétitives. La recombinaison entre les séquences répétitives, combinée au mauvais alignement des chromatides sœurs, peut entraîner une duplication sur une chromatide et une délétion sur l'autre. Deuxièmement, la recombinaison intra-chromatide peut générer une inversion de la séquence entre les éléments répétés. Finalement, la recombinaison entre deux chromosomes hétérologues peut entraîner la formation d'une translocation. Les séquences répétées homologues peuvent donc être à la base de réarrangements chromosomiques (modifié de 132).

Plus du tiers du génome humain est composé de séquences répétitives et ces séquences peuvent promouvoir des réarrangements chromosomiques en stimulant la RH autre qu'entre chromatides sœurs (133-136). Ces réarrangements entre des boucles d'ADN, effectués à l'échelle du génome entier à partir des séquences répétitives, pourraient introduire de larges délétions, insertions ou inversions et ainsi être impliqués dans l'instabilité génomique. Produits dans les loci *BRCA1* ou *BRCA2*, ces réarrangements pourraient entraîner la perte d'hétérozygotie. En accord avec cette hypothèse, jusqu'à 23% des mutations dans *BRCA1* et *BRCA2* sont représentées par de larges réarrangements chromosomiques médiés par RH entre des séquences répétitives Alu et LINE (137).

1.4.1.6 Systèmes de mesure de la recombinaison homologue

La RH mitotique est un événement rare et ayant pour but de réparer une lésion sans entraîner d'altérations dans le génome. Certains outils ont donc dû être mis au point afin de faciliter l'étude de ce mécanisme de réparation difficilement observable. Parmi ceux-ci on retrouve la mesure de la résistance aux agents capables d'induire des lésions qui nécessitent la RH pour être réparées (RI, mitomycin C), la visualisation des échanges entre les chromatides sœurs (SCE) et l'utilisation de plasmides rapporteurs.

1.4.1.6.1 Échanges entre les chromatides sœurs

Durant la phase S, l'ADN est répliqué et chaque chromosome se trouve dupliqué en deux chromatides sœurs qui sont reliées entre elles par le centromère et le système de cohésines. Les SCE surviennent de façon naturelle lorsque la fourche de réplication rencontre un dommage. Le mécanisme exact causant les SCE demeure mal connu mais les CSB, lorsque rencontrés par la fourche de réplication, ont le pouvoir d'induire de façon importante les SCE, tel que démontré en figure 8. Généralement, les conditions qui augmentent l'incidence de CSB augmentent le niveau de SCE, incluant un défaut de PARP-1, XRCC1 ou une exposition au peroxyde d'hydrogène et à l'hydroxyurée (138-141). Le niveau de SCE serait proportionnel à la quantité de dommages infligés à l'ADN. La visualisation des SCE permet donc d'étudier le potentiel mutagène d'un agent chimique puisqu'il a été démontré que le taux de mutations du gène *HPRT* corrèle avec le niveau de SCE (142). Les agents pontants les brins d'ADN tels que la mitomycin C sont également de très puissant inducteurs de SCE, probablement parce que les SCE sont nécessaires à réparer la fourche de réplication qui se brise suite à la rencontre de ces liaisons interbrins d'ADN (143). Effectivement, les SCE sont directement reliés à la présence de fourches de réplication actives puisque des dommages induits en phases G₂ ne montrent un niveau élevé de SCE qu'après une ronde supplémentaire de réplication (144).

La RH serait vraisemblablement un des mécanismes par lequel apparaîtrait les SCE puisque, lorsqu'on diminue l'expression de protéines essentielles à la RH comme RAD51, on observe une diminution de SCE, alors que chez les mutants dans le mécanisme de NHEJ, les SCE ne sont pas affectés (145). Le niveau de SCE est donc

proportionnel au niveau de dommages subit par l'ADN, en plus d'être un indicateur de la quantité de RH. L'événement de SCE est nécessaire au redémarrage des fourches de réplication en plus d'être en grande partie conservatif lorsque la cohésion et l'alignement des chromatides sœurs sont adéquatement maintenus. Toutefois, dans le cas contraire, particulièrement en présence de séquences répétitives, le redémarrage d'une fourche de réplication peut entraîner certains réarrangements chromosomiques compte tenu des risques associés à la RH. L'utilisation excessive de SCE peut donc être à l'origine de l'instabilité génomique d'où l'importance d'une régulation efficace.

Il est possible de visualiser le nombre d'événements de SCE en marquant le brin nouvellement synthétisé à l'aide de 5'bromodéoxyuridine (BrdU). Cet analogue de base inhibera la liaison subséquente de colorant nous permettant ainsi de distinguer à quel niveau un échange de brin s'est produit.

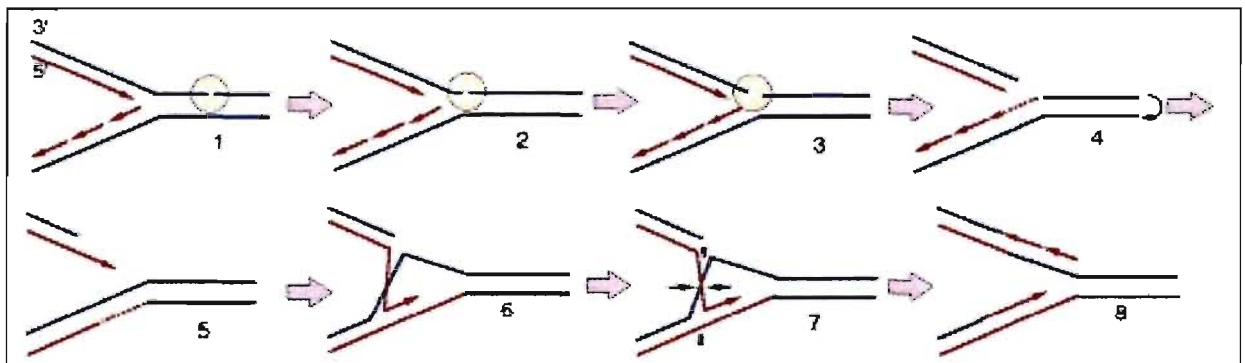


Figure 8. Mécanisme d'apparition des échanges entre chromatides sœurs. Lorsque la fourche rencontre un dommage à l'ADN, elle se brise (étapes 1-3). Il y a synthèse d'ADN sur la chromatide non endommagée (étape 4; entre l'étape 4 et 5 il y a modification conformationnelle du schéma pour faciliter la compréhension). Par la suite il y a formation d'une extrémité d'ADN 3' simple brin nécessaire à initier l'événement de RH (étape 5). Il va y avoir invasion RAD51-dépendante (étape 6) et par la suite résolution de la jonction de Holliday (étape 7) pour que la fourche redevienne fonctionnelle (étape 8). La résolution peut s'effectuer dans le sens des flèches vertes pour donner lieu à un SCE. Si elle se produit à la verticale (dans le sens des flèches mauves), on n'observera pas d'échanges visibles par la technique utilisant le 5'bromodéoxyuridine. (146)

1.1.1.6.2 Plasmides rapporteurs

En plus des SCE, il existe différentes méthodes pour étudier la RH. La RH a longtemps été étudiée à l'aide de plasmides extrachromosomiques dans lesquels on peut ou non introduire une CDB. Malgré sa rapidité, ses fréquences élevées et sa facilité d'analyse, cette technique révèle des lacunes évidentes puisqu'elle fait complètement abstraction de la structure de la chromatine. Afin d'outrepasser cet inconvénient majeur, malgré son caractère laborieux, l'utilisation de plasmides intrachromosomiques est préférable. Il est désormais possible d'introduire une CDB à un site prédéterminé dans le génome. L'endonucléase I-SceI, une enzyme de *Saccharomyces cerevisiae*, reconnaît un site de clivage de 18 paires de bases qui peut être introduit dans un plasmide. Compte tenu de la longue taille du site de restriction, la probabilité de retrouver le site I-SceI dans le génome des mammifères est très mince (147). Le système I-SceI est donc un outil très utile pour étudier les voies de réparation des CDB dans les cellules de mammifères à un locus donné. En effet, l'induction d'une CDB par I-SceI stimule la RH et non-homologue de 100 à 10 000 fois (148).

La mesure de la RH est basée sur l'utilisation de séquences répétées homologues. Ces séquences, en orientations directes ou inversées (147), composées de deux copies non-fonctionnelles d'un même gène, permettent de mesurer le nombre d'événements de recombinaison qui survient puisqu'ils vont recréer un gène de sélection fonctionnel. La recombinaison entre ces deux régions homologues peut s'effectuer de différentes manières et être mesurée grâce au gène de sélection, dans notre cas, la Puromycin acétyltransférase (*Puro*) qui, lorsque fonctionnelle, conduit à la résistance à la drogue Puromycin ($Puro^R$). La première répétition de *Puro* est inactive due à la délétion de son promoteur (*Puro-5'*) et la seconde copie due à l'intégration du site I-SceI doublée d'une délétion de quatre paires de bases empêchant la détection du NHEJ. Ces deux régions homologues se retrouvent en orientation directe ou inversée. Entre elles, il se trouve un marqueur d'intégration, le gène de résistance à la drogue Hygromycin (*Hyg*)(Figure 9). La CG laisse intacte la structure générale du locus pour les répétitions inversées et directes. Par contre, lors du CO, il y a inversion de la séquence entre les répétitions inversées et délétion de la séquence entre les répétitions directes. Le SSA ne peut se faire qu'en présence de répétitions directes et génère une délétion (Figure 9). Parmi ces

différents mécanismes de recombinaison, seule la CG et le CO ont la capacité de régénérer un marqueur de sélection fonctionnel en présence de CDB ou non. Le SSA nécessite absolument la présence d'une CDB pour initier l'événement de RH RAD51-indépendant et le SCRS peut se produire en absence de RAD51 et de CDB. Durant la réplication, ce dernier mécanisme produira une triplication, non détectable dans notre essai, et la délétion de la séquence entre les régions d'homologies qui elle est détectable (Figure 9).

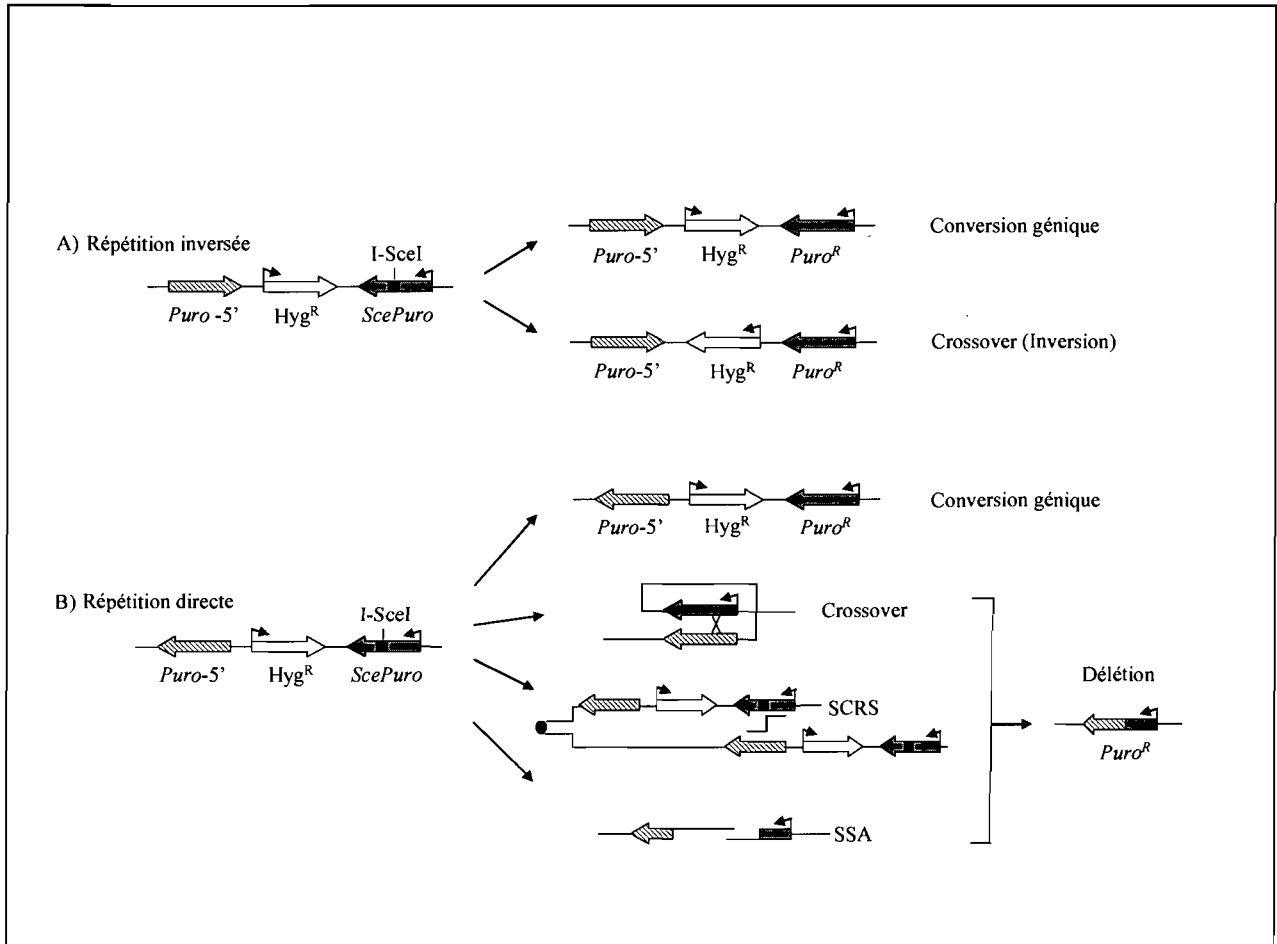


Figure 9. Recombinaison entre séquences répétées directes ou inversées. Un événement de RH spontané ou induit par une CDB reconstitue un gène fonctionnel de résistance à la Puromycine (*Puro^R*) par la perte du site *I-SceI*. A) Pour les répétitions inversées, la conversion génique restaure un marqueur fonctionnel sans affecter la structure globale du locus alors que le crossover conduit à l'inversion de la séquence entre les répétitions (le marqueur d'intégration *Hygromycine*). B) Pour les répétitions directes, l'événement de conversion génique maintient la structure du locus intacte alors qu'une délétion peut être introduite par crossover RAD51-dépendant, par appariement simple brin (single-strand annealing [SSA]) ou glissement lors de la réplication des chromatides soeurs (sister-chromatid replication slippage [SCRS]), tous deux RAD51-indépendants.

1.4.1.7 Importance de BRCA1 dans la recombinaison homologue

L'étape initiale de réponse aux dommages à l'ADN implique la détection du dommage et la transduction de signaux vers les effecteurs cellulaires pour conduire à l'arrêt du cycle cellulaire et à la réparation. La phosphorylation de l'histone H2AX est un

des événements précoces qui survient de 1 à 3 minutes suite à l'induction des dommages et qui nécessite la présence d'ATM (149). Cette phosphorylation est importante pour le recrutement (en moins de 30 minutes) et surtout la rétention de BRCA1 (jusqu'à 8 heures) aux foci nucléaires suite aux dommages à l'ADN (150). Consistant avec ce rôle, les lignées cellulaires déficientes en H2AX démontrent une incapacité à maintenir des foci de BRCA1 stables suite aux dommages à l'ADN (151). RAD51 et le complexe MRN peuvent tous deux colocaliser avec l'histone phosphorylée suite aux dommages à l'ADN dans des foci distincts (152) mais cette relocalisation semble reposer sur la présence de BRCA1 et est postérieure au recrutement de celui-ci (153, 154). Tout ceci suggère que BRCA1 pourrait peut-être sélectionner le recrutement ou l'activation de l'une ou l'autre de ces protéines selon le type ou l'étape de réparation à effectuer et placerait BRCA1 au cœur du processus de détection des dommages (155).

Les protéines kinases ATM et ATR sont également des éléments centraux de la voie de réponse aux dommages à l'ADN puisqu'elles phosphorylent des protéines effectrices, incluant BRCA1. La fonction de BRCA1 en réponse à ces signaux est très variée mais la phosphorylation par ATM des Ser1387, Ser1423 et Ser1524 est nécessaire pour antagoniser l'hyper-sensibilité aux RI des cellules BRCA1-déficientes, ce qui démontre l'importance de la phosphorylation de BRCA1 par ATM dans la réponse adéquate aux CDB (156, 157). De plus, ATR, qui est activée suite aux radiations ultraviolettes (UV) et à l'hydroxyurée, phosphoryle BRCA1. Ceux-ci colocalisent en phase S, suite aux dommages à l'ADN et aux traitements avec des agents capables d'arrêter la fourche de réplication, impliquant BRCA1 dans la réponse aux dommages à l'ADN et aux stress réplicatifs (158). Inversement, la présence de BRCA1 est nécessaire à l'activation adéquate d'ATM et d'ATR, ce qui place BRCA1 au cœur de la voie de signalisation des dommages à l'ADN (159).

De plus, suite aux RI, ATM phosphoryle et active CHK2 qui phosphoryle à son tour BRCA1 (160). BRCA1 et CHK2 interagissent et colocalisent dans des foci nucléaires qui se dispersent suite aux RI. La phosphorylation de BRCA1 sur la Ser988 par CHK2 est essentielle à la séparation de ces deux protéines pour la dispersion de ces foci et à la résistance aux RI (160). La phosphorylation de ce résidu a récemment été démontrée favorisant la réparation d'une CDB site-spécifique par RH (161). La phosphorylation de

BRCA1 par les différentes kinases responsables de la détection des dommages implique sûrement une combinaison différente de résidus selon le type de stimuli, ce qui pourrait expliquer les multiples fonctions de BRCA1 (158, 162).

L'interaction avec un autre partenaire de BRCA1 a également été démontrée favorisant la réparation d'une CDB par RH. En effet, l'utilisation d'un BARD1 dominant-négatif qui a conservé sa capacité à lier BRCA1, affecte l'aptitude de la cellule à réparer une CDB site-spécifique, en plus d'inhiber la résistance à la mitomycin C (55). De plus, les lignées cellulaires ou les souris mutées pour BRCA1 ou BARD1 ont des phénotypes identiques, ce qui contribuerait à indiquer une fonction similaire (163, 164). La liaison entre BRCA1 et BARD1 a été démontrée dans divers systèmes expérimentaux et représente probablement la forme principale de BRCA1.

De plus, il est établi que le C-terminal de BRCA1 interagit avec la kinase c-ABL. Suivant une exposition aux RI, cette interaction est inhibée de façon ATM-dépendante et c-ABL est activée. *In vitro*, c-ABL a la capacité de phosphoryler BRCA1 et RAD51 (165) et la phosphorylation de RAD51 inhiberait son activité de recombinaison (166), probablement en inhibant l'interaction entre les différents monomères, ce qui disloquerait le filament de nucléoprotéines (167). Par contre, *in vivo*, la phosphorylation de RAD51 par c-ABL semble essentielle à la réparation des CDB et à la résistance aux agents pontants l'ADN (168). Effectivement, la formation des foci RAD51 suite à l'induction de dommages à l'ADN dépend de la phosphorylation de RAD51 par c-ABL (166). Les cellules déficientes en BRCA1 démontrent une hyper-activité de c-ABL qui n'est pas accrue par l'exposition aux RI (165).

En plus de la signalisation, BRCA1 peut jouer un rôle à diverses étapes de l'événement de RH. Effectivement, BRCA1 peut être impliqué dans l'étape d'initiation en régulant l'activité du complexe MRN (171). Ce complexe dégrade les extrémités de la CDB pour générer de l'ADN simple brin, un substrat pour RAD51. En inhibant cette activité nucléolytique, BRCA1 pourrait réguler la taille du fragment d'ADN simple brin, donc le choix du mécanisme de réparation, et indirectement réguler l'activité de RAD51. Cette hypothèse pourrait expliquer le rôle de BRCA1 dans le NHEJ et le SSA, deux mécanismes potentiellement déficients en absence de BRCA1, puisque l'activité de ce complexe est aussi essentielle à ces événements de réparations (Figure 10).

Effectivement, en plus d'être directement impliqué dans la réparation des CDB par RH, BRCA1 semble nécessaire à la réparation par SSA chez la souris (172), ce qui placerait la fonction de BRCA1 en amont de la décision entre ces deux mécanismes de réparation (170).

Il est également possible que BRCA1, qui forme des foci nucléaires avec BRCA2 ainsi qu'avec RAD51 et interagit directement avec BRCA2, puisse réguler la localisation/activité de RAD51 et donc l'étape d'invasion (169, 170). BRCA1 pourrait aussi réguler la résolution de la jonction de Holliday puisqu'il interagit avec BLM et MSH2, tous deux impliqués à cette étape (84). Le portrait global émergent place donc BRCA1 à l'intersection des différentes voies de réparation de l'ADN en tant que senseur des dommages et adaptateur requis pour le recrutement des protéines essentielles à la réparation tels que RAD51 et BRCA2 (Figure 10)(155).

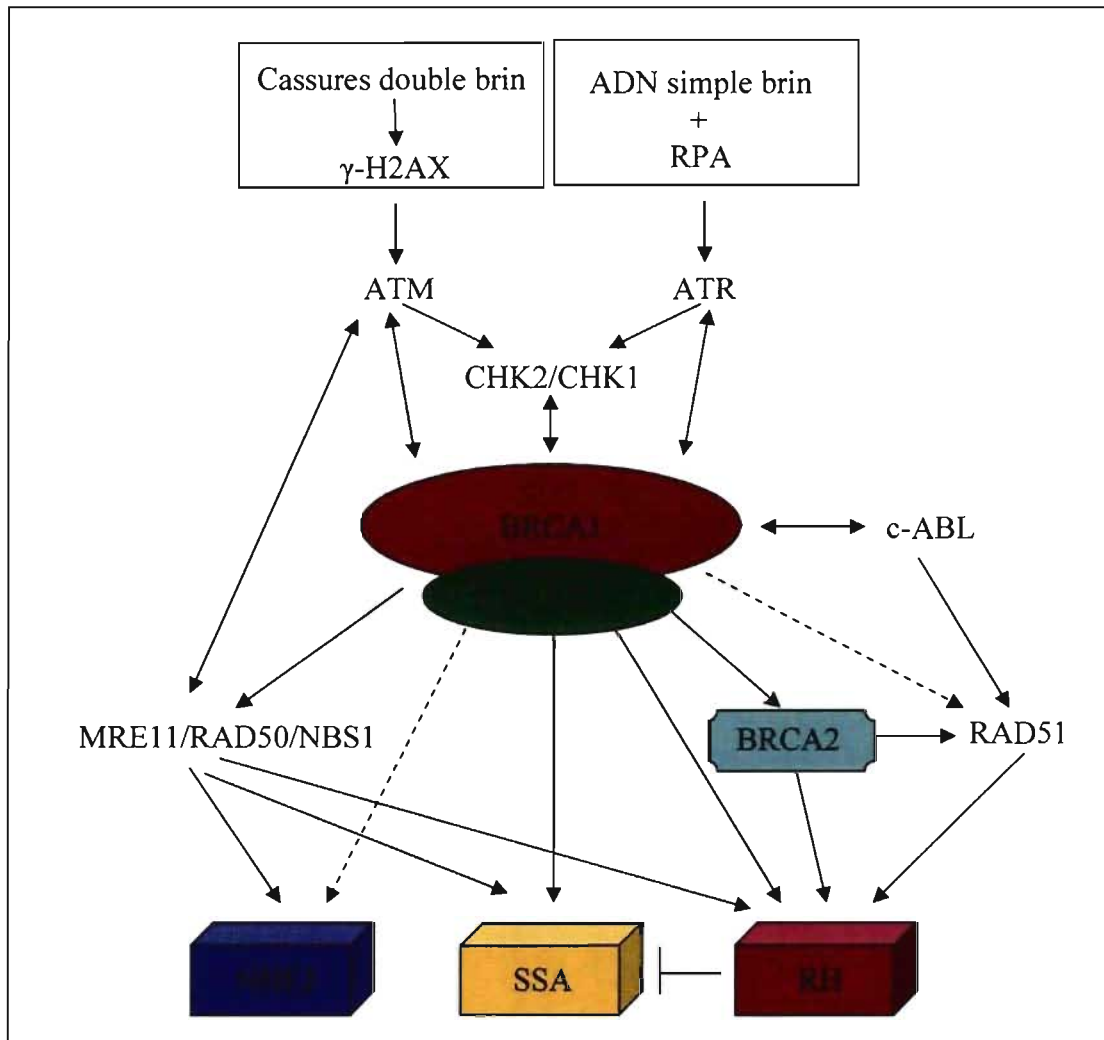


Figure 10. Fonctions de BRCA1 dans la signalisation/réparation des dommages à l'ADN. Suite à l'induction de dommages à l'ADN, BRCA1 sera phosphorylé par les kinases impliquées dans la détection des différents types de dommages. Après son activation, BRCA1 favorisera la réparation de l'ADN via son interaction avec les différentes protéines impliquées principalement dans la recombinaison. (Abréviations : NHEJ, recombinaison non-homologue [non homologous end joining]; SSA, appariement simple brin [single-strand annealing]; RH, recombinaison homologue)

Finalement, BRCA1 pourrait être impliqué dans la cohésion entre les chromatides sœurs. Effectivement, il a été démontré que suivant l'induction d'une CDB, les cohésines sont recrutées aux sites de lésions marqués par l'histone H2AX phosphorylée et s'étendent de 50 à 100 kpb autour de la lésion (173). Suite aux RI ou aux UV, les composants du complexe de cohésine SMC1/SMC3 colocalisent avec l'histone phosphorylée mais aussi avec BRCA1, MRE11, NBS1, ATM et ATR (174). SMC1 est également phosphorylée par ATM et ATR suite aux dommages à l'ADN (175-177) et cette phosphorylation est essentielle à la résistance à ces dommages (175, 176). L'absence de SMC1 confère un phénotype similaire à une déficience en ATM, ce qui confirme qu'il s'agit d'un substrat clé d'ATM dans la voie de réparation des dommages à l'ADN (174). De plus, la phosphorylation par ATM nécessite la présence de NBS1, un composant du complexe MRN et la présence de BRCA1 (176). Il faut également noter que RAD50, partie intégrante du complexe MRN, démontre des caractéristiques similaires aux protéines SMC (110). Ces observations démontrent l'importance possible de BRCA1 dans le mécanisme de cohésion via l'activation du complexe SMC1/SMC3.

Il est établi qu'en plus de sa fonction dans la ségrégation des chromosomes et la réparation des dommages causés à l'ADN, un autre complexe de SMC, SMC5/SMC6 aurait une fonction dans le redémarrage des fourches de réplication arrêtées (178). Les mutants dans SMC5/SMC6 sont hyper-sensibles aux divers agents capables d'endommager l'ADN et cette sensibilité est épistasique aux protéines impliquées dans la RH, ce qui suggère que ce complexe de SMC joue également un rôle dans la RH (179). En leur absence, on observe l'apparition de chromosomes avec des structures en branches (178), potentiellement des structures de recombinaison aberrantes, suivant le redémarrage des fourches de réplication. BRCA1 a la capacité de lier l'ADN avec une préférence pour de telles structures. Les mutants de SMC5/SMC6 démontrent des réarrangements chromosomiques majeurs qui peuvent être supprimés par une délétion de RAD51 (180), ce qui suggère fortement que la présence du complexe SMC favorise l'utilisation de la RH entre les chromatides sœurs et qu'en son absence, l'utilisation d'autres matrices pour la RH entraîne de l'instabilité génomique. Aucune évidence relie définitivement BRCA1 au complexe SMC5/SMC6 mais il semble que ce complexe soit impliqué dans le recrutement du complexe de cohésine SMC1-SMC3 aux dommages à l'ADN (181).

Puisque BRCA1 est directement impliqué dans la phosphorylation de SMC1, il est donc possible que BRCA1 affecte la cohésion entre les chromatides sœurs à différent niveau, autant lors de la réparation de CDB que lors de la réplication, et que cette fonction affecterait directement la RH donc la stabilité du génome.

En résumé, BRCA1 est d'une importance capitale dans la régulation de la RH et son rôle ne semble pas être attribuable à une seule fonction spécifique mais plutôt être pléiotropique.

1.4.1.8 Implication de BRCA2 dans la recombinaison homologue

Pour ce qui est de BRCA2, il est clair que son rôle dans la RH passe entre autre par son interaction directe avec RAD51. Comme nous l'avons mentionné précédemment, BRCA2 colocalise avec RAD51 et celui-ci a la capacité de s'accumuler en foci nucléaires durant la phase S et suite aux dommages à l'ADN. La formation de ces foci semble fonctionnelle lors de la phase S dans les cellules BRCA2-déficientes mais altérée suite aux RI (182). Cette observation démontre que BRCA2 n'est pas requis pour la formation des foci RAD51 en soit, ce qui suggère que l'assemblage de tels foci utilise des voies différentes selon le stimulus et que BRCA2 serait requis précisément pour l'assemblage de la recombinaise aux sites de dommages induits par les RI (182). La visualisation dynamique de la localisation de RAD51 a révélé qu'environ 20% du RAD51 cellulaire se trouve dans une fraction liée à BRCA2. Le 80% restant se trouve sous forme d'oligomères ou de monomères (183). Suite à l'induction de l'arrêt des fourches de réplication par l'hydroxyurée, c'est la fraction liée à BRCA2 qui sera mobilisée dans le noyau (183). De plus, dans les cellules BRCA2-déficientes, les fourches de réplication en arrêt ont tendance à se démanteler et donc à se transformer en CDB (184). Ces résultats suggèrent que l'interaction entre BRCA2 et RAD51 est critique pour la fonction biologique de ces deux molécules.

Cette interaction est médiée entre autre par les domaines BRC. Ces régions répétées ont la capacité de lier RAD51 sur des domaines distincts, ce qui démontre que les liaisons de chaque BRC ne sont pas équivalentes (185). La structure cristallographique du domaine BRC4 de BRCA2 lié à RAD51 a révélé que BRCA2 lierait plusieurs molécules de RAD51 sous la forme de monomères et inhiberait ainsi leur

multimérisation (186). Cette étape de multimérisation est nécessaire au chargement sur l'ADN pour constituer le filament de nucléoprotéines et catalyser l'invasion d'un duplex d'ADN pour initier l'échange d'information génétique lors de la RH. En plus d'y retrouver des mutations associées au cancer, l'importance des domaines BRC pour le rôle de BRCA2 dans la RH a été illustrée par la découverte que la surexpression du seul motif BRC4 *in vivo* bloque la formation de foci RAD51 suite aux dommages à l'ADN et empêche sa multimérisation, ce qui rend les cellules hyper-sensibles aux RI et aux cisplatine, un autre agent pontant l'ADN (187, 188). Les BRC3 et BRC4 ont également la capacité de s'associer au filament de nucléoprotéines. À forte concentration, ils ont la capacité de dissocier ce complexe RAD51-ADN préformé (188), ce qui suggère que BRCA2, en plus de lier les monomères de RAD51, peut lier le filament ADN-RAD51 et pourrait donc avoir un rôle dans la dissociation du filament RAD51 à la fin de l'événement de RH comme dans la formation de celui-ci au moment de l'initiation (48).

Chez *Ustilago maydis*, le complexe BRCA2/DSS1 catalyse le chargement de RAD51 à partir de la jonction ADN double brin/ADN simple brin recouvert de RPA en présence de CDB ou d'un espace simple brin, ce qui suggère que l'ADN simple brin recouvert de RPA seul peut servir de substrat à la RH (189). Cette fonction est similaire à celle observée chez *Escherichia coli* pour le complexe RecFOR, un complexe qui charge RecA (homologue de RAD51) sur l'ADN simple brin (gap) généré lors de la réplication en présence de lésions sur l'ADN (190). De plus, DSS1 est nécessaire à la résistance aux RI, aux UV et au maintien de la stabilité du génome (191). Ces résultats suggèrent que DSS1 est un élément conservé de la RH et qu'il fonctionne avec BRCA2 pour efficacement cibler RAD51 aux dommages à l'ADN. Il est important de noter ici que BRCA2 a également la capacité d'interagir avec RPA (192) et que certaines hypothèses suggèrent que BRCA2 et DSS1 pourraient être impliqués dans le déplacement de RPA de l'ADN simple brin pour favoriser le chargement de RAD51 (193). Malgré le fait que RPA contribue à la RH RAD51-dépendante en inhibant les structures secondaires qui pourraient interférer avec la formation du filament RAD51, elle possède également une activité inhibitrice sur la formation de ce même filament et la nécessité de facteurs capables de retirer RPA est bien établie *in vitro* (97).

En plus des domaines BRC, BRCA2 possède un domaine de liaison à RAD51 situé en C-terminal qui est phosphorylé sur la Ser3291 par des kinases dépendantes des cyclines (CDK), vraisemblablement CDK1 (194). Cette phosphorylation abolit la capacité de BRCA2 à lier RAD51, elle est faible en phase S et devient élevée à l'entrée en phase G₂-M. De plus, lors de l'induction de dommages à l'ADN, cette phosphorylation est rapidement retirée pour permettre de nouveau l'association de RAD51 à BRCA2 (194). L'importance de ce site de phosphorylation est soulignée par l'existence de quatre mutants indépendants associés au cancer (194). Collectivement, ces résultats suggèrent que la phosphorylation de ce résidu de BRCA2 pourrait agir comme interrupteur pour activer ou réprimer la RH RAD51-dépendante. Exactement comment les différentes régions d'interaction entre BRCA2 et RAD51, les BRC et la région en C-terminale, travaillent ensemble pour contrôler la fonction de RAD51 est inconnue mais BRCA2 régule vraisemblablement cette composante essentielle à l'événement de RH.

Cette apparente complexité dans l'interaction entre BRCA2 et RAD51 suggère un modèle dans lequel la localisation cellulaire et la capacité de RAD51 à former le filament de nucléoprotéines sont régulées par BRCA2 en fonction du type de dommages à l'ADN, peut-être en effectuant une transition de la forme active à la forme inactive (169, 188). En absence de dommage, BRCA2 pourrait inhiber RAD51 en le maintenant dans une forme inactive et ainsi empêcher sa liaison à l'ADN simple brin généré par le métabolisme normal et la réplication. Toutefois, en présence de dommage, BRCA2 pourrait favoriser le chargement fonctionnel de RAD51 au site de lésion et favoriser sa nucléation (188, 195). Cette hypothèse a été appuyée par l'observation qu'un hybride de BRCA2 contenant uniquement les BRC3/BRC4 avec le domaine de liaison à l'ADN est capable de stimuler l'activité de RAD51 *in vitro* (196). De façon encore plus convaincante, l'expression d'une protéine de fusion qui combine un BRC avec les repliements OB de BRCA2, capables de lier la jonction ADN simple brin/ADN double brin, restaure le niveau de RH RAD51-dépendante et diminue le niveau de RH RAD51-indépendante en plus de restaurer la résistance aux RI, à la MMC et de diminuer les aberrations chromosomiques (197). Ces diverses découvertes suggèrent un modèle dans lequel BRCA2 agit comme élément essentiel à la régulation de la RH, principalement via la régulation de l'activité de RAD51. Le contrôle du chargement de RAD51 sur l'ADN

simple brin, qu'il soit défectif ou excessif, représente clairement une étape critique de régulation nécessaire pour assurer le maintien de la stabilité du génome.

En résumé, BRCA2 pourrait stimuler la formation du filament de nucléoprotéique puisqu'il interagit avec plusieurs monomères de RAD51 via ses domaines BRC ou avec un oligomère de RAD51 via son domaine en C-terminal. Il pourrait cibler RAD51 au site de CDB constitué d'une jonction d'ADN simple brin et double brin via ses repliements OB. BRCA2 pourrait également protéger RAD51 de la phosphorylation possible par différentes kinases lors de la réponse cellulaire aux dommages à l'ADN, tout comme il pourrait contribuer à la formation du filament de RAD51, en déplaçant RPA pour permettre la nucléation de RAD51. De plus, BRCA2 interagit avec BRAF35 (facteur associé à BRCA2), un composant qui agirait sur le contrôle du cycle cellulaire mais qui aurait aussi la capacité de lier l'ADN et plus particulièrement les jonctions de Holliday, ce qui suggérerait un rôle pour BRCA2 dans l'étape de résolution de l'intermédiaire de recombinaison en plus de son rôle dans l'initiation. En accord avec ces hypothèses, il a été démontré qu'une déficience en BRCA2 chez la souris entraîne une diminution de quatre à six fois de la CG, un événement de réparation RAD51-dépendant, suite à l'induction de la CDB par I- *SceI* (56, 65). De plus, on observe une augmentation du nombre de délétions par SSA, un événement RAD51-indépendant autant chez la souris que dans des cellules de hamster chinois BRCA2-déficientes (65, 198). La diminution de la CG et la réorientation de la réparation des CDB vers le SSA pourraient expliquer en partie l'instabilité génomique observée dans les cellules BRCA2-déficientes puisque le SSA entraîne des délétions extensives (voir section 1.4.3)(65).

1.4.2 Non-homologous end-joining

Comme nous l'avons mentionné, il existe d'autres mécanismes de recombinaison impliqués dans le maintien de la stabilité du génome. Le NHEJ est un mécanisme important pour la réparation des CDB et pour le réarrangement des immunoglobulines. L'événement initial implique la liaison de l'hétérodimère Ku70/Ku80 à l'extrémité du bris double brin (199). Deux hétérodimères se rejoignent pour rapprocher les extrémités correspondantes et recrutent la sous-unité catalytique de la kinase dépendante d'ADN (DNA-PK) en stabilisant son interaction avec les extrémités d'ADN. L'activité kinase et

l'autophosphorylation de DNA-PK sont nécessaires au mécanisme de NHEJ mais leurs fonctions exactes demeurent inconnues. Toutefois, on sait que la protéine ARTEMIS constitue un substrat de DNA-PK. Ensemble, ils agissent comme endonucléase et préparent les extrémités d'ADN pour la ligation effectuée par le complexe XRCC4-Ligase IV. Le complexe MRN semble aussi être impliqué dans la préparation des extrémités d'ADN en plus de favoriser la détection des CDB (200)(Figure 11). Dans ce complexe, MRE11 porte l'activité exonucléolytique, RAD50 une activité de liaison à l'ADN ATP-dépendante et NBS1 agirait comme co-activateur pour favoriser la phosphorylation, la formation de foci et l'activité nucléolytique. La mutation d'un de ces partenaires est létale (201-203) et confère une hyper-sensibilité aux RI (204). La sévérité d'une déficience dans ce complexe reflète sûrement son implication dans les différents mécanismes de réparation de CDB autant le NHEJ, le SSA que la RH (voir section 1.4.1.1 et 1.4.3).

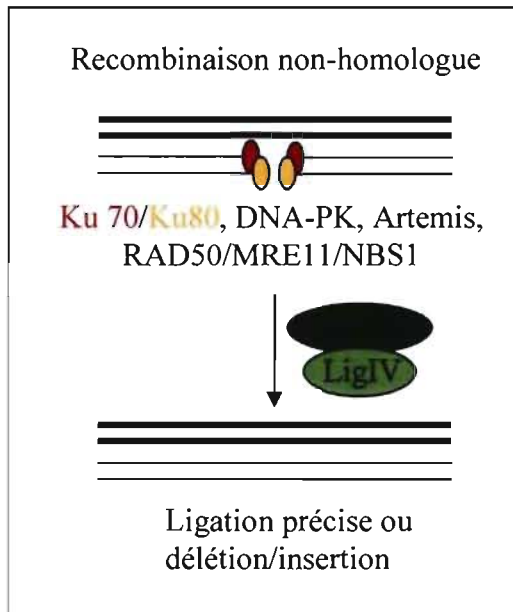


Figure 11. Modèle conceptuel pour la réparation d'une cassure double brin par recombinaison non-homologue. Les hétérodimères Ku70/Ku80 lient les extrémités de la CDB. Il y a recrutement de DNA-PK, ARTEMIS et du complexe MRE11/RAD50/NBS1 pour la préparation des bouts d'ADN. La liaison est effectuée par XRCC4/Ligase IV. La réparation peut être précise, conduire à de légères insertions/délétions ou encore à des réarrangements chromosomiques majeurs lorsque les extrémités reliquées n'appartiennent pas au même chromosome.

Le NHEJ est le mécanisme de réparation prédominant dans la cellule en absence des chromatides sœurs soit en G₀, G₁ et au début de la phase S (75). Un défaut dans ce mécanisme de réparation entraîne une augmentation des cassures et des réarrangements chromosomiques, une hyper-sensibilité aux RI et une augmentation du risque de carcinogénèse (205). Traditionnellement, le NHEJ est un mécanisme de réparation considéré comme étant susceptible d'introduire des erreurs qui se traduisent par des changements mineurs de l'ADN (délétions/insertions de quelques bases) près du site de dommage ou encore par la ligation d'extrémités d'ADN non apparentées qui conduit à des modifications chromosomiques majeures, comme des translocations, surtout lorsque plusieurs CDB sont présentes simultanément dans une cellule (88). Ce type de réparation aberrante peut conduire à la formation de chromosomes acentriques ou dicentriques qui poseront problème lors de la ségrégation des chromosomes à la mitose. Toutefois, le NHEJ est essentiel au bon fonctionnement de la cellule. Effectivement, c'est ce mécanisme de réparation qui est à l'origine de la résistance aux RI et de la variabilité du système immunitaire puisqu'il répare la CDB spécifique aux réarrangements des immunoglobulines (V(D)J). Les protéines Ku70/Ku80 et DNA-PK ne sont pas essentielles à la survie cellulaire alors que XRCC4/Ligase IV le sont, ce qui suggère que le NHEJ n'est pas essentiel à la survie ou au développement embryonnaire alors que le complexe de ligases doit avoir une fonction additionnelle le rendant indispensable (72).

L'implication de BRCA1 dans le NHEJ est très controversée. Plusieurs groupes se sont penchés sur la question et sont arrivés à des conclusions diamétralement opposées (Table III). Toutefois, si BRCA1 est impliqué dans la régulation du NHEJ, cette implication passe vraisemblablement par sa liaison, autant *in vitro* qu'*in vivo*, au complexe MRN (153). Ce complexe semble jouer un rôle dans la détection et la réparation des CDB et possède une activité endonucléase que BRCA1 peut inhiber (171). De plus, BRCA1 est requis pour la phosphorylation de NBS1 par ATM suite aux dommages à l'ADN (159). Par contre, des observations contradictoires ont suggéré que BRCA1 aurait une implication seulement dans certains sous-mécanismes de NHEJ. Effectivement, dans les dernières années, un sous-mécanisme de NHEJ plus précis a été découvert chez les eucaryotes. Ce mécanisme pourrait nécessiter ou non les mêmes composantes que le NHEJ traditionnel mais conduire à des changements de séquences

quasi nuls aux sites de dommages. Il peut être détecté par la re-circularisation d'un plasmide. BRCA1 pourrait favoriser ce mécanisme en inhibant l'activité nucléolytique du complexe MRN pour restreindre l'étendue de la délétion au site de coupure (153, 171) puisque la fonction de Ku70/Ku80/DNA-PK ne semble pas affectée par une déficience en BRCA1 (206). Un second sous-mécanisme est soupçonné d'utiliser les régions de micro-homologies (jusqu'à 8 paires de bases) flanquant le site de cassure pour effectuer l'appariement (170). La découverte de ces sous-mécanismes est en grande partie due aux différentes techniques expérimentales utilisées qui ont conduit à des résultats contradictoires et non à des évidences biochimiques claires (207). BRCA1 serait soupçonné d'avoir un effet seulement sur ces deux sous-mécanismes, ce qui expliquerait la discordance observée dans les différentes expérimentations (208, 209). Cette conclusion étant appuyée par le réarrangement adéquat des récepteurs des lymphocytes T en absence de BRCA1 (44). BRCA1 pourrait donc favoriser la réparation de la CDB tout en limitant la perte d'information génétique lors du NHEJ.

Quant à BRCA2, plusieurs évidences suggèrent qu'il n'aurait aucun effet sur le NHEJ. Tout d'abord, la recombinaison V(D)J pour le réarrangement des anticorps et des récepteurs de cellules T n'est pas altérée dans les lymphocytes de souris qui ne possèdent qu'un BRCA2 tronqué (42). De plus, les extraits protéiques provenant de cellules déficientes en BRCA2 maintiennent leur habileté à lier des extrémités d'ADN par NHEJ *in vitro* (50). Les évidences démontrent plutôt un rôle essentiel pour BRCA2 dans la RH et le SSA.

Table III. Résumé des effets de BRCA1 sur la recombinaison non-homologue en fonction du type d'essai utilisé

Essais utilisés	Effet de BRCA1 sur le NHEJ	Références
<i>In vitro</i> plasmide linéaire (PBL)	+	(210)
<i>In vitro</i> plasmide linéaire (MEF)	+	(211)
<i>In vitro</i> plasmide linéaire (MCF7, HCC1937)	+	(212)
<i>In vitro</i> plasmide linéaire (PBL)	=	(213)
HCR: <i>in vivo</i> end-joining global (PBL)	=	(210)
HCR: <i>in vivo</i> end-joining global (MEF)	=	(211)
HCR: <i>in vivo</i> end-joining global (MCF7, HCC1937)	=	(212)
HCR: <i>in vivo</i> end-joining global (PBL)	+	(214)
HCR: <i>in vivo</i> end-joining précis (MEF)	+	(211)
HCR: <i>in vivo</i> end-joining précis (MCF7, HCC1937)	+	(212)
HCR: <i>in vivo</i> micro-homologie end-joining (PBL)	+	(210)
HCR: <i>in vivo</i> extrémités cohésives end-joining (PBL)	+	(210)
Micro-homologie end-joining (MEF)	+	(211)
Intégration aléatoire (MES)	-	(63)
Intégration aléatoire (MES)	-	(61)
Intégration aléatoire (HCC1937)	-	(161)
Réparation induite par IR (HCC1937)	+	(70)
Réparation induite par IR (HCC1937)	=	(206)
Infection rétrovirale médiée par NHEJ (MEF)	+	(211)

HCR, réactivation dans la cellule hôte, ou recircularisation d'un plasmide *in vivo*; MEF, fibroblastes embryonnaires de souris; MES, cellules souches embryonnaires de souris; PBL, lymphocytes de sang périphérique
Promotion (+), suppression (-), ou aucun effet (=) (207)

1.4.3 Appariement simple brin

Le SSA, comme mécanisme de recombinaison, implique l'utilisation de séquences homologues pour la réparation de la CDB. Ce mécanisme peut être considéré comme un sous-mécanisme de la RH tout en étant RAD51-indépendant. Il implique l'appariement d'ADN simple brin formé après la dégradation des extrémités de la CDB sur un même chromosome et sans formation de jonctions de Holliday (215). Les protéines essentielles et le mécanisme demeurent encore quelque peu nébuleux (172). Initialement, les extrémités d'ADN sont digérées par des exonucléases pour former des extrémités d'ADN 3' simple-brin. Vraisemblablement le complexe MRN serait directement impliqué. Les longs fragments d'ADN simple-brin ainsi formés peuvent être liés par

RPA et RAD52 aux extrémités, étapes jusque là commune avec la RH. Aussitôt qu'une région d'homologie est exposée par la dégradation, ces sections vont s'apparier (Figure 12). La branche d'ADN 3'simple brin non-complémentaire va être clivée par ERCC1/XPF (homologue de Rad1/Rad10 chez la levure) et la section simple brin remplie par l'ADN polymérase. Il a été démontré que la présence des protéines du MMR, MSH2 et MSH3 est nécessaire afin de stabiliser l'intermédiaire ainsi créé et faciliter le clivage de la branche d'ADN non-homologue (Figure 12)(216). Ce mécanisme de réparation implique une perte d'information génétique puisqu'il conduit à la délétion de toutes séquences situées entre les deux régions d'homologies et à la perte de l'une d'elles. Le SSA est potentiellement un mécanisme important de mutagenèse puisque le génome contient une grande proportion de séquences répétitives qui peuvent être utilisées comme substrat de recombinaison (217).

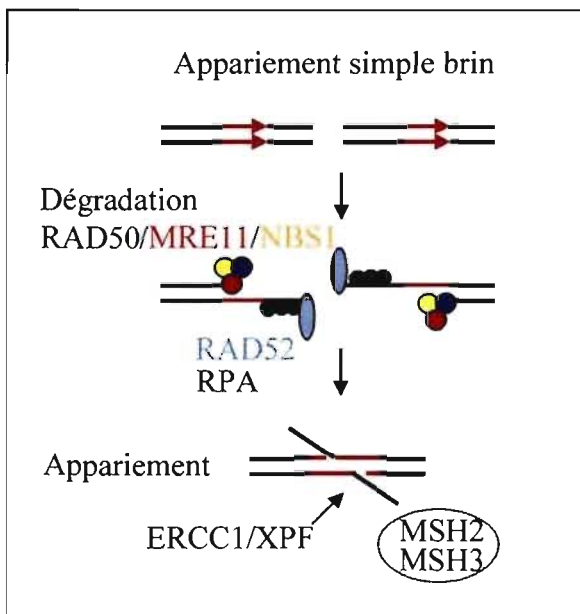


Figure 12. Modèle de réparation d'une cassure double brin par appariement simple brin. Le SSA est initié par une CDB. Lors de la réparation, la dégradation MRN-dépendante va exposer deux régions d'homologies en répétitions directes (illustrées en rouge). L'ADN simple brin est recouvert par RPA et les extrémités sont liées par RAD52. Par la suite, les deux régions homologues vont s'apparier, il y aura clivage de l'intermédiaire de recombinaison par le complexe ERCC1/XPF et finalement ligation. La stabilisation de cet intermédiaire nécessite la présence des protéines du MMR MSH2 et MSH3.

L'implication de BRCA1 dans la régulation du SSA est mal comprise. Dans les cellules de souris, une déficience en BRCA1 entraîne une diminution de l'efficacité du SSA comme c'est le cas de la RH (61). BRCA1 pourrait donc agir à une étape commune entre ces deux mécanismes de réparation comme la préparation des extrémités d'ADN 3'simple brin par le complexe MRN ou le clivage de l'extrémité 3'simple brin non-complémentaire nécessaire à la terminaison de l'événement ou encore la signalisation des dommages. BRCA1 pourrait également agir dans les étapes communes de signalisation des dommages.

Pour ce qui est de l'implication de BRCA2 dans le SSA, il a déjà été démontré qu'une défectuosité en BRCA2 dans des cellules de souris entraîne une diminution de RH RAD51-dépendante et une augmentation de SSA (56, 65, 198). Comment la cellule effectue le choix entre ces différents mécanismes demeure obscure. On peut donc s'interroger à savoir si BRCA2 joue un rôle direct dans le SSA ou si l'effet de BRCA2 sur le SSA n'est pas plutôt une conséquence de son rôle prépondérant dans la RH RAD51-dépendante.

1.5 Autres activités de BRCA1 et BRCA2 impliquées dans la régulation de la recombinaison homologue et le maintien de la stabilité génomique

Plusieurs activités cellulaires de bases sont nécessaires au maintien de la stabilité du génome comme le contrôle du cycle cellulaire, l'apoptose, la transcription, le remodelage de la chromatine, l'ubiquitination, et la signalisation/réparation des dommages à l'ADN. L'importance de BRCA1 et BRCA2 dans ce dernier mécanisme est désormais bien établie. Toutefois, BRCA1, et BRCA2 dans une moindre mesure, sont impliqués dans le contrôle de ces autres processus cellulaires de base et peuvent donc contribuer au maintien de la stabilité génomique à différents niveaux (Table I et II).

1.5.1 Contrôle du cycle cellulaire

Le contrôle précis du cycle cellulaire est essentiel pour maintenir l'intégrité du génome. Les cellules qui subissent des dommages à l'ADN suite aux traitements par les RI, les UV, les agents chimiothérapeutiques ou autres vont, de

façon hautement régulée, arrêter la progression de leur cycle cellulaire pour permettre la réparation des lésions engendrées. BRCA1 est un déterminant majeur de la réponse cellulaire à ces différents agents endommageants (pour une revue récente 218). L'expression de BRCA1 varie en fonction du cycle cellulaire. Elle est induite en phase G₁ et devient maximale après le point de contrôle du cycle cellulaire G₁-S (219). Durant cette phase, BRCA1 est hyper-phosphorylé et cette phosphorylation s'estompe rapidement après la phase M (220). De plus, BRCA1 s'associe avec plusieurs protéines impliquées dans le contrôle du cycle cellulaire (Table I), ce qui suggère qu'elle jouerait un rôle dans cette fonction.

L'arrêt du cycle cellulaire suite à des dommages à l'ADN repose principalement sur l'activation des kinases impliquées dans la détection et la signalisation de ces dommages, ATM et ATR. Ces kinases sont reconnues pour avoir la capacité de phosphoryler BRCA1 sur des résidus distincts et d'autres qui se chevauchent (Figure 2), en plus de colocaliser avec les foci formés par BRCA1 (158, 162). Il a été établi que la phosphorylation de BRCA1 par ATM est essentielle à l'activation du point de contrôle du cycle cellulaire en phase S suite aux RI (221, 222) et celle effectuée par ATR est essentielle au même point de contrôle, suite à l'arrêt des fourches de réplication (158). L'activation d'ATM reposerait sur son interaction avec le complexe MRN alors que celle d'ATR reposerait sur la présence d'ADN simple brin lié à RPA (223, 224). Ces kinases, dont BRCA1 est partenaire, sont impliquées dans la détection et la signalisation des dommages à l'ADN mais sont également importantes dans le contrôle du cycle cellulaire.

BRCA1 peut arrêter le cycle cellulaire suite aux dommages à l'ADN via l'activation de la transcription, p53-dépendante ou indépendante, de p21, un inhibiteur des kinases cyclines-dépendantes (225). En effet, BRCA1 ne peut prévenir l'entrée en phase S dans des cellules p21-déficientes et les mutants de BRCA1 associés à des tumeurs ne peuvent transactiver p21 et arrêter le cycle cellulaire (225). BRCA1 peut également inhiber la prolifération cellulaire via son interaction avec RB, ce qui entraîne une diminution de l'activité des facteurs de transcription pro-prolifératif de la famille E2F (226).

En plus de ses implications dans le contrôle du cycle cellulaire en phase G₁-S, BRCA1 semble très important pour le contrôle de la phase G₂-M. Ce point de contrôle nécessite la phosphorylation de la kinase CDK1, alors que sa déphosphorylation par les différents CDC25, A, B ou C, active le complexe CDK1/CyclineB et entraîne l'entrée en mitose (525). Yarden *et al.* ont démontré que BRCA1 régule l'expression, la phosphorylation et la localisation de CHK1 (227), un inhibiteur de CDC25A/B/C (526). Dans les cellules BRCA1-déficientes, CHK1 n'est pas activé, conséquemment la phosphorylation inhibitrice sur les CDC25s décroît, ce qui conduit à leur accumulation dans le noyau et mène à l'activation de CDK1/Cycline B (227). Leurs résultats indiquent également que BRCA1 affecte l'expression de WEE1, une protéine kinase régulant négativement CDK1/Cycline B, et qu'il affecte 14-3-3 σ qui séquestre les formes phosphorylées de CDC25 dans le cytoplasme (30). De plus, CHK2 est important pour le contrôle de l'entrée en phase M puisqu'il inhibe les CDC25s. La kinase CHK2 phosphoryle BRCA1, nécessite la présence de celui-ci pour être à son tour phosphorylée et colocalise avec BRCA1 (161). Finalement, BRCA1 peut stimuler la transcription de GADD45 qui est connu pour inhiber le complexe CDK1/Cycline B (228). Donc BRCA1 régule des effecteurs clés de la phase G₂-M et contrôle ainsi l'entrée en mitose (résumé Figure 13). Il faut également mentionner qu'une étude suggère un rôle de BRCA1 dans la ségrégation adéquate des chromosomes en induisant transcriptionnellement MAD2, une protéine essentielle au point de contrôle des microtubules (229). Ces résultats suggèrent qu'ATM et ATR phosphorylent directement BRCA1 en réponses aux dommages ou aux stress répliatifs et que BRCA1 fait parti intégrante de la cascade de réponse aux stress génotoxiques nécessaire à l'arrêt du cycle cellulaire et à la réparation (résumé Figure 13).

Malgré le nombre d'évidences reliant BRCA1 à l'arrêt du cycle cellulaire pour permettre la réparation de l'ADN, une contradiction demeure lorsqu'on se penche sur le phénotype des souris déficientes en BRCA1. Effectivement, on observe une augmentation de l'expression de p53 et de p21 chez ces souris entraînant un arrêt du cycle cellulaire malgré l'absence de BRCA1, ce qui soulève

un questionnement quant à l'importance de BRCA1 dans le contrôle du cycle cellulaire.

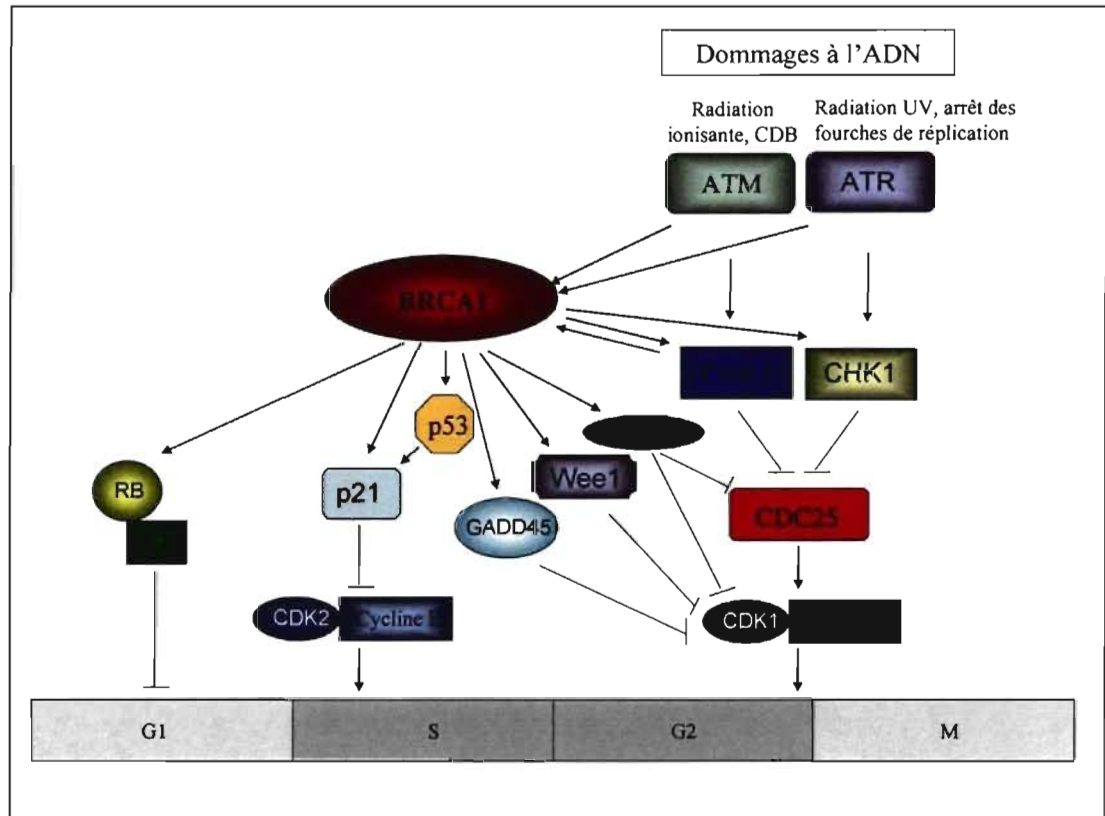


Figure 13. Implications de BRCA1 dans le contrôle du cycle cellulaire suite aux dommages à l'ADN. BRCA1, grâce à ces interactions protéiques ou à sa fonction dans la transactivation, peut intervenir à différentes étapes du cycle cellulaire. Il peut arrêter le cycle suite à des dommages à l'ADN et ainsi permettre la réparation afin de maintenir l'intégrité du génome à travers les générations.

Plusieurs études ont lié BRCA2 à la progression du cycle cellulaire. Tout d'abord, BRCA2 interagit avec BUBR1, une protéine impliquée dans la régulation du passage métaphase/anaphase. BUBR1 a la capacité de phosphoryler la partie C-terminale de BRCA2 *in vitro* (230), mais l'importance de cette phosphorylation reste à élucider. L'inactivation de ce point de contrôle du cycle cellulaire par une mutation dans Bubr1 renverse l'arrêt prolifératif et favorise la transformation néoplasique dans les cellules de souris Brca2-déficientes, ce qui suggère une coopération entre ces deux protéines dans la régulation du passage

métaphase/anaphase durant la mitose et souligne l'importance du contrôle adéquat du cycle cellulaire pour favoriser le maintien de la stabilité du génome (231). De plus, la surexpression d'un domaine BRC (BRC4) indépendant, capable de lier RAD51, diminue l'interaction BRCA2-RAD51 et interfère avec l'entrée en phase M suite aux RI (187). Il a également été suggéré que BRCA2 participe dans le contrôle du cycle cellulaire via son interaction avec BRAF35 (232). BRAF35 lie préférentiellement les branchements d'ADN comme ceux formés durant la RH. Le complexe BRCA2-BRAF35 se localise sur les chromosomes mitotiques durant l'initiation de la condensation des chromosomes et la micro-injection d'anticorps contre BRCA2 ou BRAF35 retarde la progression de la métaphase, et ainsi du cycle cellulaire (232). De plus, un rôle pour BRCA2 dans la cytokinèse a été avancé puisque l'étape entre l'anaphase et la division complète est prolongée dans les cellules BRCA2-déficientes (233). BRCA2 est également phosphorylé par PLK1 (Polo-Like kinase 1) en fonction du cycle cellulaire (234, 235) mais la fonction de cette phosphorylation dans le cycle cellulaire demeure inconnue.

Malgré ces évidences, la participation directe de BRCA2 dans la régulation du cycle cellulaire demeure un sujet controversé puisque les points de contrôle du cycle cellulaire sont largement préservés dans les cellules primaires de souris Brca2-déficientes en présence de dommages à l'ADN (42, 43) suggérant ainsi que le rôle principal de BRCA2 serait plutôt dans la réparation de l'ADN, ce qui aurait un effet indirect sur la progression du cycle cellulaire (42).

1.5.2 Régulation de la transcription

Un rôle de co-régulateur de la transcription a été avancé pour BRCA1 compte tenu de ses interactions avec de nombreux facteurs de transcription (Table I) et de sa forte teneur en acides aminés chargés négativement, situés en C-terminal, une caractéristique qui correspond régulièrement avec un domaine de transactivation chez les eucaryotes. En effet, il est montré, en utilisant ce domaine de BRCA1 (acides aminés 1560-1863) en fusion avec le domaine de liaison à l'ADN de GAL4, que BRCA1 active la transcription autant chez la levure que chez les mammifères (236). De plus, des mutations ponctuelles germinales retrouvées dans certaines

tumeurs produisent un BRCA1 déficient dans l'activation transcriptionnelle, alors que divers polymorphismes n'ont aucun effet dans cet essai transitoire, ce qui suggère qu'il s'agit d'une fonction clé de cette protéine (236, 237). La régulation adéquate de la transcription est essentielle à la RH et au maintien de la stabilité du génome. De plus, la transcription en soit stimule la RH (238-240).

BRCA1 s'associe à l'ARN polymérase II (ARNpol II), l'ARN hélicase A ainsi qu'à p300/CBP. L'expression ectopique d'un BRCA1 muté altère cette interaction avec l'holoenzyme ce qui suggère que BRCA1 pourrait faire partie de la machinerie de transcription de base (241-243). En plus de moduler la transcription *in vitro* et d'interagir avec l'ARNpol II, BRCA1 a la capacité d'ubiquitiner le complexe transcriptionnel de pré-initiation sans toutefois directement cibler la polymérase vers la dégradation (244). Cette ubiquitination agirait plutôt comme répresseur transcriptionnel (245). BRCA1 peut également inhiber la phosphorylation du domaine C-terminal de l'ARNpol II, phosphorylation qui a pour l'instant un rôle inconnu. Toutefois, seule la forme hyper-phosphorylée de l'enzyme est impliquée dans l'élongation et s'associe avec BRCA1, ce qui suggère que BRCA1 jouerait un rôle post-initiation qui serait compatible avec une régulation de la transcription ou des sites transcriptionnellement actifs suite aux dommages à l'ADN (246).

Parmi les premières études montrant un rôle biologique pour BRCA1 dans la transactivation, il a été démontré que la surexpression d'un BRCA1 sauvage, et non d'un mutant associé au cancer, induit l'expression de l'inhibiteur du cycle cellulaire p21^{WAF1/CIP1}, de façon p53-indépendante (225). Cette induction est vraisemblablement due à l'interaction de BRCA1 et de STAT1 (247). Il a aussi été démontré que BRCA1 interagit avec p53 et stimule la transactivation p53-dépendante, incluant la transactivation de p21 et de Bax (248-250). De plus, BRCA1 stabilise p53 via la régulation du niveau d'expression de p14^{ARF} (250, 251) et via la régulation de la phosphorylation de p53 (252). Toutefois, p53 a la capacité de diminuer le niveau de BRCA1 dans une boucle de rétroaction négative (253, 254).

Il a aussi été établi que la phosphorylation ATM-dépendante, induite par les dommages à l'ADN, abolit l'interaction de BRCA1 avec CtIP, un co-répresseur transcriptionnel (255), ce qui induirait l'expression du gène de réponse aux dommages à l'ADN, GADD45 et conséquemment mènerait à l'arrêt du cycle cellulaire ou à l'apoptose (256). La transactivation de GADD45 pourrait aussi reposer sur une inhibition de la répression de son promoteur par la liaison de BRCA1 et du co-répresseur ZBRK1 suite aux dommages à l'ADN, ce qui entraînerait la dégradation du co-répresseur (257). De plus, BRCA1 a la capacité de réprimer la transcription induite par c-MYC, ce qui inhibe la transcription de hTERT (transcriptase inverse de la télomérase humaine) et renverse l'activité transformante de c-MYC (258, 259).

BARD1, qui interagit avec BRCA1, a été impliqué dans le contrôle du traitement des ARN, suite aux dommages à l'ADN (260, 261). Le clivage endonucléolytique des ARN nouvellement synthétisés avant leur polyadénylation est fortement inhibé suite aux dommages à l'ADN *in vitro*. *In vivo*, ceci pourrait servir à inhiber l'expression d'informations génétiques endommagées (262). Cette inhibition est dépendante de BARD1 et potentiellement de l'interaction entre BRCA1 et le facteur de polyadénylation Cst50 (260). L'inhibition du traitement des ARN suite aux dommages à l'ADN est supprimée par une mutation de BARD1 associée au cancer (260). Ces observations soulignent l'importance de BRCA1 dans de multiples voies reliées au contrôle de la transcription ayant pour but de favoriser la réparation de l'ADN et le maintien de la stabilité du génome, en accord avec la fonction suppresseur de tumeur de BRCA1.

En contraste avec BRCA1, le rôle de BRCA2 dans la transcription demeure largement inexploré. BRCA2 possède un domaine d'activation transcriptionnelle codé par l'exon 3 (acides aminés 23-105)(Figure 3). Celui-ci montre une homologie de séquence avec le facteur de transcription c-JUN (263). Cette région active la transcription lorsque fusionnée avec le domaine de liaison à l'ADN de GAL4 autant chez la levure que chez les mammifères (263). BRCA2 peut être co-immunoprécipité avec le co-activateur de la transcription P/CAF (264) et cette interaction peut être régulée par PLK1 puisque, lorsque son domaine d'activation

transcriptionnelle est phosphorylé par PLK1, BRCA2 se dissocie de son co-activateur (234, 235, 267). De plus, il semble intéressant de mentionner que BRCA1 aurait la capacité de réguler négativement la transcription de PLK1 suite à l'induction de dommages à l'ADN (268), ce qui suggère un mode de régulation indirect entre BRCA1 et BRCA2. Il a récemment été découvert que la protéine EMSY a la capacité de se lier à l'exon 3 de BRCA2. EMSY est amplifié dans le cancer du sein et de l'ovaire et sa liaison inhiberait le potentiel de transactivation de BRCA2 (269). BRCA2 pourrait également avoir les caractéristiques d'un répresseur de la transcription puisque la surexpression de BRCA2 entraîne une diminution de la transcription p53-dépendante, une inhibition accentuée par la présence de RAD51 (270). Toutefois, le rôle de BRCA2 dans la régulation de la transcription demeure incertain jusqu'à ce jour et aucune cible spécifique n'a encore été identifiée. Ce qu'on sait par contre, c'est que supprimer le domaine d'activation transcriptionnelle de BRCA2 par une mutation ou par l'amplification d'EMSY peut prédisposer au développement d'une tumeur (263, 271).

Il faut par contre garder en tête que la présence de BRCA1 ou de BRCA2 n'est pas essentielle à l'expression de p21 ou de p53, ni à l'inhibition de la prolifération ou à l'induction de l'apoptose puisque les embryons de souris déficients meurent durant l'embryogenèse dû à un arrêt de prolifération qui coïncide avec une forte expression de p21 et de p53 (37, 42-45). La raison de ce paradoxe demeure inconnue. De plus, BRCA1 et BRCA2 ne sont clairement pas essentiels à la transcription cellulaire de base et ne constituent pas des composants essentiels de l'ARNpol II, il reste donc à déterminer s'il existe un rôle direct pour ces protéines dans la transcription. En effet, leurs aptitudes à agir comme co-activateurs ou co-répresseurs de la transcription pourraient reposer sur leur interaction avec la machinerie de base de la transcription mais aussi pourraient être dues à leur interaction directe avec des protéines impliquées dans le remodelage de la chromatine comme les histones acétyltransférases/déacétylases (242, 265, 266, 272), les hélicases à ADN (57, 273) et le complexe de remodelage de la chromatine SWI/SNF (274). Très souvent, le remodelage de la chromatine et le contrôle de la transcription vont de paire.

1.5.3 Remodelage de la chromatine

BRCA1 semble avoir un rôle direct dans la réponse cellulaire précoce aux dommages à l'ADN. Dans les minutes qui suivent l'apparition d'un dommage, l'histone H2AX devient phosphorylée et forme des foci aux sites de cassures (154). BRCA1 est recruté à ces foci quelques heures avant d'autres facteurs tel que RAD50 et RAD51, ce qui suggère que γ -H2AX et BRCA1 initient la réparation en modifiant la structure de la chromatine de façon localisée (154). Cette hypothèse est supportée par la démonstration que BRCA1 est un composant du complexe de remodelage de la chromatine SWI/SNF et qu'il s'agit d'une des formes prédominantes de BRCA1 cellulaire (274). Les enzymes du complexe SWI/SNF sont recrutées entre autre aux sites actifs de la transcription et les domaines d'interaction à l'ADN de certaines protéines sont connus pour cibler le complexe à des sites précis. Comme le domaine BRCT de BRCA1 lie les CDB, certains ont émis l'hypothèse que BRCA1 recrute le complexe SWI/SNF à ces sites en particulier (275). De plus, la capacité de BRCA1 à co-activer, de façon p53-dépendante, p21 et le promoteur de p53, nécessite une association physique entre BRCA1 et le complexe SWI/SNF. Il demeure donc à démontrer si la fonction de BRCA1 dans le complexe SWI/SNF vise à diriger les facteurs de remodelage de la chromatine aux sites de dommages à l'ADN pour faciliter l'accessibilité et la réparation ou si ce complexe favorise l'expression de gènes essentiels à la réparation.

D'autres études ont démontré un rôle pour BRCA1 dans le remodelage de la chromatine. Tout d'abord, lorsque BRCA1 est en présence d'une région amplifiée de l'opéron lac, il a la capacité de décondenser la chromatine (276). De plus, BRCA1 s'associe à des hélicases comme BLM (57) et BACH1 (273) tout comme à un complexe d'histone acétyltransférases, cette dernière association stimulant la transcription (277). Il s'associe également à un complexe d'histone déacétylases (HDAC1/2)(272) impliqué dans la répression de la transcription induite par le récepteur de l'estrogène alpha ($ER\alpha$). Effectivement, BRCA1 a la capacité de réprimer l'activité transcriptionnelle du récepteur et cette fonction est grandement affectée par le traitement au trichostatin A, un inhibiteur d'histone déacétylases

(278, 279). Conséquemment, la surexpression de BRCA1 sauvage entraîne une diminution de la prolifération estrogène-dépendante (278). De plus, l'inhibition de la prolifération médiée par BRCA1 et observée autant dans les cellules normales que malignes, nécessite la présence de RB (226). BRCA1 interagit avec RB hypophosphorylé. Étant donné que RB, sous cette forme, inhibe la transcription des facteurs de transcription de la famille E2F, BRCA1 pourrait être nécessaire afin de maintenir RB actif et ainsi inhiber la prolifération. Cette fonction nécessite l'interaction entre BRCA1 et le complexe d'histone déacétylases (272) et repose donc sur la capacité de BRCA1 à modifier la chromatine. Finalement, BRCA2 posséderait une activité histone acétyltransférase intrinsèque (266) tout comme son co-facteur P/CAF (265). Puisque plusieurs facteurs de transcription ont une activité histone acétyltransférase (GCN5, CBP/P300, TAFII250, SRC-1), il est assumé que le remodelage de la chromatine par modification de l'acétylation des histones est un facteur clé dans la régulation de la transcription et que BRCA2 pourrait avoir un rôle à ce niveau.

Comment BRCA1 et BRCA2 pourraient affecter significativement le remodelage de la chromatine suite aux dommages à l'ADN pour promouvoir le maintien de la stabilité du génome demeure encore inconnu. La modification de la chromatine médiée en partie par la modification de l'acétylation des histones peut affecter l'accessibilité des lésions à l'ADN. Certains résultats suggèrent effectivement que BLM participe à la réplication de l'ADN et à la RH alors que l'interaction entre BRCA1 et BACH1 est nécessaire à la réparation de l'ADN (273). Ces deux protéines sont impliquées dans le cancer tout comme BRCA1 et ont une fonction d'hélicases (273, 280). De plus, l'acétylation des histones est essentielle à l'expression de RAD51 et à la promotion de la RH (281). Finalement, en plus de modifier l'accessibilité aux lésions, la modification de la chromatine peut également affecter la transcription de gènes nécessaires à la réparation de l'ADN ou à l'arrêt du cycle cellulaire afin de favoriser cette réparation.

1.5.4 Apoptose

Quand la capacité de la cellule à réparer ses dommages à l'ADN est outrepassée, il y aura induction de l'apoptose. L'inhibition de BRCA1 par interférence à ARN entraîne la transformation cellulaire et la résistance à l'apoptose (282) alors que l'expression exogène de BRCA1 confère une sensibilité accrue à l'apoptose induite par des agents cytotoxiques (283). Toutefois, le rôle exact de BRCA1 dans l'apoptose demeure inconnu. Il serait fort probablement relié à la régulation de la transcription médiée par BRCA1. Effectivement, BRCA1 a été relié à la diminution d'expression du facteur anti-apoptotique Bcl-2 et à l'augmentation d'expression des facteurs pro-apoptotiques Fas et FasL (284) en plus d'avoir un rôle dans la transcription p53-dépendante, comme mentionné précédemment. BRCA1 semble également avoir un impact sur l'apoptose p53-indépendante qui reposerait sur l'exclusion nucléaire de BRCA1, une fonction qui pourrait être inhibée par BARD1 puisque celui-ci favorise la rétention de BRCA1 au noyau (252). Une fonction dans la régulation de l'apoptose est tout à fait en accord avec le rôle tumeur suppresseur associé à BRCA1 qui permettrait l'arrêt du cycle cellulaire pour effectuer la réparation et induire l'apoptose dans le cas où les dommages seraient trop importants.

1.5.5 Ubiquitine-ligase

L'ubiquitination est un processus qui attire un intérêt croissant compte tenu de son rôle possible dans le maintien de la stabilité du génome et la carcinogénèse (285). Il s'agit d'un processus réversible par lequel une protéine cible est modifiée par la liaison covalente d'une chaîne mono-ubiquitine ou poly-ubiquitine. L'ubiquitination est surtout connue pour son rôle dans la protéolyse. Dans ce cas, la lysine 48 de l'ubiquitine est utilisée pour lier une protéine cible. La présence de la chaîne poly-ubiquitine dirige la protéine vers la sous-unité 26S du protéasome, ce qui conduit ultimement à sa dégradation. Toutefois, un rôle dans la dégradation protéique n'est pas la seule utilité de l'ubiquitination. Il est désormais reconnu que n'importe lequel des 7 résidus lysine de l'ubiquitine peut être relié de façon covalente à une protéine et que le choix du résidu, tout comme le nombre

d'ubiquitines liées, affectera la fonction de cette liaison. L'ubiquitination peut modifier la localisation cellulaire, changer l'activité enzymatique, moduler des interactions protéines-protéines ou participer dans la transduction de signal (286). Il a également été démontré que le processus d'ubiquitination est essentiel à l'activation de RAD51 et à la RH (287).

Le domaine 'RING' de la partie N-terminal de BRCA1 contient une activité E3-ubiquitine-ligase intrinsèque. Ce domaine sert aussi de surface d'hétérodimérisation avec BARD1, une protéine qui comporte un domaine E3-ubiquitine-ligase similaire. L'activité ubiquitine-ligase de BRCA1 est grandement améliorée *in vitro* par la présence de BARD1 et peut être abolie par des mutations dérivées de tumeurs (288, 289). Ces mutations abolissent également la capacité des cellules affectées à résister aux RI et à arrêter leur cycle cellulaire en G₂/M. De plus, BRCA1 interagit directement avec une ubiquitine hydrolase, BAPI (protéine associée à BRCA1 et hydrolysant les ubiquitines)(290) et quelques ubiquitine-ligase E2 tel que UbcH5, UbcH6, UbcH7, Ube2e2 et Ube2w (291, 292). L'interaction entre BRCA1 et UbcH5, la mieux caractérisée, favorise la réaction d'ubiquitination effectuée par BRCA1-BARD1 *in vitro* et est observée spécifiquement suite à l'induction de dommages à l'ADN. Leur interaction est dépendante des kinases impliquées dans la signalisation des dommages à l'ADN, ATM et ATR, tout comme elle est dépendante de la présence de l'histone H2AX phosphorylée, de NBS1 et de MRE11, ce qui suggère fortement qu'elle serait régulée par la voie de réponse aux dommages à l'ADN (Figure 14)(293). La phosphorylation de l'histone H2AX sur la sérine 139 a un rôle clé dans la voie de réponse aux dommages à l'ADN, fort probablement en marquant le site qui a subi la lésion et en servant de plateforme pour le recrutement des protéines nécessaires à la réparation (154). Consistant avec cette hypothèse, les lignées cellulaires déficientes en H2AX montrent une défectuosité dans l'ubiquitination BRCA1-dépendante aux sites de dommages (293). Cependant, contrairement à BRCA1, H2AX n'est pas essentielle à la survie cellulaire puisque les souris mutantes sont viables (151).

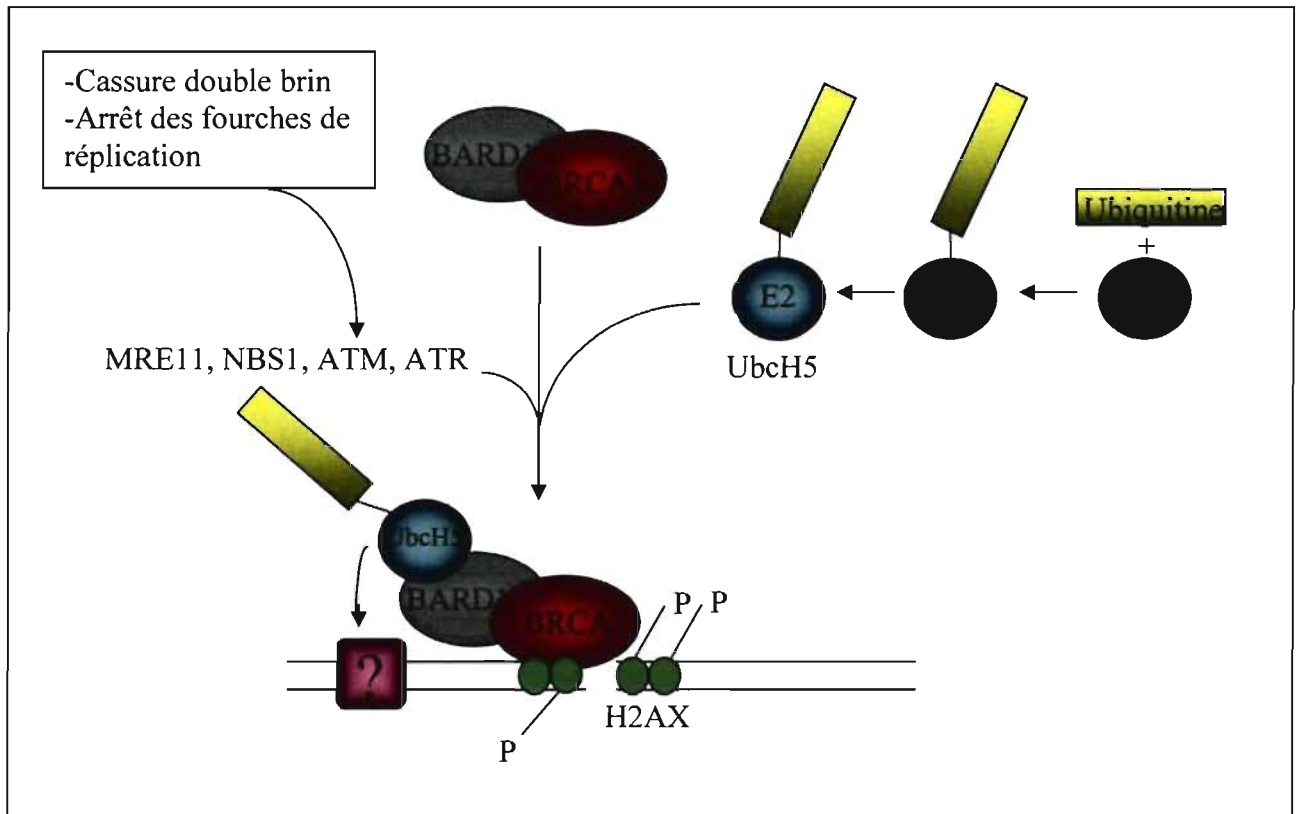


Figure 14. Importance de BRCA1 dans l'ubiquitination suite aux dommages à l'ADN. Le processus d'ubiquitination comprend 3 enzymes. Tout d'abord E1, l'unique enzyme activatrice d'ubiquitine de la cellule lie une ubiquitine et la transfère à l'enzyme E2, conjugatrice d'ubiquitine. L'une des 30 enzymes conjugatrices d'ubiquitine se lie à une des nombreuses enzymes E3-ubiquitine-ligases, celle qui confère la spécificité de la réaction. L'enzyme E3-ubiquitine-ligase catalyse le transfert de l'ubiquitine de l'enzyme E2 vers une protéine cible via son interaction avec ces deux protéines. Suite à l'induction de dommages à l'ADN, le complexe BRCA1-BARD1, qui possède une activité E3-ubiquitine-ligase, est activé et recruté aux sites de lésions caractérisés par la présence de l'histone H2AX phosphorylée. La présence de BRCA1-BARD1 aux sites de dommages entraîne la formation de foci d'ubiquitines, probablement via l'interaction de BRCA1 avec UbcH5 ou d'autres ubiquitine-ligases E2. Le processus de recrutement/activation nécessite la présence de l'histone H2AX phosphorylée ainsi que la présence de NBS1, MRE11, ATM et ATR. Les cibles protéiques demeurent encore mal connues.

La visualisation *in vivo* des événements d'ubiquitination démontre leur localisation aux sites de CDB suite à un traitement par RI et aux sites d'arrêts des fourches de réplication suite à un traitement à l'hydroxyurée, un inhibiteur de la ribonucléotide réductase qui entraîne une déplétion en nucléotides (294). De façon frappante, ces foci d'ubiquitines colocalisent avec les foci produits par BRCA1 et peuvent être inhibés suite à une diminution d'expression de BRCA1 ou de BARD1 par un traitement à base d'interférence à ARN (294). Le complexe BRCA1-BARD1 a également la capacité de s'auto-ubiquitiner ce qui augmente leur activité ubiquitine-ligase combinée (295), leur stabilité respective (296), en plus d'améliorer leur capacité à lier l'ADN (297), et de favoriser la réparation de CDB par RH (55). Ces résultats suggèrent que l'ubiquitination peut modifier l'activité de BRCA1 aux sites de dommages à l'ADN mais son importance dans le processus de réparation demeure très mal connue.

Il est aussi reconnu qu'en présence de dommages à l'ADN, l'ARNpol II est phosphorylée, ubiquitinée et dégradée (298). Suite à l'induction de dommages à l'ADN, la surexpression de BRCA1 stimule l'ubiquitination de l'ARNpol II et le phénomène inverse est observé lors d'une diminution d'expression de BRCA1 ou de BARD1 par interférence à RNA (244, 299). L'ubiquitination de l'ARNpol II aurait un effet répressif sur la transcription *in vitro* (245). Ces observations suggèrent un rôle majeur de l'activité ubiquitine-ligase de BRCA1 dans la régulation de la transcription suite aux dommages à l'ADN, probablement en éliminant certains transcrits ou en augmentant l'accessibilité de l'ADN aux sites de dommages (170).

Finalement, il est désormais établi que le processus de dégradation dépendant de l'ubiquitination et du protéasome est essentiel à la régulation de la RH et à la résistance aux agents chimiothérapeutiques (287, 300). Ce processus inclut la dégradation de RAD51 pour une régulation adéquate de la RH (301). Il est donc possible, compte tenu de ces différentes observations, que l'ubiquitination médiée par BRCA1 aux sites de dommages à l'ADN puisse faire partie du processus de signalisation/réparation des lésions essentiel au maintien de la stabilité du génome, mais l'identification des cibles de cette ubiquitination reste à raffiner.

Effectivement, il a été démontré uniquement *in vitro* que H2AX, p53 et l'ARNpol II pourraient être des cibles de l'ubiquitination par BRCA1 mais ces observations n'ont pu être confirmées *in vivo* (résumé dans 286). L'importance biologique de l'ubiquitination dans la réparation de l'ADN semble indéniable, par contre, comment cette fonction est activée par les dommages à l'ADN et quelles sont les protéines cibles aux sites de dommages et d'arrêt des fourches de réplication demeure inconnu, tout comme son rôle exact.

En conclusion, BRCA1 et BRCA2 interagissent *in vivo* dans les cellules mitotiques et méiotiques (54, 262). L'interaction BRCA1-BRCA2 est médiée par une région adjacente à l'extrémité C-terminal de BRCA1 (acides aminés 1314-1863) (54, 302) et une région en N-terminal de BRCA2 (54). Toutefois, seulement 1 à 5 % du pool intracellulaire de BRCA1 a été retrouvé en association avec BRCA2 ou RAD51 dans les cellules somatiques (52, 54) et BRCA2 n'a pas été retrouvé faisant partie intégrante du complexe de surveillance du génome, BASC. Si on considère que ces deux protéines ont des activités spécifiques et des interactions protéiques différentes alors qu'elles montrent les mêmes phénotypes d'instabilité génomique, on peut dire qu'on se retrouve face à un paradoxe. Une explication pourrait reposer sur une interaction provisoire avec ces deux protéines seulement aux sites de dommages à l'ADN ou d'arrêt des fourches de réplication alors que dans d'autres circonstances, BRCA1 est retrouvé en complexe avec d'autres partenaires. Ce concept est supporté par la double fonction possible de BRCA1, c'est-à-dire un rôle fonctionnel de base dans l'ubiquitination, la transcription, le remodelage de la chromatine et le contrôle du cycle cellulaire alors qu'en présence de dommages à l'ADN, BRCA1 remplirait de nouvelles tâches, à savoir la signalisation et la réparation de ces dommages. Le fait que l'une des seules caractéristiques partagées entre BRCA1 et BRCA2 est leur implication dans la RH suggère que cette fonction est un déterminant important dans leur rôle de supprimeurs de tumeurs. Toutefois, comme nous l'avons mentionné, BRCA1 remplit plusieurs fonctions pour ultimement conduire au maintien de la stabilité du génome. BRCA2 quant à lui semble avoir un rôle beaucoup plus direct et axé sur la régulation de la RH via son interaction avec RAD51.

1.6 Prédiposition au cancer héréditaire chez les hétérozygotes

Chez l'humain, la présence héréditaire d'un seul allèle défectueux de *BRCA1* ou *BRCA2* est suffisante pour augmenter le risque de carcinogénèse. Le développement de tumeurs implique majoritairement la perte de l'allèle sauvage présent avec la rétention de l'allèle muté, ce qui fait de *BRCA1* et *BRCA2* des gènes tumeurs supprimeurs classiques. Toutefois, la séquence d'événements qui produit ce génotype demeure incertaine et nos connaissances des différentes fonctions de ces gènes ne peuvent expliquer précisément cette susceptibilité à la transformation néoplasique. La grande question qui demeure est de savoir si, chez les hétérozygotes, la perte de l'allèle sauvage s'effectue de façon stochastique ou si elle est précipitée par une augmentation de l'instabilité génomique dans ces individus. Dans la mesure où la perte d'hétérozygotie ne s'effectue pas de façon aléatoire, l'instabilité génomique peut être créée par la diminution d'expression de *BRCA1/2* à cause de la présence d'un seul allèle fonctionnel ou encore être due à la présence d'un allèle mutant.

L'hétérozygotie de *BRCA2* a été associée à un défaut de la réparation des CDB par RH, à une hyper-sensibilité aux dommages induits par la mitomycine C, le cisplatine ou les RI, à la présence de réarrangements chromosomiques (inversions, duplications) et à une augmentation d'échanges entre les chromatides sœurs (58, 303-306). Ces évidences laissent croire que dans le cas de *BRCA2* la perte d'hétérozygotie ne serait pas aléatoire mais plutôt favorisée par un niveau élevé d'instabilité dans les cellules hétérozygotes. Dans la littérature, l'effet de l'hétérozygotie de *BRCA1* demeure encore aujourd'hui controversé malgré de nombreuses études évaluant son impact sur différents processus cellulaires fondamentaux. Effectivement, suite à l'induction de dommages par RI, peroxyde d'hydrogène ou mitomycine C, certaines études ont démontré une hyper-sensibilité et la présence accrue de micronoyaux (mini-cellules comportant des fragments de chromosomes endommagés de façon irréversible) dans les cellules hétérozygotes comparativement aux cellules sauvages, alors que d'autres n'ont observé aucune différence (Table IV). Ces divergences peuvent être attribuées au groupe cellulaire de référence puisque la majorité des études n'ont pas été effectuées sur des cellules

du sein, à la différence inter-individus puisqu'elles n'ont pas été effectuées sur des lignées isogéniques ou au type d'essai choisi (résumé Table IV). Effectivement, la majorité des lésions causées par les RI seront réparées par NHEJ, surtout en dehors de la phase S-G₂. *In vivo*, l'efficacité de ce mécanisme de réparation ne semble pas être affectée par l'hétérozygote de BRCA1, seule la fidélité de la réparation serait touchée (210). Les dommages à l'ADN peuvent donc être réparés et ne pas être détectés par certains types d'essais, en particulier l'essai 'comet' et l'électrophorèse sur gel en champs pulsé qui mesure la ligation simple. Donc, un système basé sur la sensibilité à la radiation ne constitue pas un choix approprié pour évaluer une défektivité dans la RH. De plus, les souris hétérozygotes démontrent une défektivité au niveau du développement des glandes mammaires (307). En résumé, malgré les contradictions observées, l'hétérozygote de BRCA1/2 semble être associée à un phénotype distinct et plus précisément, à une dérégulation de la réparation de l'ADN, ce qui nous inciterait à croire qu'effectivement, la délétion de l'allèle sauvage présent ne s'effectuerait pas de façon aléatoire mais serait accélérée par l'instabilité observée dans ces cellules.

Table IV. Revue de littérature sur la sensibilité aux radiations ionisantes des hétérozygotes pour BRCA1/2

Système expérimental	Type cellulaire	Effet	Références
<i>In vivo</i>			
revue de littérature		aucun	(308)
revue de littérature		aucun	(309)
revue de littérature		aucun	(310)
Essais G ₂	PBL	sensible	(311)
Micronoyaux	PBL	aucun	(311)
Essais G ₂	PBL	aucun	(312)
Essais G ₂	PBL, Fibroblastes	sensible	(313)
Essais de survie	PBL, Fibroblastes	sensible	(313)
Micronoyaux	Lignée lymphoblastoïde	sensible	(58)
Essais de survie	Lignée lymphoblastoïde	sensible	(58)
PFGE	Lignée lymphoblastoïde	sensible	(58)
<i>In vitro</i>			
Micronoyaux	PBL	sensible	(314)
Micronoyaux	Lignée lymphoblastoïde	sensible	(315)
Comet-assay	Lignée lymphoblastoïde	aucun	(315)
Micronoyaux	PBL	sensible	(316)
Micronoyaux	PBL	sensible	(317)
Comet-assay	PBL	aucun	(317)
Micronoyaux	Lignée lymphoblastoïde	aucun	(318)
Comet-assay	Lignée lymphoblastoïde	aucun	(318)
Micronoyaux	PBL	sensible	(319)
Comet-assay	PBL	aucun	(320)

Abréviations : PBL, lymphocytes de sang périphérique; PFGE, électrophorèse sur gel en champs pulsé (321)

La diminution d'expression de BRCA1 associée au statut hétérozygote et due à la présence d'un seul allèle sauvage est également observée dans une certaine proportion de cancers sporadiques. Effectivement, jusqu'à 70% de ces cancers auraient perdu complètement l'expression d'un allèle de BRCA1 (324). L'hyperméthylation du promoteur de BRCA1 semble être responsable d'une partie de la diminution d'expression de BRCA1, aussi bien au niveau de l'ARNm que de la protéine (325). On observe également la délétion complète du locus comprenant BRCA1 et la surexpression du régulateur négatif de BRCA1, ID4, dans plusieurs cas (326). De plus, dans les cancers héréditaires, la mutation 185delAG, qui est très répandue, agirait probablement comme une mutation nulle, vu la très faible demi-vie de cette petite protéine (283) et l'augmentation du niveau d'expression de BRCA1 sauvage dans les MCF-7 résulte dans une diminution du développement de

tumeurs dans les souris nues (327). Il a également été démontré que la diminution de BRCA1 par ribozyme ou interférence à ARN dans des cellules de cancer du sein, entraîne un défaut de différenciation, une augmentation de la prolifération et l'hypersensibilité à l'agent pontant l'ADN, cisplatine ainsi qu'à l'inhibiteur de topoisomérase II (TopoII), étoposide (328-331), alors que les cellules qui développent une résistance au cisplatine démontrent un niveau plus élevé de BRCA1. Ces résultats établissent un lien entre le contrôle de la RH nécessaire à la réparation des lésions entraînées par les agents pontants l'ADN et le niveau d'expression de BRCA1 (332). Ils suggèrent également que la diminution d'expression de BRCA1 en soit, a un lien direct avec la résistance aux agents chimiothérapeutiques et la carcinogenèse. Cette hypothèse est supportée par l'hyper-méthylation observée chez plusieurs suppresseurs de tumeurs, comme RB, p16, VHL, MLH1, APC et E-cadherine (333), puisqu'elle est associée à une diminution de l'expression de ces gènes et à une augmentation de l'incidence de cancers. Finalement, très peu de cancers sporadiques présentent des mutations somatiques de *BRCA1* alors que la diminution d'expression de celui-ci est très fréquente dans la carcinogenèse (322,323), une évidence supplémentaire de l'importance du niveau d'expression de BRCA1 sur le développement tumoral.

En plus du rôle du niveau d'expression de BRCA1 sur sa fonction, certaines études ont démontré que des mutants de BRCA1 pourraient altérer la fonction du BRCA1 sauvage, également présent chez les hétérozygotes. Effectivement, lorsqu'exprimés dans des cellules normales pour BRCA1, certains mutants possèdent une fonction dominante négative. Chez la souris, l'expression de la partie N-terminale de BRCA1 dans des cellules normales, induit la radiosensibilité et la chimiosensibilité, augmente la tumorigenèse *in vivo*, en plus de perturber la différenciation et la formation des glandes mammaires (334, 335). Chez l'humain, la partie C-terminale accélère la prolifération et perturbe le contrôle du cycle cellulaire, principalement en G₂-M (336). De plus, l'expression de BRCA1 5382insC dans les MCF-7 entraîne une diminution de l'apoptose induite par la privation de sérum (338). Ces résultats pourraient indiquer un rôle dominant négatif pour les mutants de BRCA1. Toutefois, les résultats d'autres études entre

en contradiction avec le rôle dominant négatif des mutants de BRCA1. En utilisant des cellules humaines, une autre étude démontre que le BRCA1 mutant dans le domaine BRCT, M1775R, n'a aucun effet sur la formation des structures acineuses (328). Il a également été établi que l'expression d'un BRCA1 mutant pour un ou les deux domaines BRCT n'affecte pas la transactivation de p21, peu importe la présence ou non de BRCA1 sauvage (337), tout comme la présence d'une variété de mutants n'a pas d'effet sur la transcription p53-dépendante (249). Ces diverses études entrent donc en contradiction. Une étude plus élargie a été menée pour tenter d'établir la fonction exacte de divers mutants de BRCA1. Elle a démontré que certains mutants tronqués entre les acides aminés 302 et 1313 antagonisent le phénotype du BRCA1 sauvage alors qu'une mutation ponctuelle n'a aucun effet et qu'une troncation de 11 acides aminés en C-terminal conserve la fonction du BRCA1 sauvage (283). Cette petite troncation n'affecte pas les domaines BRCT, une région essentielle au fonctionnement de BRCA1 (339). Finalement, le rôle exact des différents mutants de BRCA1 associés au cancer demeure encore nébuleux mais on peut imaginer que les domaines affectés par la mutation vont se refléter dans le phénotype engendré et que les multiples fonctions de BRCA1 peuvent être affectées différemment.

Il est donc clair que l'effet de l'hétérozygotie de *BRCA1* ainsi que de *BRCA2* nécessite de plus amples investigations. En fait, ces études sont rendues difficiles par le manque de modèles génétiques adéquats. Effectivement, l'hétérozygotie de l'un ou l'autre des gènes *BRCA* ne cause apparemment aucune prédisposition à la carcinogenèse chez la souris malgré les quelques phénotypes de malformation des glandes mammaires, et ne montre pas de sensibilité aux agents chimiothérapeutiques ou aux RI (43, 340-343). L'homologie entre les gènes BRCA1/2 humains et murins est restreinte. Effectivement ils ne partagent qu'environ 59% d'identité de séquence (344). De plus, dans le cas de BRCA2, la localisation nucléaire est dictée par la présence d'un NLS. Chez l'humain, le NLS se retrouve en C-terminal et est donc absent de la majorité des mutants. Par contre, chez la souris, la paire de NLS précède l'exon 11 codant pour les divers domaines BRC. Cette disparité entraîne une différence marquée dans la localisation cellulaire

des mutants et donc dans leur aptitude à jouer un rôle de dominant-négatif (345). Ces modèles ont donc prouvé leur utilité mais ne sont pas idéals pour établir la fonction précise de BRCA1 ni de BRCA2. De plus, il paraît difficile d'établir un système d'interférence à ARN pour inhiber l'expression du BRCA1/2 sauvage spécifiquement, et la surexpression de BRCA1/2 dans un modèle cellulaire sauvage ne reflètera probablement pas la réalité puisqu'elle altère la stœchiométrie entre les différents partenaires protéiques de BRCA1/2.

1.7 Spécificité de tissus

Peut-être l'aspect le moins bien connu relié à une mutation dans un gène *BRCA* est sa caractéristique tissu-spécifique. Comment un gène ubiquitaire et jouant un rôle central dans la réparation de l'ADN, comme *BRCA1* ou *BRCA2*, prédispose quasi uniquement au développement du cancer du sein et de l'ovaire? Une variété d'informations supporte le concept que l'estrogène contribue au développement du cancer du sein et de l'ovaire. Tout d'abord, l'inhibition de la production d'estrogène par les inhibiteurs d'aromatases ou l'inhibition du récepteur par des anti-estrogènes diminuent la carcinogenèse (346-349). Chez la femme porteuse d'une mutation dans BRCA1/2, une ovariectomie pratiquée avant l'âge de 35 ans réduit les risques de cancer du sein de près de 75% (350-352). De plus, des facteurs cliniques qui reflètent une exposition accrue à l'estrogène comme des menstruations précoces, une ménopause tardive ou une thérapie hormonale augmentent les risques de développer le cancer, ce qui suggère un rôle clé de l'estrogène dans le développement tumoral (353).

Assurément, une aberration au niveau du contrôle de la transcription semble une explication populaire pour le rôle tissu-spécifique de BRCA1. Toutefois, les tumeurs associées à BRCA2 démontrent la même spécificité de tissu et les mêmes anomalies chromosomiques sans qu'aucun rôle pour BRCA2 n'ait été rapporté dans le contrôle de la transcription du ER α . De plus, la majorité des tumeurs associées à BRCA1 montrent un patron d'anomalies chromosomiques non-aléatoires comme des mutations dans le régulateur important du cycle cellulaire p53, dans le ER α ou des réarrangement chromosomiques, ce qui suggère que le

mode de pathogenèse repose plutôt sur l'instabilité génomique (354). Toutefois, les deux modes d'action ne sont peut-être pas mutuellement exclusifs. En effet, BRCA1 interagit directement avec le ER α et a été associé à l'inhibition de son activité transcriptionnelle due au recrutement de co-répresseurs (voir section 1.5.3)(355, 356). La présence de BRCA1 inhibe donc l'effet mitogénique de l'estrogène. BRCA1 aurait également la capacité de lier le récepteur de façon ligand-indépendante. Conséquemment, l'absence de BRCA1 confère aux cellules une activation accrue du récepteur en présence d'estrogène mais aussi la capacité d'activer le ER α indépendamment de son ligand ce qui conduit à une augmentation de l'expression des gènes de réponse à l'estrogène, majoritairement pro-prolifératifs comme c-MYC et Cycline D1 (279). En accord avec ces résultats, l'inhibition de BRCA1 augmente la capacité des cellules ovariennes à proliférer en absence d'estrogène (357) et stimule l'effet mitogénique de cette hormone (358). L'expression exogène de BRCA1, mais non de mutants associés au cancer, restaure la répression ligand-indépendante du ER α et ce de façon histones déacétylases-dépendante. En plus d'inhiber son activité transcriptionnelle, BRCA1 aurait également la capacité d'ubiquitiner *in vitro* le ER α , ce qui pourrait constituer un autre mode de régulation du récepteur par BRCA1 (359, 360). Puisque l'excès de prolifération associée à une déficience en BRCA1 se manifesterait principalement dans les tissus exprimant le ER α , ce scénario pourrait expliquer le caractère tissu-spécifique de BRCA1. Toutefois, il faut mentionner que la majorité des tumeurs du sein associées à BRCA1 sont ER α négatives (70%), alors que 70% des cancers sporadiques sont ER α positifs (361-363), ce qui soulève la question de l'importance du caractère pro-prolifératif de l'estrogène dans la progression tumorale associée à BRCA1. Ce paradoxe peut être expliqué puisque la majorité des cellules BRCA1 mutantes démontrent une expression normale du ER α alors que cette expression diminue lors de la progression tumorale, ce qui suggère que ce serait un événement secondaire à la carcinogenèse associée à BRCA1 et qui pourrait être le résultat de l'instabilité présente dans ces cellules (364). Rassemblées, ces observations suggèrent fortement que BRCA1 régule l'activité mitogénique du ER α . Toutefois, ces observations n'expliquent pas le caractère tissu-spécifique de BRCA2.

L'estrogène augmente le métabolisme cellulaire, la prolifération et inhibe l'apoptose (365). L'action du ER α conduit à une augmentation du nombre de cycle cellulaire et donc augmente le risque d'introduction d'une erreur lors de la réplication. Il a été démontré que les glandes mammaires de souris hétérozygotes pour BRCA1 et exposées à l'estrogène démontrent des anomalies développementales, ce qui suggère que BRCA1 serait requis pour le développement normal de cellules en période de prolifération intense et que BRCA1 pourrait jouer un rôle important dans la prolifération et la différenciation induites par l'estrogène (307, 343). Cependant, BRCA1 n'est associé à quasi aucune tumeur de tissus ayant une prolifération rapide et l'analyse du transcriptome humain révèle que le niveau de BRCA1 est très faible dans le colon (<http://bioinfo.amc.uva.nl>), ce qui suggère que BRCA1 n'est pas nécessaire lors d'une prolifération rapide.

Une autre alternative propose que l'estrogène soit métabolisé en dérivés qui peuvent endommager l'ADN. Cette hormone peut traverser la membrane cellulaire seule ou en partenariat avec son récepteur (366) et se localise principalement à la matrice nucléaire, le site où a lieu la réplication et la réparation de l'ADN (367). Le métabolisme de l'estrogène inclut un processus d'oxydo-réduction qui pourrait produire un stress oxydatif et donc conduire à une augmentation des dommages à l'ADN (368, 369). De plus, l'estrogène peut être métabolisé en dérivés quinones qui peuvent lier de façon stable l'ADN, avec une affinité particulière pour la guanine (370). Ces intermédiaires auraient la capacité d'arrêter les fourches de réplication ou d'entraîner la dépurination (Figure 15)(371-373). Chacune de ces étapes du métabolisme de l'estrogène est catalysée par diverses enzymes qui sont retrouvées dans diverses organelles, incluant le noyau (374) et dont certains polymorphismes ont été associés au développement tumoral (375). En absence de BRCA1, les voies de réparation de l'ADN sont moins efficaces, ce qui pourrait augmenter les risques de mutations et de réarrangements induits par l'estrogène (376). Finalement, certains tissus qui sont plus exposés à divers dommages pourraient être plus dépendants de gènes impliqués dans les mécanismes de réparation de ce type précis de lésions. Évidemment, les glandes mammaires et les ovaires sont particulièrement exposés aux métabolites carcinogènes de l'estrogène.

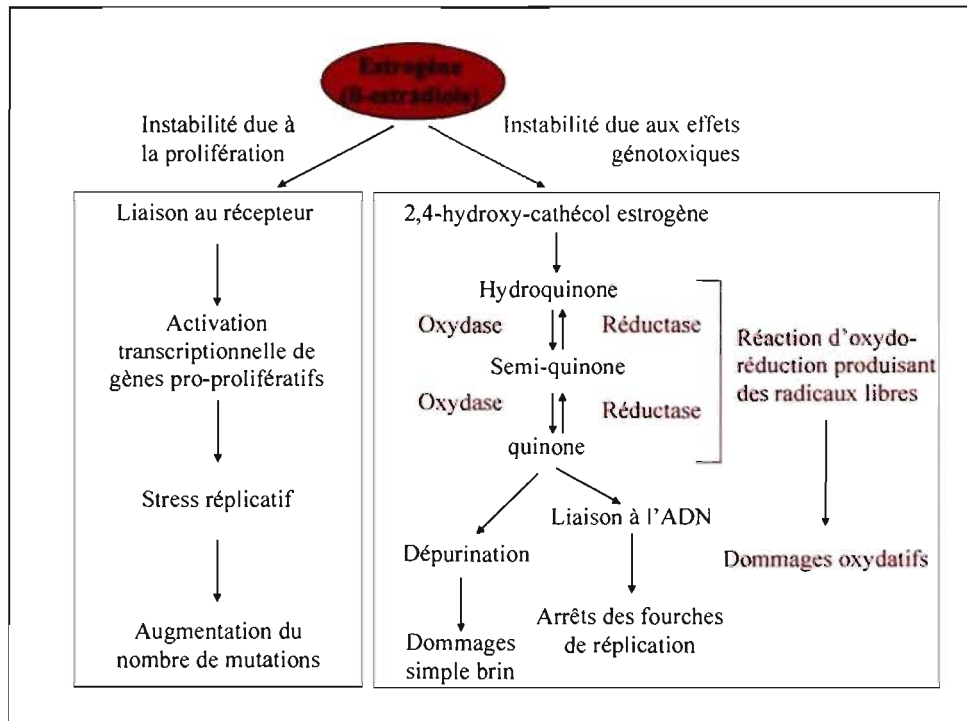


Figure 15. Causes postulées de l'instabilité génomique induite par l'estrogène. L'instabilité peut être causée par une stimulation estrogénique de la prolifération récepteur-dépendante ou due aux dommages à l'ADN causés par les métabolites de l'estrogène.

Certaines évidences tendent à démontrer le potentiel génotoxique de l'estrogène. Dans un essai de carcinogénèse, il a été démontré que de faibles doses d'estradiol (10^{-11} , 10^{-12}) causent une augmentation du taux de mutations du gène *HPRT*, *hRAS* et *Thymidine kinase* (377-379) et que l'exposition à l'estradiol augmente la perte d'hétérozygoté à certains locus chromosomiques précis, impliqués dans le cancer du sein, tout particulièrement les loci de *BRCA1*, *BRCA2* et *p53* (380-382). Chez la bactérie *E. coli*, l'estrogène peut stimuler la RH (385). Chez l'humain, cette hormone aurait la capacité d'augmenter le nombre de SCE dans les lymphocytes exposés (383), en plus de stimuler la résistance au méthotrexate (384), deux marqueurs de RH. L'estrogène est aussi relié à la transformation néoplasique et au développement tumoral dans divers modèles cellulaires et animaux (386-388). Il est établi que la formation des métabolites génotoxiques de l'estrogène a lieu indépendamment de la présence des récepteurs à l'estrogène et que cette hormone peut augmenter l'incidence de tumeur dans des

animaux qui expriment ou non ces récepteurs (371, 380). De plus, l'apparition de phénotypes associés à la transformation ne serait que bloquée partiellement suite au traitement avec un anti-estrogène, une molécule inactivant le récepteur de l'estrogène (380). Ces résultats suggèrent que les métabolites de l'estrogène pourraient agir indépendamment du récepteur pour stimuler la carcinogenèse (pour une revue exhaustive du potentiel génotoxique de l'estrogène 375). Dans une telle situation, l'effet des métabolites de l'estrogène combiné avec l'effet pro-prolifératif de cette hormone pourrait expliquer son importance dans le développement tumoral.

Les ovaires sont la principale source d'estrogène chez la femme pré-ménopausée. La conversion de l'androgène en estrogène, qui est l'étape limitante dans la biosynthèse de l'estrogène, est catalysée par les aromatasés. Par conséquent, le niveau d'expression ovarien d'aromatase détermine la concentration d'estrogène circulant. En plus de l'aromatase ovarienne, les aromatasés exprimées dans les tissus périphériques comme les tissus adipeux ou mammaires contribuent également au niveau d'estrogène circulant et d'estrogène local (389). Il est désormais établi que BRCA1 régule négativement l'expression des aromatasés en se liant à leurs divers promoteurs et en inhibant leurs activités transcriptionnelles, autant dans les granulocytes ovariens que dans les adipocytes mammaires (390-392). De plus, cette diminution d'expression, qui repose sur BRCA1, semble être dose-dépendante. Ces résultats suggèrent donc que BRCA1 aurait la capacité de limiter la quantité d'estrogène circulant et donc indirectement de limiter les effets de l'estrogène sur ses tissus cibles.

Très souvent dans le processus de carcinogenèse, le deuxième allèle de BRCA1/2 est inactivé soit par un procédé génétique comme une délétion ou une mutation, soit par un procédé épigénétique comme la méthylation du promoteur. Ces événements peuvent être favorisés par l'estrogène via deux mécanismes: 1) un effet mutagénique indirect dû à la stimulation de la prolifération ou 2) un effet mutagénique direct dû au potentiel génotoxique de ses métabolites (368). Dans ces hypothèses, le potentiel de BRCA1/2 à gérer le stress prolifératif et les dommages causés par l'estrogène semble essentiel, ce qui entraîne l'émergence d'un autre

concept: l'haploinsuffisance. Est-ce que les cellules porteuses d'une mutation monoallélique de BRCA1/2 seraient plus sensibles aux événements carcinogéniques induits par l'estrogène? Il s'agit d'une question intéressante qui pourrait expliquer le caractère tissu-spécifique des tumeurs associées à une mutation dans BRCA1/2.

1.8 Objectifs

1.8.1 Déterminer comment les cellules BRCA1-déficientes accumulent des réarrangements chromosomiques

Les premières études concernant BRCA1, effectuées chez la souris, ont démontré qu'une mutation homozygote de BRCA1 entraîne la mort durant l'embryogenèse précoce, due à un défaut de prolifération (39, 393). Ce phénotype semble incompatible avec le rôle tumeur suppresseur attribué à BRCA1 puisqu'on conçoit difficilement comment un défaut de prolifération peut prédisposer à la carcinogenèse. Une réponse possible à ce paradoxe est un effet de coopération avec une autre mutation qui permettrait aux cellules BRCA1-déficientes de surpasser le défaut de prolifération. Par exemple, une mutation dans p53 qui est retrouvée dans >70% des cancers reliés à BRCA1 (394-399). Toutefois, comment cette autre mutation survient, reste à déterminer. Nous savons que la déficience en BRCA1, comme en BRCA2, entraîne une dérégulation de la réparation des CDB par RH chez la souris. Hors, la présence d'une CDB non réparée devrait entraîner l'arrêt du cycle cellulaire et la mort. Dans ces circonstances, comment les cellules déficientes en BRCA1 peuvent-elles accumuler des réarrangements si les cellules instables sont condamnées à la mort par apoptose? Comme nous l'avons mentionné, le BRCA1 humain est très différent du BRCA1 murin et BRCA1 peut affecter la régulation de la RH à plusieurs niveaux. Puisqu'on peut logiquement émettre l'hypothèse que la RH est à l'origine des multiples réarrangements chromosomiques présents dans les tumeurs associées à BRCA1, nous avons voulu déterminer chez l'humain, quels mécanismes de recombinaison sont affectés par l'absence de BRCA1 pour ainsi mieux comprendre l'origine de l'instabilité génomique associée à BRCA1.

1.8.2 Comment l'haploinsuffisance de BRCA1 affecte la stabilité génomique?

Comme nous l'avons mentionné, la très grande majorité des tumeurs associées à BRCA1 montrent la perte d'hétérozygoté au locus de BRCA1 lors de la carcinogenèse. La perte de l'allèle fonctionnel peut s'effectuer aléatoirement ou encore être accélérée par l'instabilité qui pourrait être omniprésente dans les cellules hétérozygotes. Si un phénotype mutateur ou instable est associé au statut hétérozygote, il repose soit sur la diminution d'expression de BRCA1 due à la présence d'un seul allèle fonctionnel ou sur la présence d'un allèle mutant qui pourrait encoder un dominant négatif. Ces deux hypothèses ont successivement été appuyées puis écartées par diverses études contradictoires (voir section 1.6). Nous avons donc voulu tester laquelle de ces deux hypothèses s'applique à la régulation de la RH en présence d'un statut hétérozygote pour BRCA1.

1.8.3 En quoi BRCA1 affecte la réponse cellulaire au stress estrogénique?

Une question demeure, pourquoi une protéine essentielle et ubiquitaire, prédisposerait quasi uniquement à l'apparition du cancer du sein et de l'ovaire? Évidemment, comme nous l'avons discuté, l'estrogène peut stimuler la prolifération cellulaire en plus d'induire directement des dommages à l'ADN (voir section 1.7). L'accélération de la réplication et l'augmentation des lésions à l'ADN pourraient accroître la dépendance cellulaire à un mécanisme de RH fonctionnel. En conséquence, la présence de BRCA1 pourrait être nécessaire afin de pallier au stress estrogénique et ainsi maintenir la stabilité du génome entier via son rôle dans le contrôle de la RH, particulièrement dans les tissus exposés à cette hormone: les seins et les ovaires. Nous avons donc voulu tester cette hypothèse en mesurant le niveau de RH suite à un traitement à l'estrogène. Dans la mesure où la gestion du stress estrogénique serait médiée par BRCA1, on peut s'interroger sur l'importance du niveau d'expression de BRCA1 dans les hétérozygotes. La diminution de la capacité à gérer le stress estrogénique via une dérégulation de la RH pourrait être à la base de l'initiation de la carcinogenèse chez ces individus.

Chapitre 2. Matériel et Méthodes

Pour la majorité des techniques utilisées, la section *Matériel et Méthodes* des différents articles est détaillée. Dans cette section nous exposerons uniquement la technique qui n'a pas été employée dans les articles inclus.

2.1 Visualisation des échanges entre chromatides sœurs

Les cellules ont étéensemencées à une densité de 40% en présence de BrdU 10µg/ml, d'estrogènes à doses variables ou d'éthanol comme contrôle (Sigma-Aldrich, St-Louis, MO, USA). Elles ont été laissées au repos 36h à 37°C. Par la suite elles ont été trypsinisées etensemencées à une densité de 50%, encore une fois en présence de BrdU, d'estrogènes ou d'éthanol. Après 24h, la colcémide fût ajoutée à 50ng/ml durant 2h à 37°C pour arrêter le cycle cellulaire (Sigma-Aldrich, St-Louis, MO, USA). Les cellules ont été récoltées et soumises à un choc hypotonique de 1h10 dans le KCl 0.56% à 37 °C suivi de deux fixations de 15 minutes dans un mélange méthanol:acide acétique glacial (3:1 v/v). Ensuite on a procédé à l'étalement sur lames. Après vieillissement de 5 jours, les lames ont été colorées selon la procédure de fluorescence plus giemsa (FPG). Cette coloration consiste dans un bain de Hoechst 33258 0.5µg/ml, suivi d'une exposition à la lumière noire de 45 minutes et d'un bain Giemsa 3% (Sigma-Aldrich, St-Louis, MO, USA). Les chromatides sœurs ont été visualisées au microscope optique à une magnitude de 1000X. Au moins 30 cellules en mitose pour chaque conditions ont été comptées et ce pour 2 expériences indépendantes. Les résultats expérimentaux ont été testés par analyse de variance ANOVA pour une analyse globale de l'impact de diverses concentrations d'estrogène et par test T de Student pour voir l'impacte de chacune des concentrations indépendamment ou pour vérifier l'impact direct de BRCA1 sans traitement.

Chapitre 3.

BRCA1 regulates RAD51 function in response to DNA damage and suppresses spontaneous sister chromatid replication slippage: implications for sister chromatid cohesion, genome stability and carcinogenesis

Isabelle Cousineau, Christine Abaji, and Abdellah Belmaaza

Centre de recherche, Centre hospitalier de l'Université de Montréal, Hôpital Notre-Dame et Institut du cancer de Montréal, Montréal, Québec, Canada

Running title: BRCA1 regulates homologous recombination

Key words. BRCA1 / BRCA2 / RAD51 / Sister chromatid cohesion / DNA damage response / DNA repair

Article publié dans:

Cancer Research, vol. 65(24) : 11384-11391, 2005

*Isabelle Cousineau est responsable de 90% de la réalisation des travaux de recherche de cet article. Christine Abaji a généré le substrat de recombinaison et participé à l'analyse des recombinants. Abdellah Belmaaza a supervisé l'ensemble de l'étude et rédigé le manuscrit.

[Redacted]

[Redacted]
Christine Abaji

[Redacted]

Résumé

Les protéines de susceptibilité au cancer du sein et de l'ovaire BRCA1 et BRCA2 favorisent le maintien de la stabilité du génome grâce, entre autre, à leur rôle dans la réparation des dommages causés à l'ADN. Elles colocalisent toutes deux avec RAD51 aux sites de dommages/réplication et activent la réparation des cassures double brin (CDB) par recombinaison homologue (RH) RAD51-dépendante. Alors que BRCA2 interagit directement avec RAD51 et régule celui-ci, le rôle de BRCA1 dans ce processus demeure mal défini. Toutefois, BRCA1 pourrait réguler RAD51 en réponse au dommage à l'ADN et/ou via sa capacité à interagir et à réguler MRE11/RAD50/NBS1 durant la transformation de la CDB en extrémités d'ADN simple brin, un substrat nécessaire à l'action de RAD51. Pour tester ces hypothèses, nous avons mesuré les effets de BRCA1 sur la compétition entre la RH RAD51-dépendante (conversion génique et crossover), versus la RH RAD51-indépendante (appariement simple brin), au site d'une CDB chromosomique à l'intérieur d'une répétition d'ADN, un substrat pour les deux mécanismes de RH. L'expression de BRCA1 sauvage dans une lignée cellulaire humaine BRCA1-déficiente favorise à la fois l'appariement simple brin et la conversion génique mais avec une nette préférence pour la conversion génique. De plus, BRCA1 supprime la conversion génique spontanée tout comme les événements de délétions, ceux-ci pouvant être le résultat de crossover ou de glissements lors de la réplication, un processus RAD51-indépendant. BRCA1 ne semble pas inhiber les crossovers. De ces résultats, nous concluons que (i) BRCA1 régule la fonction de RAD51 selon le type de dommage et que (ii) BRCA1 supprime les glissements lors de la réplication, ce qui suggère un rôle pour cette protéine dans la cohésion et/ou l'alignement des chromatides sœurs. Suite à l'inactivation de BRCA1, la perte d'un tel contrôle en présence de dommages à l'ADN induits par l'estrogène pourrait être un événement clé qui conduirait à l'instabilité génomique et à la carcinogénèse.

Abstract

The breast/ovarian cancer susceptibility proteins BRCA1 and BRCA2 maintain genome stability, at least in part, through a functional role in DNA damage repair. They both colocalize with RAD51 at sites of DNA damage/replication and activate RAD51-mediated homologous recombination (HR) repair of DNA double-strand breaks (DSBs). Whereas BRCA2 interacts directly with and regulates RAD51, the role of BRCA1 in this process is unclear. However, BRCA1 may regulate RAD51 in response to DNA damage or through its ability to interact with and regulate MRE11/RAD50/NBS1 during the processing of DSBs into single-strand DNA (ssDNA) ends, prerequisite substrates for RAD51, or both. To test these hypotheses, we measured the effect of BRCA1 on the competition between RAD51-mediated HR (gene conversion and crossover), versus RAD51-independent HR (single-strand annealing), for ssDNA at a site-specific chromosomal DSB within a DNA repeat, a substrate for both HR pathways. Expression of wild-type BRCA1 in BRCA1-deficient human recombination reporter cell lines promoted both gene conversion and single-strand annealing but greatly enhanced gene conversion. In addition, BRCA1 also suppressed both spontaneous gene conversion and deletion events, which can arise from either crossover or sister chromatid replication slippage (SCRS), a RAD51-independent process. BRCA1 does not seem to block crossover. From these results, we conclude that (i) BRCA1 regulates RAD51 function in response to the type of DNA damage and (ii) BRCA1 suppresses SCRS, suggesting a role for this protein in sister chromatid cohesion/alignment. Loss of such control in response to estrogen-induced DNA damage after *BRCA1* inactivation may be a key initial event that triggers genome instability and carcinogenesis.

Introduction

Germ-line mutations in the *BRCA1* and *BRCA2* genes predispose humans to breast and ovarian cancers (1). Tumours derived from predisposed individuals show loss of heterozygosity for the wild-type allele with retention of the inherited, cancer-eliciting, mutant allele, indicating that *BRCA1* and *BRCA2* act as tumour suppressor genes. *BRCA1* and *BRCA2* genes encode large, unrelated nuclear proteins that act as regulators of DNA repair, transcription, and the cell cycle in response to DNA damage, although their precise role in these processes is unclear and the mechanisms underlying tissue specificity of their tumour suppressive property remain speculative (2-4).

Common to *BRCA1* and *BRCA2* is the activation of sister chromatid recombination, a homologous recombination (HR) process in which a chromatid that suffers a double-strand break (DSB) during replication uses neighbouring, undamaged sister chromatid as a template for repair (2, 3). Initial evidence of such a role derives from the observation that *BRCA1* and *BRCA2* both relocate with the essential component of HR, RAD51, to sites of DNA damage and replication forks marked by proliferating cell nuclear antigen (2). In addition, *BRCA1*- and *BRCA2*-deficient cells exhibit a deficit in RAD51-mediated HR repair of site-specific chromosomal DSBs and hypersensitivity to DNA-damaging agents that induce DSBs (5). Moreover, replication forks stalled at DNA damage collapse into DSBs in *BRCA2*-deficient cells (6). Convincingly, *BRCA1*- and *BRCA2*-deficient mouse or human cells sustain spontaneous chromatid-type aberrations, including chromosome and chromatid breaks as well as tri- and quadriradial chromosomes, markers of aberrant mitotic S-phase recombination that are typical of the human cancer predisposition diseases Bloom's syndrome, ataxia telangiectasia and Fanconi's anemia mutated in *BLM*, *ATM*, and *FANC* genes, respectively (3, 7).

Whereas in this *ménage à deux* *BRCA2* regulates both the intracellular localization and function of RAD51 (8-10), the role of *BRCA1* is unclear, however. RAD51, the equivalent of bacterial RecA, is functional as a polymer, made up of hundreds of monomers that coat single-strand DNA (ssDNA) and form a

nucleoprotein filament that invades and pairs with an intact homologous DNA duplex (11). This DNA strand exchange reaction enables the invading 3' ssDNA end to prime new DNA synthesis, leading to the formation of a HR intermediate that can either disassemble (i.e. the newly synthesized strand can be displaced and anneal with the non-invading 3' ssDNA end to elicit non-crossover gene conversion only) or be processed to a Holliday junction intermediate to yield gene conversion with or without crossover (12-15). In mitotic cells, HR can occur almost exclusively by gene conversion and is considered to be error-free when it involves perfectly aligned sister chromatids (16). However, HR can also be deleterious when it takes place between repetitive sequences, and, in excess, it can promote genome instability and cause genetic diseases and cancer (7, 12, 17).

BRCA2 directly binds RAD51 and controls the assembly and disassembly of RAD51 nucleoprotein filament (8). BRCA1 might not directly regulate RAD51, because interaction between BRCA1 and RAD51 is indirect and stoichiometrically negligible (18). However, BRCA1 may regulate RAD51 function in response to DNA damage or through its interaction with other proteins involved in HR. In response to replication forks arrest or DNA damage, BRCA1 is bound and hyperphosphorylated by ATM and ATM-related kinase ATR (4). However, whether or how these modifications of BRCA1 affect RAD51 function remains obscure. BRCA1 also interacts with RAD50, and its partners MRE11 and NBS1, and in response to DNA damage, BRCA1 and MRE11/RAD50/NBS1 (MRN) complex colocalize with other HR proteins at sites of DNA damage and replication (19, 20). BRCA1 apparently functions as a regulator of the MRN complex (21). The MRE11 subunit possesses nuclease activity, which resects flush ends of DSBs to generate ssDNA tracts, and BRCA1 directly binds DNA and inhibits this MRE11 activity presumably to regulate the length and the persistence of ssDNA generation at sites of DNA damage (22). Because ssDNA is a substrate for RAD51, BRCA1 might play an essential role in RAD51 recombination by modulating MRE11 activity. The MRN complex also functions in non-homologous end joining (NHEJ) of DSB ends (23). Consistent with this, BRCA1-deficient cells exhibit a deficit in

both gene conversion repair (24, 25) and micro-homology-mediated NHEJ repair of site-specific chromosomal DSBs (26).

Given that ssDNA is also a substrate for single-strand annealing (SSA), a RAD51-independent, non-conservative HR pathway that repairs DSBs within DNA repeats (12, 13), we reasoned that by measuring the effect of BRCA1 on the competition between gene conversion and SSA for ssDNA, we could gain insight into the role of BRCA1 in the RAD51 pathway. The premise is that a role of BRCA1 only in the processing of DSB ends would presumably affect gene conversion and SSA equally, whereas an additional role of BRCA1 in activating RAD51 would favour gene conversion over SSA as has been reported with BRCA2 (9, 27, 28). To discriminate between these two possibilities, we employed a well-characterized HR assay system that can monitor distinct HR pathways in a BRCA1-deficient background (29). Recently, by using this assay system, we found that BRCA2 not only activates RAD51 pathway following chromosomal DSBs but also suppresses it in the absence of such DNA damage, providing evidence of a dual role for this protein in regulating RAD51 function in response to the type of DNA damage (9). In addition, BRCA2 seemed to suppress sister chromatid replication slippage (SCRS), suggesting a role for this protein in sister chromatid cohesion/alignment (9).

Here, we report that in this assay system, BRCA1 acts like BRCA2, supporting the notion that both proteins work in concert to protect against estrogen-induced DNA damage and maintain both chromosome structure and number.

Materials and Methods

DNA manipulations, cell lines, culture, and DNA transfections. The recombination reporter plasmid pCAdir was described previously (Fig. 1)(9, 29). The human breast cancer cell lines MCF-7 and HCC1937 originated from the American Type Culture Collection (Manassas, VA). To generate the parental HCC1937 cell lines d55 and d56, cells were electroporated at 250 V/960 μ F with 5 μ g of linear pCAdir (9, 29). The electroporated cells were subjected to Hygromycin (Hyg) selection (75 μ g/ml) 48 h later, and several Hyg-resistant (Hyg^R) cell clones were picked and amplified individually for polymerase chain reaction (PCR) and Southern blot analyses to identify intact, single-copy integration events. Single-copy integration events were deemed necessary not only to facilitate analysis of recombination products but also to prevent silencing of the HR reporter gene by the adjacent transcription units (30).

The parental cell lines were stably transfected with a pCR3-*Neo*-based expression vector containing wild-type *BRCA1* (31) or with an empty control vector by using the Effectene Transfection Reagent kit (Qiagen, Valencia, CA). Forty-eight hours later, the transfected cells were cultured in medium containing G418 (450 μ g/ml). Neomycin-resistant (G418^R) cell clones were picked and amplified individually for qualitative *BRCA1* expression analysis by reverse transcription (RT)-PCR and Western blotting.

RT-PCR. RNA from individual cell clones was extracted with Trizol reagent and transcribed to cDNA, using reverse transcriptase and primers (hexamers) of the SuperScript First-Strand Synthesis System RT-PCR kit (Invitrogen, Carlsbad, CA). The primer pairs employed for PCR: pCR3-F (5'-cgactcactatagggag-3') and BRCA1R (5'-atactttggatgataga-3') amplify the 377 bp fragment of wild-type *BRCA1* cDNA only, whereas 18SF (5'-tgaggccatgattaagaggg-3') and 18SR (5'-cgctgagccagttcagtgtag-3') amplify a 642 bp fragment of 18S cDNA of ribosomal RNA. PCR amplifications were undertaken with the Expand High Fidelity PCR System kit (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN) for 30 cycles (32).

Protein manipulations. Proteins were extracted and quantified as described previously (9, 29). Protein extract (50 μg) was separated on 5% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel, transferred to a nitrocellulose membrane (Amersham, Piscataway, NJ), and probed with mouse anti-BRCA1 antibody (Ab1, Oncogene, Boston, MA), which recognizes wild-type BRCA1 and the truncated BRCA1 protein.

HR frequency and rate. For spontaneous HR, 1×10^6 to 5×10^6 cells were subjected to Puromycin (Puro; 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) selection 24 hours after plating. HR frequency was assessed by dividing the number of Puro-resistant (Puro^R) colonies by the number of cells plated for selection. Because HR between direct repeats can delete the *Hyg* gene, the cells were maintained for 1 to 2 weeks without Hyg prior to Puro selection.

The HR rate was determined in 2 independent experiments as described previously (9, 29). Briefly, 10 or 12 independent cultures (1 to 100 cells) of either parental d55 or its BRCA1-expressing derivative, the d55/BRCA1-4 cell line, were plated in parallel and cultured to confluence. Cells were trypsinized and counted, and a portion was taken for plating efficiency estimation. The remaining cells were plated under Puro selection, and the resulting Puro^R colonies were used to calculate the frequency of HR. The HR rate was calculated from these frequencies by a fluctuation test.

For I-*SceI*-induced HR experiments, the vectors, p β actine-*SceI* and pFRED25, which express the meganuclease I-*SceI* and green fluorescent protein (GFP) respectively, were co-transfected into 1×10^5 to 4×10^5 cells with the Fugene 6 reagent kit (Boehringer Mannheim). In parallel experiments, the same number of cells was transfected with pFRED25 and pMC1neo, the latter to correct for DNA content as a control for I-*SceI* efficiency (spontaneous HR). GFP-expressing cells were counted 48 hours after transfection to examine the efficiency of transfection and normalize the HR frequencies. Puro selection was performed 10

days after transfection. The frequency of I-SceI-induced HR was calculated by dividing the number of Puro^R colonies by the number of GFP-expressing cells (9).

PCR analysis of Puro^R colonies. Genomic DNA from individual Puro^R cell clones was extracted, and 400 ng were subjected to PCR, as described previously (32). The primer pairs employed in PCR, Hyg4419 (5'-gctgtgtagaagtactcgccg-3') and pUC469 (5'-tgaccatgattacgccaagct-3') amplify a 2,324 bp gene conversion fragment, whereas pUC315 (5'-aaaggggatgtgctgcaaggcga-3') and pUC469 amplify the 1,863 bp deletion fragment (9).

Results

Stable expression of wild-type BRCA1 in HCC1937 recombination reporter cell lines. The human breast carcinoma cell line HCC1937, which derives from a germ-line *BRCA1* mutation carrier, shows decreased DSB repair efficiency that can be partially restored by expressing an exogenous wild-type *BRCA1* allele (25, 33, 34) but not mutant, cancer-eliciting *BRCA1* alleles (34). HCC1937 cells synthesize a truncated BRCA1 protein, the product of a cancer-eliciting mutant allele (*5382insC*), at a very low level, but no wild-type protein (18, 25).

To study the effect of the absence of intact BRCA1 on RAD51-mediated HR, we expressed wild-type BRCA1 in 2 HCC1937 recombination reporter cell lines, d55 and d56 (Fig. 1). These were transfected with pCR3-*BRCA1* or pCR3 (31), a G418^R-borne vector encoding or not wild-type BRCA1 protein. G418^R cell clones were amplified in parallel and subjected to qualitative analyses for *BRCA1* expression at both the mRNA and protein levels (Fig. 2A and B). The different BRCA1-expressing derivative lines, listed in Figure 2 and Table 1, manifested no major changes in growth rate or plating efficiency relative to G418^R, parent lines transfected with the empty vector (data not shown)(24, 25, 34). The BRCA1 expression level in complemented cells seemed to be lower than in MCF-7 cells (Fig. 2B, data not shown)

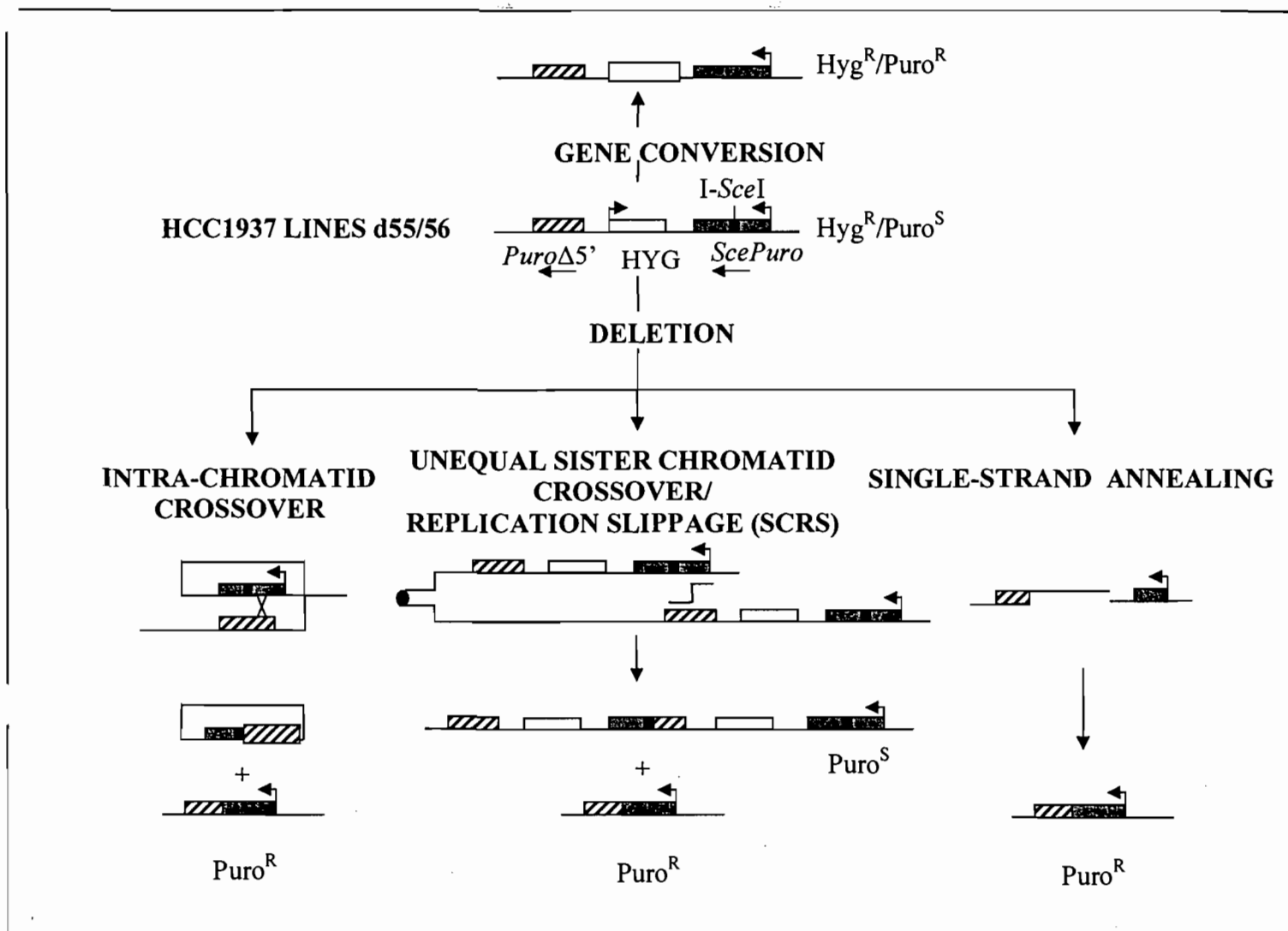


Figure 1. Chromosomal homologous recombination between direct repeats. The HCC1937 cell lines d55 and d56 carry, in their genome, a direct repeat of 2 inactive *Puro* genes, separated by the *Hyg* gene. They are *Hyg^R* but *Puro*-sensitive (*Puro^S*). A spontaneous or a DSB-induced HR event reconstitutes a functional *Puro* gene through loss of the *I-SceI* site and gain of the *EagI/BssHII* sites, restoring resistance to *Puro* (*Puro^R*). Because the *I-SceI* insertion mutation in *ScePuro* entails deletion of the *EagI* and *BssHII* sites, only HR events between the 2 *Puro* cassettes restore a functional *ScePuro* gene. A gene conversion event restores 1 functional *Puro* gene without affecting the overall structure of the locus. A deletion event, which can result either from crossover, SSA or SCRS, removes 1 copy of the *Puro* cassettes together with the intervening *Hyg* gene.

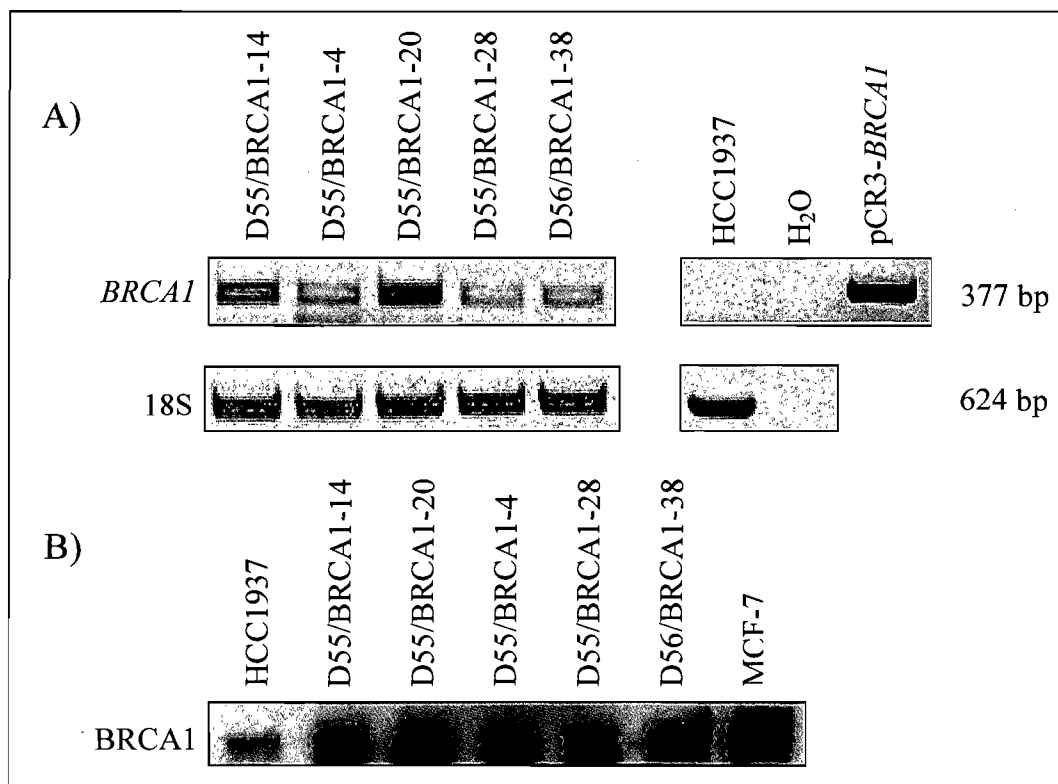


Figure 2. Stable expression of BRCA1 in HCC1937 recombination reporter lines. A, Qualitative RT-PCR was carried out with a primer pair that is specific for wild-type *BRCA1* mRNA to amplify a 377 bp fragment in the expressing cell lines, whereas a primer pair specific for ribosomal RNA chosen as a control for RT-PCR amplified a 624 bp fragment in both BRCA1-expressing and non-expressing cell lines. DNA of pCR3-*BRCA1* was used as a positive control, whereas a G148^R-HCC1937 cell line and water were employed as negative controls. B, Western blot analysis of protein extracts with an antibody directed against the N-terminus of full-length and truncated BRCA1 proteins.

BRCA1 decreases spontaneous homologous recombination. The HCC1937 reporter cell lines carry, in their genome, a single, intact copy of a HR construct, pCAdir, containing a direct repeat of 2 inactive *Puro*^R genes separated by the *Hyg*^R gene (Fig. 1). Deleting *EagI* and *BssHII* restriction sites and inserting 1 *I-SceI* cleavage site inactivated the full-length *Puro* gene, whereas the wild-type *Puro* gene contained an inactivating 5' deletion. A HR event between the 2 *Puro* cassettes would reconstitute a functional *Puro* gene through loss of the *I-SceI* and gain of the wild-type *EagI/BssHII* sites, restoring resistance to the drug Puro in a colony assay (9, 29).

First, we determined whether spontaneous HR (i.e. without treatment of cells with exogenous DNA damaging agents) is affected by BRCA1. Single G418^R/Hyg^R HCC1937 cell clones and BRCA1-expressing derivatives, listed in Table 1, were grown in parallel and subjected to Puro selection 2 to 3 weeks later. Puro^R colonies were counted to assess the frequency of spontaneous HR as the number of Puro^R colonies divided by the number of cells plated 24 hours before selection. BRCA1-expressing cell clones exhibited 4- to 7-fold frequency decreases relative to their parents (Table 1). We also ascertained the HR rate (HR events/cell/generation) of the parental clone d55 ($1.41 \pm 0.34 \times 10^{-6}$) and its BRCA1-expressing derivative, the d55/BRCA1-4 cell clone ($2.90 \pm 0.62 \times 10^{-7}$). BRCA1 diminished the rate by 5-fold. These results reveal that HCC1937 cells exhibit a spontaneous hyper-recombination phenotype as BRCA2-deficient cells (9, 27).

Table 1. Effect of BRCA1 on spontaneous homologous recombination

Cell lines	HR frequency ^a	Ratio ^b
d55	$1.0 \pm 0.33 \times 10^{-5}$	
d55/BRCA1-4	$1.5 \pm 0.71 \times 10^{-6}$	5.4
d55/BRCA1-14	$1.4 \pm 0.28 \times 10^{-6}$	7.4
d55/BRCA1-20	$1.9 \pm 0.13 \times 10^{-6}$	6.9
d55/BRCA1-21	$2.2 \pm 0.71 \times 10^{-6}$	4.6
d55/BRCA1-28	$2.3 \pm 0.14 \times 10^{-6}$	4.4
d56	$3.5 \pm 1.1 \times 10^{-6}$	
d56/BRCA1-20	$7.0 \pm 1.41 \times 10^{-7}$	5.0
d56/BRCA1-24	$5.0 \pm 3.54 \times 10^{-7}$	7.0
d56/BRCA1-38	$5.0 \pm 0.07 \times 10^{-7}$	7.0

^a HR frequency represents the mean of 3 independent experiments for each cell line and is determined from the number of Puro^R cell clones relative to the total number of viable cells plated 24 hours before selection. Parent and BRCA1-expressing G418^R derivative lines were plated in parallel.

^b Ratio (parent/BRCA1-expressing derivative lines) indicates HR fold decrease in BRCA1-expressing cells relative to their parents

BRCA1 decreases both spontaneous gene conversion and deletion events without affecting the processing of recombination intermediates. The use of *direct DNA repeats as HR substrates provides a measure of both intra-chromatid and unequal sister chromatid interactions that can result in 2 types of products: gene conversion and deletion (Fig. 1) (9, 13) and references therein.* Gene conversion associated or not with crossover depends on RAD51. Gene conversion keeps the structure of a locus intact and thus can arise either from intra-chromatid or unequal inter-sister chromatid interactions. Whereas an intra-chromatid crossover event leads to the deletion of 1 DNA repeat and the intervening sequences as a circle (Fig. 1), an unequal sister chromatid crossover culminates in 1 chromatid with deletion and the sister chromatid with triplication of DNA repeat and duplication of the intervening sequences (Fig. 1). However, such unequal sister chromatid exchange events can also arise spontaneously from SCRS, a RAD51-independent process (Fig. 1).

To determine which HR pathway was more affected by BRCA1, we analyzed independent, spontaneous HR events that derived from several independent cultures by plating cells at a lower density. A single Puro^R colony was picked from each culture and analyzed by PCR (Figure 3). Out of 47 spontaneous HR events, 13 (28%) represented gene conversion and the remaining 34 (72%), deletion events (Table 2). Such a predominance of spontaneous deletion events over gene conversion events in the absence of a functional BRCA1 could be due either to increased crossover events or SCRS events, or both. Although there is yet no evidence of a role of BRCA1 in crossover suppression, BRCA1 shows high affinity for branched DNA structures (22) and interacts with the DNA helicase BLM (20) that acts on Holliday junctions to suppress crossover and promote gene conversion (35). If BRCA1 were to act during this function of BLM, the proportion of spontaneous deletion events would be expected to decrease and that of gene conversion events to increase in the presence of wild-type BRCA1. However, no apparent difference in the proportion of gene conversion and deletion events was observed between parental cell clones and BRCA1-expressing derivatives (Table 2). It remains possible that BRCA1 will suppress a yet unidentified HR pathway

that leads exclusively to crossover events. Whereas current models of HR invoke that gene conversion and crossover can arise from the processing of the same Holliday junction intermediate (12, 13, 36), there is evidence that gene conversion and crossover can be regulated differently during meiosis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* (37). Whether similar mechanisms also operate in mammals is not known, but BRCA1 has been shown to promote rather than suppress crossover during spermatogenesis in mice (38). These data argue against a role of BRCA1 in crossover suppression. Therefore, we conclude that BRCA1 expression in HCC1937 cells decreased both spontaneous RAD51-mediated HR and RAD51-independent SCRS events.

Table 2. Effect of BRCA1 on homologous recombination pathways

Cell lines	Spontaneous HR		I-SceI HR	
	GC	CO/SCRS	GC	CO/SSA
d/55/56 (BRCA1-)	13/47 (28%)	34/47 (72%)	12/37 (32%)	25/37 (68%)
d55/56 (BRCA1+)	5/20 (25%)	15/20 (75%)	39/75 (52%)	36/75 (48%)

Gene conversion (GC) and crossover (CO) require RAD51, whereas sister chromatid replication slippage (SCRS) and single-strand annealing (SSA) do not (see text). The shift of I-SceI-induced CO/SSA to GC in BRCA1-expressing cells compared to parental cells is significant (p=0.039).

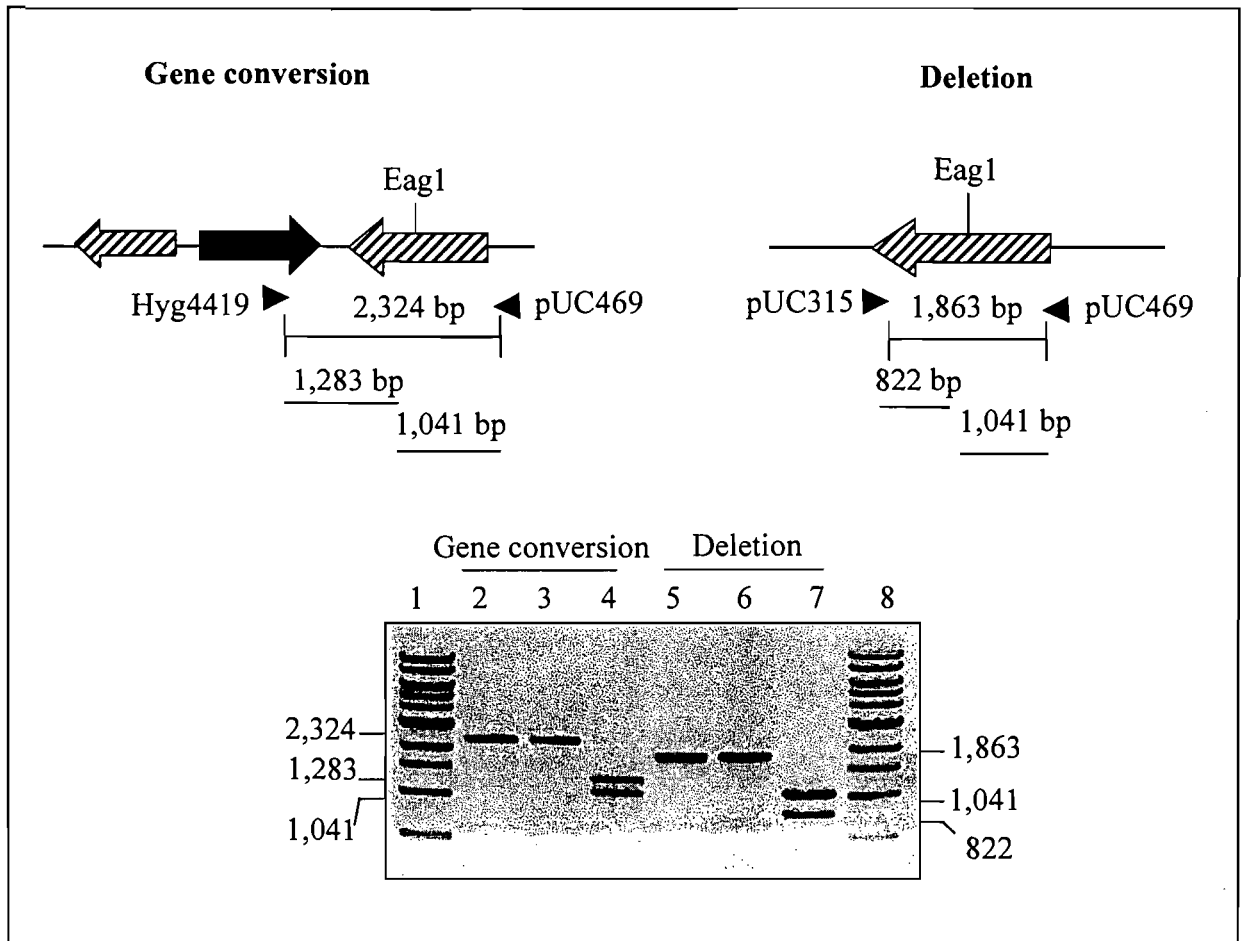


Figure 3. PCR analysis of homologous recombination products. The primer pair Hyg4419/pUC469 amplifies a gene conversion fragment of 2,324 bp (lane 2), which is resistant to *I-SceI* (lane 3) but can be cut with *EagI* into 1,283 bp and 1,041 bp fragments (lane 4). The primer pair pUC315 and pUC469 amplifies a deletion (crossover/SSA/SCRS) fragment (lane 5), which is resistant to *I-SceI* (lane 6) but can be cut with *EagI* into 822 bp and 1,041 bp fragments (lane 7). Lanes 1 and 8 represent a 1 kbp ladder.

BRCA1 promotes homologous recombination repair of chromosomal double-strand breaks. Direct evidence that BRCA1 promotes HR repair of chromosomal DSBs was obtained by using the I-SceI system (24, 25, 39). To analyze the effect of BRCA1 on chromosomal DSB repair, the parental lines and their BRCA1-expressing derivatives were transiently co-transfected with p β actin-I-SceI vector, which expresses I-SceI, and a GFP-expressing vector employed to evaluate transfection efficiency. When the I-SceI site in the full-length *Puro* gene is cleaved, HR would repair the DSB (9). No difference in cell viability following transfection was noted between BRCA1-expressing and non-expressing cell lines (data not shown) (24, 25, 34, 39). Co-transfected cells were maintained in Hyg-free medium, and Puro was added to the medium 10 days later. I-SceI expression increased the frequency of Puro^R colony formation in all cell lines, but BRCA1-expressing lines exhibited 4- to 9-fold increments relative to their parents (Table 3). This is similar to the 5-fold increase in I-SceI-induced HR in mouse embryonic stem cells or HCC1937 cells complemented with wild-type BRCA1 (24, 25, 39).

Table 3. Effect of BRCA1 on I-SceI-induced homologous recombination

Cell lines	HR frequency ^a		Ratio ^b I-SceI/Spontaneous
	Spontaneous	HR I-SceI-HR	
d55	$1.0 \pm 0.14 \times 10^{-5}$	$8.2 \pm 1.13 \times 10^{-5}$ (8.2)	
d55/BRCA1-4	$3.0 \pm 0.21 \times 10^{-6}$	$1.7 \pm 0.50 \times 10^{-4}$ (56.7)	6.9
d55/BRCA1-14	$1.0 \pm 0.71 \times 10^{-6}$	$7.3 \pm 2.12 \times 10^{-5}$ (73.0)	8.9
d55/BRCA1-28	$2.0 \pm 0.57 \times 10^{-6}$	$1.3 \pm 0.03 \times 10^{-4}$ (65.0)	7.9
d56	$5.0 \pm 0.71 \times 10^{-6}$	$1.7 \pm 0.03 \times 10^{-4}$ (34)	
d56/BRCA1-20	$2.0 \pm 0.71 \times 10^{-6}$	$2.7 \pm 0.14 \times 10^{-4}$ (135)	3.9
d56/BRCA1-38	$2.0 \pm 1.41 \times 10^{-6}$	$4.2 \pm 0.04 \times 10^{-4}$ (210)	6.1

^a HR frequency represents the mean of 3 independent experiments for each cell line. I-SceI frequency was calculated from the number of Puro^R colonies relative to the number of cells expressing GFP (see Materials and Methods). Puro selection was applied 10 days after transfection of cells with I-SceI expressing vector or GFP-expressing control vector for spontaneous HR. Numbers in parentheses represent fold increase in HR frequencies after I-SceI expression.

^b Ratio indicates fold increase in BRCA1-expressing cells relative to their parents.

BRCA1 activates RAD51 function. BRCA1 promotes gene conversion repair of I-SceI-induced chromosomal DSBs (24, 25), but its role in this RAD51-mediated process is unclear. Although BRCA1 co-localizes with both RAD51 and BRCA2 in S-phase nuclei and in cells treated with DNA-damaging agents, the majority of BRCA1 does not physically associate with BRCA2 and RAD51 (18). However, BRCA1 interacts physically with the MRN complex (19, 20). Whereas MRN is involved in DSB ends processing into ssDNA at an early step in gene conversion repair, RAD51 is involved at a later step. Thus, BRCA1 may promote gene conversion repair by regulating MRN, RAD51, or both. Direct repeat assay systems can be used to discriminate between these possibilities. Following a DSB at direct repeats, gene conversion competes with SSA for ssDNA (13). SSA anneals complementary ssDNA ends flanking a DSB, culminating in the deletion of 1 DNA repeat and the intervening sequences (Fig. 1), and becomes highly efficient in cells that are deficient in RAD51 function (9, 13, 27, 28). Thus, a role of BRCA1 in RAD51-mediated HR solely in the processing of DSB ends would affect gene conversion and SSA equally, whereas a role for BRCA1 in activating RAD51 function would favour gene conversion over SSA.

Previous studies could not determine the contribution of BRCA1 SSA and gene conversion in BRCA1-deficient backgrounds, as the HR assay systems employed monitored only deletion events (39) or only gene conversion events (24, 25). To determine which DSB repair pathway was more affected by BRCA1, we analyzed the structure of DSB repair products (Puro^R colonies) by PCR (Fig. 3). With the parental cell clones d55 and d56, out of 37 Puro^R colonies analyzed, 32% (12 of 37) represented gene conversion and 68% (25 of 37) represented deletion events. Such a predominance of SSA over gene conversion in HCC1937 cells is a defining feature of BRCA2-deficient cells, indicating a defect in RAD51 pathway (9, 27, 28). In addition, with the BRCA1-expressing derivative lines, 52% (39 of 75) represented gene conversion and only 48% (36 of 75), deletion events (Table 2). Such a significant shift from SSA to gene conversion together with the 4- to 9-fold increase in the frequency of I-SceI-induced HR in BRCA1-expressing derivative lines (Table 3) indicate that BRCA1 promotes DSB repair by both gene

conversion SSA but plays a greater role in gene conversion. However, as HR repair involving direct repeats occurs almost exclusively by gene conversion in wild-type cells (16, 29), and references therein), the partial shift to gene conversion events in BRCA1-expressing cell clones could reflect their partial complementation (Fig. 2B). From these results, we conclude that the role of BRCA1 in RAD51-mediated recombination is not limited only to the processing of DSB ends but also to activate RAD51.

Discussion

This is the first study that employed a direct repeat assay system to monitor distinct HR pathways in a BRCA1-deficient background. An additional characteristic feature of the assay system is that the HR reporter gene escapes repression from the adjacent, dominant marker gene in both BRCA1-expressing and non-expressing cell clones (29)(data not shown). Efficient expression of reporter genes is as important as DNA strand exchange when measuring HR in this type of assay systems. It has been consistently shown with various organisms that in established cell clones, which had been initially selected for the expression of a marker gene, the adjacent reporter gene was usually repressed (30). This silencing phenomenon, known as «transcriptional interference» or «promoter suppression» occurs at the transcriptional level, is cis-acting, epigenetic, and heritable and can be associated with alterations of chromatin structure. Given that BRCA1 regulates DNA transcription and alters chromatin structure (4, 23), an interference/suppression-free HR assay system was deemed necessary for this study.

In this assay system, BRCA1 not only promotes gene conversion repair of chromosomal DSBs but also suppresses spontaneous gene conversion events, providing evidence of a dual role for this protein in regulating RAD51 recombination according to the type of DNA damage. In addition, following chromosomal DSBs, BRCA1 promotes both gene conversion and SSA but greatly enhances gene conversion, providing the first direct evidence that BRCA1 activates RAD51. Moreover, BRCA1 suppresses spontaneous deletion events by SCRS, suggesting a role for this protein in sister chromatid cohesion and/or alignment. Given that these roles of BRCA1 have also been demonstrated for BRCA2 (9), and BRCA1- and BRCA2-deficient cells exhibit similar chromosomal abnormalities, BRCA1 and BRCA2 may act in concert to regulate such processes (Fig. 4)(9).

It is noteworthy that the spontaneous hyper-recombination phenotype of BRCA1/2-deficient human cells (this study and (9)) and BRCA2-deficient hamster cells (27) has not been reported with BRCA1/2-deficient mouse cells. Although the

exact reason for this remains to be elucidated, differences between species or the assay systems employed can be mentioned. However, a likely explanation may be that unlike human BRCA1-deficient HCC1937 and BRCA2-deficient CAPAN-1 cells or hamster cells, which are null for BRCA1 and BRCA2 and grow in culture, equivalent mouse cells are not viable (5). The engineered mouse *BRCA1/2* mutant genes tested for recombination are clearly hypomorphs (partial loss of function), expressed at normal levels, and their protein products still localize normally to the nucleus where they interact and sequester RAD51, whereas in cells with a spontaneous hyper-recombination phenotype the *BRCA1/2* mutant alleles are either expressed at a very low level or the truncated protein products are sequestered in the cytoplasm (5).

The spontaneous hyper-recombination phenotype of BRCA1/2-deficient cells is also a defining feature of the human cancer predisposition diseases ataxia telangiectasia, Bloom's syndrome, and Fanconi's anemia with similar chromosomal abnormalities (7), although the underlying mechanisms may be different (see Discussion in ref. 9). Spontaneous hyper-recombination has the potential to trigger chromosomal instability and tumorigenesis in the presence of functional DNA damage response that would otherwise kill BRCA1/2-deficient tumour cells in the presence of unrepaired DSBs (2, 3). Whereas hyper-gene conversion would increase the loss of heterozygosity when acting between 2 heteroalleles or between a gene and a pseudogene (cited in refs (9) and (29)), increased SCRS/crossover events between misaligned sister chromatids would generate gross chromosomal rearrangements, such as deletions, duplications, and triplications of large DNA segments (Fig. 4). Such rearrangement events between repetitive DNA elements have been reported to occur at many chromosomal loci (7, 17), including *BRCA1* and *BRCA2* genes (40, 41). SCRS/crossover could also culminate in acentric and dicentric (quadriradial) chromosomes when involving inverted repeats or heterologous chromosomes. Quadriradial chromosomes are presumably unstable and can undergo breakage-fusion cycles, which, in DSB repair-deficient cells, would yield triradials and broken chromosomes. Chromosomal rearrangements could also lead to improper regulation of gene expression that could, in turn, result

in inactivation of tumour suppressor genes or activation of oncogenes. Thus, hyper-recombination would be expected to increase the load of such mutational events. This would allow incipient tumour cells with broken chromosomes to bypass the proliferation block, grow, and accumulate further chromosomal rearrangements by error-prone DSB pathways (Fig. 4).

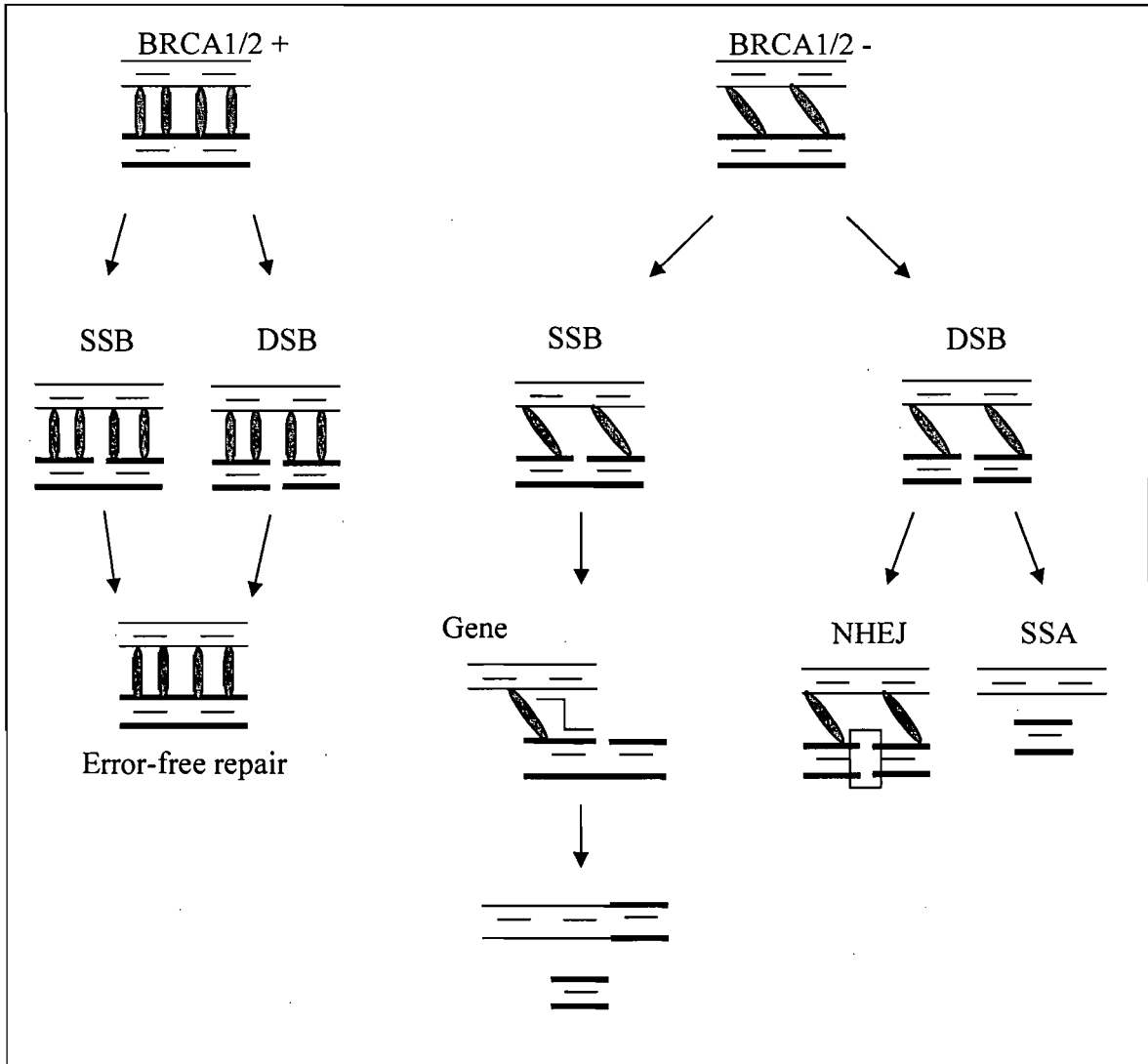


Figure 4. A model for BRCA1 and BRCA2 in genome stability maintenance. In normal cells, BRCA1 and BRCA2 keep the sister chromatids aligned and allow error-free repair of single-strand breaks (SSB) and DSBs (see text and ref. (9)). In BRCA1/2-deficient cells, loss of sister chromatid cohesion results in aberrant chromosome segregation (not shown), spontaneous hyper-recombination (gene conversion with or without crossover and SCRS), and DSB repair by error-prone pathways (NHEJ and SSA). These pathways can take place within a chromatid or inter-chromatid or between heterologous chromosomes (see text for more details).

That BRCA1 and BRCA2 suppress SCRS suggests a role for these 2 proteins in sister chromatid cohesion/alignment. Sister chromatid cohesion, established during the S and G₂ phases of the cell cycle, is also essential to HR repair of DSBs, chromosome segregation, cell division, survival and the maintenance of genome stability (42). How BRCA1 and BRCA2 function in sister chromatid cohesion/alignment remains to be elucidated, but these proteins may act as regulators rather than components of the cohesin complex; cohesin is not required for intra-chromosomal gene conversion or the resection of DSB ends (cited in (42)). BRCA1 may act together with ATM, ATR, MRN or H2AX (4) that have been reported to be also required for the recruitment of cohesin complex to sites of DNA damage (42). In addition, BRCA1 is required for the recruitment of activated ATM to sites of DNA damage, and for cohesin phosphorylation by ATM (43). Sister chromatids remain connected by cohesin until the transition from G₂ to M, and cohesin is dissociated from chromosomes in the prophase in a Polo-like kinase (PLK1)-promoted process (44). BRCA1 and BRCA2 both seem to be involved in G₂/M-cell cycle checkpoints (4), and PLK1, which has been implicated in the regulation of a number of mitotic events, including entry into mitosis, centrosome separation, metaphase to anaphase transition, and cytokinesis, binds and hyperphosphorylates BRCA2 during G₂/M, and BRCA1 regulates PLK1 (45-47). BRCA2 also associates with the spindle checkpoint kinase BUBR1 that monitors mitotic checkpoints and chromosome segregation events (48). Furthermore, previous work has shown that BRCA2-deficient cells exhibit dysfunction of the spindle assembly checkpoints (49) and aberrant cytokinesis (50). BRCA1- and BRCA2-deficient cells also undergo centrosome amplification and aneuploidy (2, 3). Although distinct mechanisms can be invoked for such abnormalities (51), a loss of or a decrease in sister chromatid cohesion might be the trigger.

In conclusion, our data support the idea that BRCA1 and BRCA2 act in concert to maintain chromosome structure and number intact. In this model, BRCA1 and BRCA2 maintain alignment of sister chromatids, ensure appropriate chromosome segregation, and regulate RAD51 recombination in response to the type of DNA damage (9). Given that BRCA1/2-deficient cells are impaired in DSB

repair, their spontaneous hyper-recombination phenotype cannot be induced by DSBs but rather is consistent with single-strand breaks (SSBs) as the initiating lesions (36). Because estrogen metabolites can adduct DNA and cause SSBs as well as genome instability (52), estrogen-induced hyper-recombination may underlie tissue specificity of the tumour suppressive properties of *BRCA1* and *BRCA2* and the increased risk of breast and ovarian cancers (53). Such a risk could be modulated by regimens that would decrease or block the genotoxic effects of estrogen metabolites (54).

Acknowledgments

Grant support: Canadian Breast Cancer Research Initiative #011376 (A. Belmaaza); Fonds de la recherche en santé du Québec scholarship (A. Belmaaza); Canderel fellowship (C. Abaji et al.); and Faculté des études supérieures, Université de Montréal (I. Cousineau).

We thank Drs. Barbara Weber (University of Pennsylvania Cancer Center, Philadelphia, PA) and Maria Jasin (Molecular Biology Program, Memorial Sloan-Kettering Institute, New York, NY) for generously providing us with the plasmids pCR3-*BRCA1* and p β actine-*SceI*, respectively. We also thank Dr. Richard Bertrand (Institut du Cancer de Montréal) for helpful discussion and Mr. Ovid Da Silva, Research Support Office, Research Centre, CHUM, for his editorial assistance.

References

1. **Nathanson, K. L., R. Wooster, B. L. Weber, and K. N. Nathanson.** 2001. Breast cancer genetics: what we know and what we need. *Nat Med* **7**:552-6.
2. **Scully, R., and D. M. Livingston.** 2000. In search of the tumour-suppressor functions of BRCA1 and BRCA2. *Nature* **408**:429-32.
3. **Venkitaraman, A. R.** 2002. Cancer susceptibility and the functions of BRCA1 and BRCA2. *Cell* **108**:171-82.
4. **Yoshida, K., and Y. Miki.** 2004. Role of BRCA1 and BRCA2 as regulators of DNA repair, transcription, and cell cycle in response to DNA damage. *Cancer Sci* **95**:866-71.
5. **Jasin, M.** 2002. Homologous repair of DNA damage and tumorigenesis: the BRCA connection. *Oncogene* **21**:8981-93.
6. **Lomonosov, M., S. Anand, M. Sangrithi, R. Davies, and A. R. Venkitaraman.** 2003. Stabilization of stalled DNA replication forks by the BRCA2 breast cancer susceptibility protein. *Genes Dev* **17**:3017-22.
7. **Meyn, M. S.** 1997. Chromosome instability syndromes: lessons for carcinogenesis. *Curr Top Microbiol Immunol* **221**:71-148.
8. **Venkitaraman, A. R.** 2004. Tracing the network connecting BRCA and Fanconi anaemia proteins. *Nat Rev Cancer* **4**:266-76.
9. **Abaji, C., I. Cousineau, and A. Belmaaza.** 2005. BRCA2 regulates homologous recombination in response to DNA damage: implications for genome stability and carcinogenesis. *Cancer Res* **65**:4117-25.
10. **Esashi, F., N. Christ, J. Gannon, Y. Liu, T. Hunt, M. Jasin, and S. C. West.** 2005. CDK-dependent phosphorylation of BRCA2 as a regulatory mechanism for recombinational repair. *Nature* **434**:598-604.
11. **West, S. C.** 2003. Molecular views of recombination proteins and their control. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**:435-45.
12. **Belmaaza, A., and P. Chartrand.** 1994. One-sided invasion events in homologous recombination at double-strand breaks. *Mutat Res* **314**:199-208.
13. **Paques, F., and J. E. Haber.** 1999. Multiple pathways of recombination induced by double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev* **63**:349-404.

14. **Belmaaza, A., E. Milot, J. F. Villemure, and P. Chartrand.** 1994. Interference of DNA sequence divergence with precise recombinational DNA repair in mammalian cells. *Embo J* **13**:5355-60.
15. **Villemure, J. F., A. Belmaaza, and P. Chartrand.** 1997. The processing of DNA ends at double-strand breaks during homologous recombination: different roles for the two ends. *Mol Gen Genet* **256**:533-8.
16. **Johnson, R. D., and M. Jasin.** 2000. Sister chromatid gene conversion is a prominent double-strand break repair pathway in mammalian cells. *Embo J* **19**:3398-407.
17. **Kolomietz, E., M. S. Meyn, A. Pandita, and J. A. Squire.** 2002. The role of Alu repeat clusters as mediators of recurrent chromosomal aberrations in tumors. *Genes Chromosomes Cancer* **35**:97-112.
18. **Chen, J., D. P. Silver, D. Walpita, S. B. Cantor, A. F. Gazdar, G. Tomlinson, F. J. Couch, B. L. Weber, T. Ashley, D. M. Livingston, and R. Scully.** 1998. Stable interaction between the products of the BRCA1 and BRCA2 tumor suppressor genes in mitotic and meiotic cells. *Mol Cell* **2**:317-28.
19. **Zhong, Q., C. F. Chen, S. Li, Y. Chen, C. C. Wang, J. Xiao, P. L. Chen, Z. D. Sharp, and W. H. Lee.** 1999. Association of BRCA1 with the hRad50-hMre11-p95 complex and the DNA damage response. *Science* **285**:747-50.
20. **pWang, Y., D. Cortez, P. Yazdi, N. Neff, S. J. Elledge, and J. Qin.** 2000. BASC, a super complex of BRCA1-associated proteins involved in the recognition and repair of aberrant DNA structures. *Genes Dev* **14**:927-39.
21. **Wu, X., J. H. Petrini, W. F. Heine, D. T. Weaver, D. M. Livingston, and J. Chen.** 2000. Independence of R/M/N focus formation and the presence of intact BRCA1. *Science* **289**:11.
22. **Paull, T. T., D. Cortez, B. Bowers, S. J. Elledge, and M. Gellert.** 2001. Direct DNA binding by Brca1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**:6086-91.
23. **Zheng, L., S. Li, T. G. Boyer, and W. H. Lee.** 2000. Lessons learned from BRCA1 and BRCA2. *Oncogene* **19**:6159-75.
24. **Moynahan, M. E., T. Y. Cui, and M. Jasin.** 2001. Homology-directed dna repair, mitomycin-c resistance, and chromosome stability is restored with correction of a Brca1 mutation. *Cancer Res* **61**:4842-50.

25. **Zhang, J., H. Willers, Z. Feng, J. C. Ghosh, S. Kim, D. T. Weaver, J. H. Chung, S. N. Powell, and F. Xia.** 2004. Chk2 phosphorylation of BRCA1 regulates DNA double-strand break repair. *Mol Cell Biol* **24**:708-18.
26. **Zhong, Q., C. F. Chen, P. L. Chen, and W. H. Lee.** 2002. BRCA1 facilitates microhomology-mediated end joining of DNA double strand breaks. *J Biol Chem* **277**:28641-7.
27. **Larminat, F., M. Germanier, E. Papouli, and M. Defais.** 2002. Deficiency in BRCA2 leads to increase in non-conservative homologous recombination. *Oncogene* **21**:5188-92.
28. **Tutt, A., D. Bertwistle, J. Valentine, A. Gabriel, S. Swift, G. Ross, C. Griffin, J. Thacker, and A. Ashworth.** 2001. Mutation in Brca2 stimulates error-prone homology-directed repair of DNA double-strand breaks occurring between repeated sequences. *Embo J* **20**:4704-16.
29. **Lemelin, J. F., C. Abaji, I. Cousineau, and A. Belmaaza.** 2005. Disruption of p53 by the viral oncoprotein HPV16-E6 does not deregulate chromosomal homologous recombination in a transcriptional interference-free assay system. *Cell Cycle* **4**:831-7.
30. **Villemure, J. F., N. Savard, and A. Belmaaza.** 2001. 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**:963-74.
31. **Somasundaram, K., H. Zhang, Y. X. Zeng, Y. Houvras, Y. Peng, G. S. Wu, J. D. Licht, B. L. Weber, and W. S. El-Deiry.** 1997. Arrest of the cell cycle by the tumour-suppressor BRCA1 requires the CDK-inhibitor p21WAF1/CiP1. *Nature* **389**:187-90.
32. **Villemure, J. F., C. Abaji, I. Cousineau, and A. Belmaaza.** 2003. MSH2-deficient human cells exhibit a defect in the accurate termination of homology-directed repair of DNA double-strand breaks. *Cancer Res* **63**:3334-9.
33. **Abbott, D. W., M. E. Thompson, C. Robinson-Benion, G. Tomlinson, R. A. Jensen, and J. T. Holt.** 1999. BRCA1 expression restores radiation resistance in BRCA1-defective cancer cells through enhancement of transcription-coupled DNA repair. *J Biol Chem* **274**:18808-12.
34. **Scully, R., S. Ganesan, K. Vlasakova, J. Chen, M. Socolovsky, and D. M. Livingston.** 1999. Genetic analysis of BRCA1 function in a defined tumor cell line. *Mol Cell* **4**:1093-9.
35. **Wu, L., and I. D. Hickson.** 2003. The Bloom's syndrome helicase suppresses crossing over during homologous recombination. *Nature* **426**:870-4.

36. **Smith, G. R.** 2004. How homologous recombination is initiated: unexpected evidence for single-strand nicks from v(dj) site-specific recombination. *Cell* **117**:146-8.
37. **Allers, T., and M. Lichten.** 2001. Differential timing and control of noncrossover and crossover recombination during meiosis. *Cell* **106**:47-57.
38. **Xu, X., O. Aprelikova, P. Moens, C. X. Deng, and P. A. Furth.** 2003. Impaired meiotic DNA-damage repair and lack of crossing-over during spermatogenesis in BRCA1 full-length isoform deficient mice. *Development* **130**:2001-12.
39. **Moynahan, M. E., J. W. Chiu, B. H. Koller, and M. Jasin.** 1999. Brca1 controls homology-directed DNA repair. *Mol Cell* **4**:511-8.
40. **Mazoyer, S.** 2005. Genomic rearrangements in the BRCA1 and BRCA2 genes. *Hum Mutat* **25**:415-22.
41. **Welsh, P. L., and M. C. King.** 2001. BRCA1 and BRCA2 and the genetics of breast and ovarian cancer. *Hum Mol Genet* **10**:705-13.
42. **Hirano, T.** 2005. Cell biology: holding sisters for repair. *Nature* **433**:467-8.
43. **Kitagawa, R., and M. B. Kastan.** 2005. The ATM-dependent DNA damage signaling pathway. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **70**:99-109.
44. **Sumara, I., E. Vorlaufer, P. T. Stukenberg, O. Kelm, N. Redemann, E. A. Nigg, and J. M. Peters.** 2002. The dissociation of cohesin from chromosomes in prophase is regulated by Polo-like kinase. *Mol Cell* **9**:515-25.
45. **Lin, H. R., N. S. Ting, J. Qin, and W. H. Lee.** 2003. M phase-specific phosphorylation of BRCA2 by Polo-like kinase 1 correlates with the dissociation of the BRCA2-P/CAF complex. *J Biol Chem* **278**:35979-87.
46. **Lee, M., M. J. Daniels, and A. R. Venkitaraman.** 2004. Phosphorylation of BRCA2 by the Polo-like kinase Plk1 is regulated by DNA damage and mitotic progression. *Oncogene* **23**:865-72.
47. **Ree, A. H., A. Bratland, R. V. Nome, T. Stokke, and O. Fodstad.** 2003. Repression of mRNA for the PLK cell cycle gene after DNA damage requires BRCA1. *Oncogene* **22**:8952-5.
48. **Futamura, M., H. Arakawa, K. Matsuda, T. Katagiri, S. Saji, Y. Miki, and Y. Nakamura.** 2000. Potential role of BRCA2 in a mitotic checkpoint after phosphorylation by hBUBR1. *Cancer Res* **60**:1531-5.

49. **Lee, H., A. H. Trainer, L. S. Friedman, F. C. Thistlethwaite, M. J. Evans, B. A. Ponder, and A. R. Venkitaraman.** 1999. Mitotic checkpoint inactivation fosters transformation in cells lacking the breast cancer susceptibility gene, *Brca2*. *Mol Cell* **4**:1-10.
50. **Daniels, M. J., Y. Wang, M. Lee, and A. R. Venkitaraman.** 2004. Abnormal cytokinesis in cells deficient in the breast cancer susceptibility protein *BRCA2*. *Science* **306**:876-9.
51. **Rudkin, T. M., and W. D. Foulkes.** 2005. *BRCA2*: breaks, mistakes and failed separations. *Trends Mol Med* **11**:145-8.
52. **Liehr, J. G.** 2000. Is estradiol a genotoxic mutagenic carcinogen? *Endocr Rev* **21**:40-54.
53. **Hilakivi-Clarke, L.** 2000. Estrogens, *BRCA1*, and breast cancer. *Cancer Res* **60**:4993-5001.
54. **Kotsopoulos, J., and S. A. Narod.** 2005. Brief Report: Towards a dietary prevention of hereditary breast cancer. *Cancer Causes Control* **16**:125-138.

Chapitre 4.

BRCA1 Haploinsufficiency, but not Heterozygosity for a BRCA1-truncating Mutation, Deregulates Homologous Recombination

Isabelle Cousineau, and Abdellah Belmaaza

Centre de recherche, Centre hospitalier de l'Université de Montréal, Hôpital Notre-Dame et Institut du cancer de Montréal, Montréal, Québec, Canada

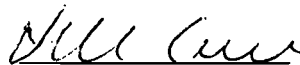
Running title: *BRCA1* haploinsufficiency deregulates recombination

Key words. BRCA1-BRCA2-DNA damage response-DNA repair-RAD51-Sister chromatid recombination-breast/ovarian cancer-genome instability.

Article publié dans:

Cell Cycle, vol 6(8) : 962-971, 2007

*Isabelle Cousineau est responsable de 100% de la réalisation des travaux de recherche de cet article. Abdellah Belmaaza a supervisé l'ensemble de l'étude et rédigé le manuscrit.



Isabelle Cousineau



Abdellah Belmaaza

Résumé

Les porteurs hétérozygotes d'une mutation de *BRCA1* ont un haut risque de perdre l'allèle sauvage restant et de développer un cancer du sein et/ou de l'ovaire, mais les voies moléculaires impliquées restent à déterminer. Il est couramment pensé que le statut d'hétérozygote (réduction d'expression de la protéine BRCA1 sauvage [haploinsuffisance] et/ou présence d'une protéine BRCA1 mutante) peut affecter les fonctions de BRCA1 et augmenter le risque d'apparition de mutations favorisant la carcinogenèse. BRCA1 maintient la stabilité du génome grâce, entre autre, à son rôle dans la régulation de la recombinaison homologue en fonction du type de dommage à l'ADN. Pour investiguer si la fonction de BRCA1 est affectée par le statut hétérozygote, nous avons employé une lignée cellulaire rapporteuse de cancer du sein humain, les MCF-7, connues pour avoir un seul allèle de *BRCA1* et une réduction d'expression au niveau protéique. Ces cellules nous ont révélées: 1) un phénotype d'hyper-recombinaison spontanée; 2) une réduction d'efficacité de la réparation des cassures double brin d'ADN par recombinaison homologue et 3) une hyper-sensibilité à la mitomycine C, un agent chimiothérapeutique induisant des cassures double brin. La correction du niveau d'expression de BRCA1 sauvage renverse tous ces phénotypes alors que l'expression à un niveau physiologique d'un *BRCA1 5382insC* mutant, retrouvé dans plusieurs cancers héréditaires, n'a aucun effet. Ces résultats impliquent le domaine C-terminal de BRCA1 dans le contrôle de la recombinaison homologue et indiquent que l'haploinsuffisance de BRCA1 seule, qui est aussi retrouvée dans les cancers sporadiques du sein et de l'ovaire, est suffisante pour compromettre la stabilité du génome en entraînant des événements de recombinaison homologue spontanée, qui pourraient être responsables de la perte de l'allèle de BRCA1 sauvage restant, et augmenter les risques de carcinogenèse. Nos observations pourraient également avoir des implications dans la prévention du cancer et dans la gestion médicale des patients atteints.

Abstract

Humans heterozygous for *BRCA1* mutations have a high risk of losing the remaining wild-type *BRCA1* allele and developing breast/ovarian cancer, but a molecular basis for this has not yet been determined. It is thought that heterozygosity status — reduced wild-type BRCA1 protein dosage (haploinsufficiency) and/or the presence of a mutant BRCA1 protein — may affect BRCA1 functions and heighten the risk of cancer promoting mutations. BRCA1 maintains genome stability, at least in part, by regulating homologous recombination according to the type of DNA damage. To investigate whether this BRCA1 function is affected by heterozygosity status, we employed, as recombination reporters, human breast cancer MCF-7 cells known to have a single wild-type *BRCA1* allele and reduced BRCA1 protein dosage. These cells revealed: 1) a spontaneous hyper-recombination phenotype; 2) reduced efficiency in homologous recombination repair of DNA double-strand breaks (DSBs); and 3) sensitivity to the DSB-inducing chemotherapeutic agent mitomycin C. Correction of BRCA1 protein dosage to the wild-type level reversed all these phenotypes, whereas physiological expression of the cancer-eliciting *BRCA1 5382insC* mutant allele had no effect on either phenotype. These findings implicate BRCA1 C-terminal domain in recombination control, and indicate that BRCA1 haploinsufficiency alone, which is also a feature of sporadic breast/ovarian cancer, is sufficient to compromise genome stability by triggering spontaneous recombination events that are likely to account for the loss of the remaining wild-type *BRCA1* allele and increased cancer risk. Our observations may also have implications for the medical management of cancer patients and cancer prevention.

Introduction

Inheritance of a loss-of-function mutation in one allele of either breast cancer susceptibility *BRCA1* or *BRCA2* gene predisposes humans to breast, ovarian, and other cancers (1). Tumors derived from predisposed individuals show loss of heterozygosity for the wild-type *BRCA1* or *BRCA2* allele with retention of the inherited, cancer-eliciting, mutant allele. Thus, *BRCA1* and *BRCA2* genes behave as classical tumor suppressor genes, in which loss of function of both alleles is required for tumorigenesis. *BRCA1* and *BRCA2* genes are housekeeping genes that are maximally expressed in S-phase cells of all tissues, encoding large, unrelated nuclear proteins that maintain genome stability, by acting as regulators of DNA repair, transcription, and the cell cycle in response to DNA damage (2). However, the exact role of *BRCA1* and *BRCA2* in these processes is still unclear, and mechanisms underlying the tissue specificity of their tumor-suppressive property remain speculative.

Common to *BRCA1* and *BRCA2* as genome caretakers is the regulation of mitotic sister chromatid recombination (SCR), an homologous recombination (HR) process in which a chromatid that suffers a double-strand break (DSB) during the DNA-replication (S) phase of cell division uses neighboring, undamaged sister chromatid as a template for repair (3, 4). Recent findings (5) indicate that when a DSB is induced in one of the sister chromatids, the DNA damage response kinases ATM and ATR are activated, the DSB repair protein MRE11 binds to the damaged site, and histone H2AX is phosphorylated in a large chromosomal region surrounding that site. H2AX phosphorylation allows the *de novo* loading of more cohesin, a process that also requires MRE11. The consequent chromatin remodelling and enhanced cohesion/alignment between the damaged and undamaged DNA strands allows the DNA strand exchange protein, RAD51, to initiate error-free repair of the DSB. The accurate termination of repair ensures DNA replication fork progression, cell survival and the preservation of both chromosome structure and number.

Evidence of a role for *BRCA1* and *BRCA2* in SCR derives from the observations that *BRCA1/2*-deficient mouse or human tumor cells sustain

spontaneous “chromatid-type” aberrations during division: chromatid breaks, triradial and quadriradial chromosomes as well as chromosome loss (aneuploidy), translocations, deletions, duplications, amplifications, and inversions (4). These abnormalities are markers of aberrant mitotic S-phase recombination that are typical of the human cancer predisposition diseases ataxia telangiectasia, Bloom’s syndrome, and Fanconi’s anemia, mutated in *ATM*, *BLM*, and *FANC* genes, respectively (6). In addition, stalled DNA replication forks have been shown to collapse into DSBs in *BRCA2*-deficient cells (7). Moreover, BRCA1 and BRCA2 not only relocate with ATM, ATR, MRE11, H2AX, BLM, FANC, and RAD51 to sites of DNA damage and stalled replication forks, but also form distinct complexes with these proteins (3, 8).

How exactly BRCA1 and BRCA2 regulates SCR has yet to be elucidated. However, accumulating evidence indicates that BRCA1 and BRCA2 act in concert. On the one hand, both suppress spontaneous SCR slippage (SCRS), suggesting a role in sister chromatid cohesion/alignment (9, 10). Consistent with this role: 1) both BRCA1 and BRCA2 interact with histone modifying enzymes and chromatin remodelling factors and have the ability to remodel chromatin structure (2); 2) BRCA1, which can physically interact with BRCA2, binds ATM and ATR, and in response to DNA damage, activated ATM and ATR phosphorylate BRCA1; 3) BRCA1 is required for the recruitment of activated ATM to sites of DNA damage and cohesin phosphorylation by ATM (11); and 4) BRCA1 has been implicated in the phosphorylation and mono-ubiquitylation of H2AX as well as it interacts with and regulates MRE11 activity (2, 12). On the other hand, BRCA1 and BRCA2 interact with and regulate RAD51 localization and function according to the type of DNA damage (8-10). In response to induced DSBs, both BRCA1 and BRCA2 activate RAD51, but down-regulate its activity in the absence of such damage. Accordingly, *BRCA1*- and *BRCA2*-deficient cells exhibit two distinct recombination phenotypes: i) a deficiency in error-free, HR repair of chromosomal DSBs, and, consequently, hypersensitivity to the DNA inter-strand cross-linking agents mitomycin C (MMC) and cisplatin that induce DSBs at DNA replication forks (13-16); and ii) a spontaneous hyper-recombination phenotype, characterized

by increased frequency and rate of RAD51-mediated recombination events (9, 10). Such a phenotype is also a defining feature of *ATM*-, *BLM*-, and *FANC*-deficient cells (6).

DSB repair deficiency often leads to cell death by activating cell cycle checkpoint/apoptotic genes, raising the question of how *BRCA1/2*-deficient cells escape apoptosis, undergo genome instability, and form tumors (3, 4). Spontaneous hyper-recombination may be the answer as it has the potential to trigger genome instability even in the presence of cell cycle checkpoint/apoptotic genes. This may allow *BRCA1/2*-incipient tumor cells to accumulate cancer-promoting mutations and grow despite the deficiency. Given that hyper-recombination cannot be induced by DSBs in *BRCA1/2*-deficient cells, it has been thought that BRCA1 and BRCA2 down-regulate this process at single-strand breaks (SSBs) that can be induced by estrogen metabolites, providing an explanation to the tissue specificity of tumor-suppressive property of both BRCA1 and BRCA2 (9, 10). Deregulation of recombination control may also account for increased loss of the wild-type *BRCA1/2* allele and cancer risk in carriers of *BRCA1/2* mutations (17, 18). Whether, however, recombination is deregulated while still heterozygous or only after the loss of both functional alleles is not yet known. If the loss of *BRCA1/2* heterozygosity does not occur stochastically, two mechanisms may generate such a “mutator phenotype” after mutation of a single *BRCA1* or *BRCA2* allele: haploinsufficiency, reduction in gene dosage and/or dominant negative mutations (19). Several studies with lymphocytes and dermal fibroblasts from carriers of *BRCA1/2* mutations have claimed and/or dismissed the existence of phenotypes associated with *BRCA1/2* haploinsufficiency (reviewed in(19, 20)), whereas others have raised the possibility that inherited *BRCA1/2* mutations may actively promote tumorigenesis by blocking the function of the remaining wild-type *BRCA1/2* allele (21-26). However, unlike hereditary, sporadic breast and ovarian cancer often shows either reduced or absent *BRCA1/2* expression, but very rarely, if not at all, *BRCA1/2* mutations. In such cases, reduced or absent *BRCA1/2* expression has been associated with DNA methylation and *BRCA1* or *BRCA2* allele deletion ((17, 27) and references therein). These observations raise the idea that *BRCA1/2*

haploinsufficiency alone may increase the risk of cancer promoting mutations in both wild-type individuals and carriers of *BRCA1/2* mutations.

Which aspect of *BRCA1/2* heterozygosity may affect BRCA1/2 functions has been difficult to investigate. The use of mouse models may not be informative in this case, since, unlike humans, mice heterozygous for *BRCA1* and *BRCA2* mutations are not spontaneously more cancer-prone than wild-type animals. In addition, mouse cells heterozygous for *BRCA1* and *BRCA2* mutations have the same DNA repair ability and chemo- and radio-sensitivity as wild-type cells (19). Moreover, *BRCA1*- and *BRCA2*-deficient mouse cells do not exhibit hyper-recombination, as do *BRCA1*- and *BRCA2*-deficient human cells (9, 10). It would also be difficult to design interfering RNAs so as to specifically discriminate the wild-type from the mutant *BRCA1/2* gene transcripts in human cells with *BRCA1/2* mutations.

To directly examine which aspect of *BRCA1* heterozygosity may affect recombination control, we employed, as recombination reporters, human breast cancer MCF-7 cells known to have a single wild-type *BRCA1* allele. We found that: 1) reduced BRCA1 protein dosage impaired HR control; 2) the cancer-eliciting *BRCA15382insC* mutant allele, which encodes a BRCA1 protein truncated at the C-terminal (BRCT) domain, did not act as dominant negative nor did it gain a new function in recombination; and 3) the BRCT domain, which interacts with BRCA2, is essential for the regulation of recombination according to the type of DNA damage. These findings together with others (see Discussion) indicate that BRCA1/2 haploinsufficiency alone can compromise genome stability and increase the risk of cancer promoting mutations.

Materials and Methods

Cell lines, DNA manipulations and transfections. The human breast cancer cell lines, MCF-7 and HCC1937, employed as recombination reporters, have been described previously (28). Briefly, the recombination assay system used measures all HR pathways in the absence of transcriptional interference between the Hygromycin drug-resistance marker gene (*Hyg*) and the Puromycin drug-resistance reporter gene (*Puro*). These cell lines were transfected with pCR3-based expression vectors containing or not the wild-type *BRCA1* or mutant *BRCA1* 5382*insC* allele. Forty-eight hours later, the transfected cells were cultured in medium containing neomycin (G418) (450 µg/mL for HCC1937 and 600µg/mL for MCF-7). Independent, G418-resistant (G418^R) cell clones were picked and amplified individually for subsequent analyses.

Polymerase Chain Reaction (PCR). Integration of *BRCA1*-expressing vectors was determined by PCR with 400 ng of genomic DNA extracted from individual cell clones. The primer pair pCR3-F (5'-cgactcactataggag-3') and BRCA1R (5'-aggggacgctcttgat-3') specifically amplifies the 1,530 bp fragment from the exogenous wild-type *BRCA1* or mutant *BRCA1* gene but not the endogenous *BRCA1* gene.

Reverse transcription-PCR (RT-PCR). Cell clones with stable *BRCA1* gene integration were expanded and subjected to RT-PCR. RNA from individual cell clones was extracted and transcribed to cDNA (9, 10). The same primer pair described for PCR was employed to specifically amplify cDNA of exogenous wild-type *BRCA1* or mutant *BRCA1* only. In addition, the primer pair 18SF (5'-tgaggccatgattaagaggg-3') and 18SR (5'-cgctgagccagttcagtag-3') that amplifies the 642 bp fragment of 18S ribosomal RNA served as a control. PCR amplifications were undertaken as described previously (9, 10).

Protein manipulations. Proteins were extracted and quantified (9, 10). 50 μ g of protein extract were separated on 7.5% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel, transferred to a nitrocellulose membrane (Amersham, Piscataway, NJ), and probed with mouse antibody directed against the BRCA1 N-terminus (MS110, Calbiochem, La Jolla, CA) that recognizes both wild-type and truncated BRCA1 proteins. To control equal loading, the Western blots were reprobed with β -actin antibody (NeoMarkers, Fremont, CA).

Recombination rate. The recombination rate was quantified from independent experiments (9, 10, 28). Briefly, in each experiment, 10 to 12 independent cultures (1 to 100 cells) of each cell line were plated in parallel and cultured to confluence. The cells were trypsinized, counted, and a portion taken for plating efficiency estimation. HCC1937 (5×10^6) and MCF-7 (5×10^5) were plated 24 h before adding Puromycin (Puro) at 0.5 or 1.0 μ g/ml, respectively. Because HR involving direct repeats can delete the intervening *Hyg* gene during culture, direct repeat-cell lines were maintained without the drug Hygromycin (Hyg) before selection with Puro. The frequency of HR was determined as being equal to the number of Puro-resistant (Puro^R) colonies divided by the number of plated cells. The rate was calculated from these frequencies by a fluctuation test.

For I-*SceI*-induced experiments, the vectors p β actine-*SceI* and pFRED25 expressing the meganuclease I-*SceI* and green fluorescent protein (GFP), respectively, were co-transfected into 2 to 7 $\times 10^5$ cells (9, 10). In parallel experiments, the same number of cells was transfected with pFRED25 and pMC1neo, the latter to correct for DNA content as a control for I-*SceI* efficiency (spontaneous recombination). GFP-expressing cells were counted 48 h after transfection to examine transfection efficiency and normalize recombination frequencies. Puro selection was performed 10 days after transfection. The frequency of spontaneous or I-*SceI*-induced recombination was determined as being equal to the number of Puro^R colonies divided by the number of GFP-expressing cells (9, 10).

Analysis of Puro^R colonies. Genomic DNA from individual Puro^R cell clones was extracted, and 400 ng subjected to PCR (9, 10, 28). The primer pair employed in PCR, Hyg4419 (5'-gctgtgtagaagtactcgccg-3') and pUC469 (5'-tgaccatgattacgccaagct-3'), amplified the 2,324 bp gene conversion fragment, whereas pUC315 (5'-aaaggggatgtgctgcaaggcga-3') and pUC469 amplified the 1,863 bp deletion fragment.

MMC survival assay. For each cell clone, 100 cells were seeded in triplicate in 24-well plates and exposed 24 h later to various concentrations of MMC (Sigma, St. Louis, MO). Four hours later, MMC was removed, and the cells were rinsed 3 times with phosphate-buffered saline and allowed to grow undisturbed for 10 to 12 days. The surviving colonies were stained with crystal violet solution (Sigma) and counted. This experiment was carried out three times for each cell clone.

Statistical analysis. HR frequencies were analysed using the two-tail, unpaired, Student t test when comparing a single parental clone with its BRCA1-expressing derivative, and the one-way ANOVA test when comparing a parental clone with 2 or more BRCA1-expressing derivative clones. For the analysis of recombination pathways, the 2x2 contingency table was used and analysed with two-tail Fisher's exact test.

Results

BRCA1 haploinsufficiency confers a spontaneous hyper-recombination phenotype. To directly examine whether reduced wild-type BRCA1 protein dosage affects recombination control or not, we first established the frequency and rate of spontaneous HR (i.e., without treatment of cells with exogenous DNA-damaging agents) in MCF-7 reporter cell lines before and after correction of BRCA1 protein dosage. MCF-7 is a well-characterized human breast cancer cell line with a single wild-type *BRCA1* allele (*BRCA1*^{+/-}) and reduced mRNA and protein levels (29-31). To correct BRCA1 dosage, we transfected MCF-7 recombination reporter cell lines with pCR3-*BRCA1* or pCR3, a G418^R-borne vector encoding or not the wild-type BRCA1 protein. Independent G418^R cell clones were amplified in parallel and subjected to analysis for pCR3-*BRCA1* genomic integration and its expression at both mRNA and protein levels (Fig. 1A and B). G418^R, MCF-7 cell clones with BRCA1 protein dosage similar to that of HeLa cells, which have normal *BRCA1* expression because of 2 wild-type alleles (31), manifested no major changes in growth rate or plating efficiency relative to MCF-7 parental cell clones transfected with empty vector (data not shown).

The MCF-7 recombination reporter cell lines carry, in their genome, either direct (dA8) or inverted (iA12) repeats of 2 inactive *Puro*, separated by the *Hyg* (Fig. 2)(28). Whereas the promoterless wild-type *Puro* gene contained a gene inactivating 5' deletion, deleting *EagI* and *BssHII* restriction sites and inserting 1 *I-SceI* cleavage site inactivated the full-length *Puro* gene. Spontaneous HR between the 2 *Puro* genes would reconstitute a functional *Puro* gene through loss of *I-SceI* and gain of wild-type *EagI/BssHII* sites, restoring resistance to *Puro* in a colony assay. The direct repeat MCF-7 cell line measures a mixture of RAD51-mediated recombination (gene conversion associated or not with crossover) and RAD51-independent SCRS, whereas the inverted repeat MCF-7 cell line reports RAD51-mediated recombination only (9, 10, 28)(Fig. 2). In either cell line, correction of BRCA1 protein dosage to the wild-type level decreased the frequency of spontaneous recombination by 6- to 8-fold, and the rate (events/cell/generation) by

2- to 4-fold (Table I), indicating that reduced BRCA1 protein dosage confers a hyper-recombination phenotype.

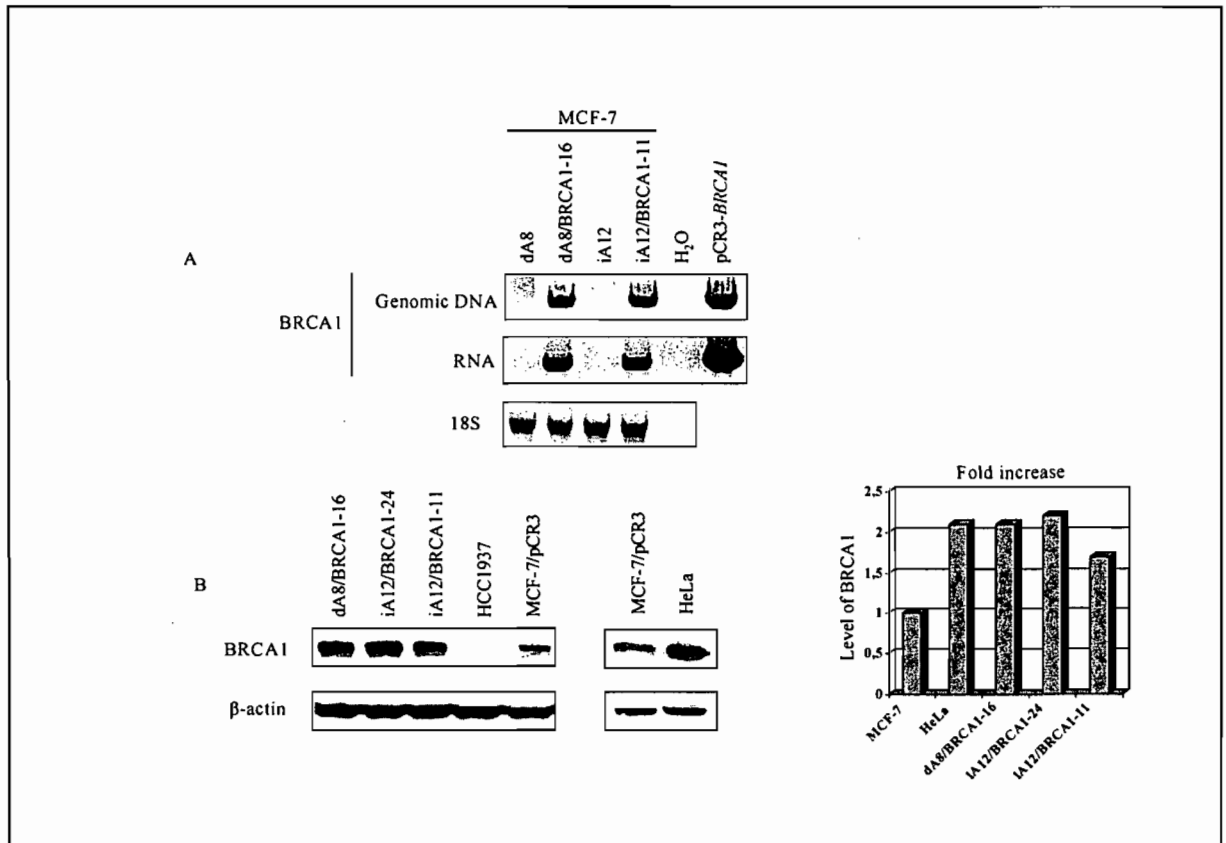


Figure 1. Stable expression of wild-type *BRCA1* in MCF-7 recombination reporter cell lines. A) Genomic DNA and RNA analysis. The MCF-7 cell lines dA8 and iA12 that have integrated the *BRCA1* transgene (dA8/BRCA1-16 and iA12/BRCA1-11) were identified by PCR, using a primer pair that amplifies the *BRCA1* transgene only. Water and pCR3-*BRCA1* vector DNA served as negative and positive controls, respectively. *BRCA1* transgene RNA was demonstrated by qualitative RT-PCR, using the same primer pair. PCR without RT and pCR3-*BRCA1* vector DNA served as negative and positive controls, respectively, whereas 18S rRNA controlled RT reactions. B) Western blot analysis of BRCA1 protein. MCF-7 cell clones containing the *BRCA1* transgene express BRCA1 at a level similar to that of HeLa cells and higher than that of the MCF-7 parental clones transfected with the empty vector. However, MCF-7 parental clones express wild-type BRCA1 protein at a level higher than that of BRCA1-deficient HCC1937 cells (not visible because of low exposure time) that contain a single mutant *BRCA1* allele, which is very weakly expressed. Fold increases in protein expression level were calculated from the band intensity (measured with AlphaImager 2000) of parental MCF-7 clones relative to BRCA1-expressing derivatives and normalized with band intensity of the loading control β -actin. Fold increase was found to be the same in two independent experiments.

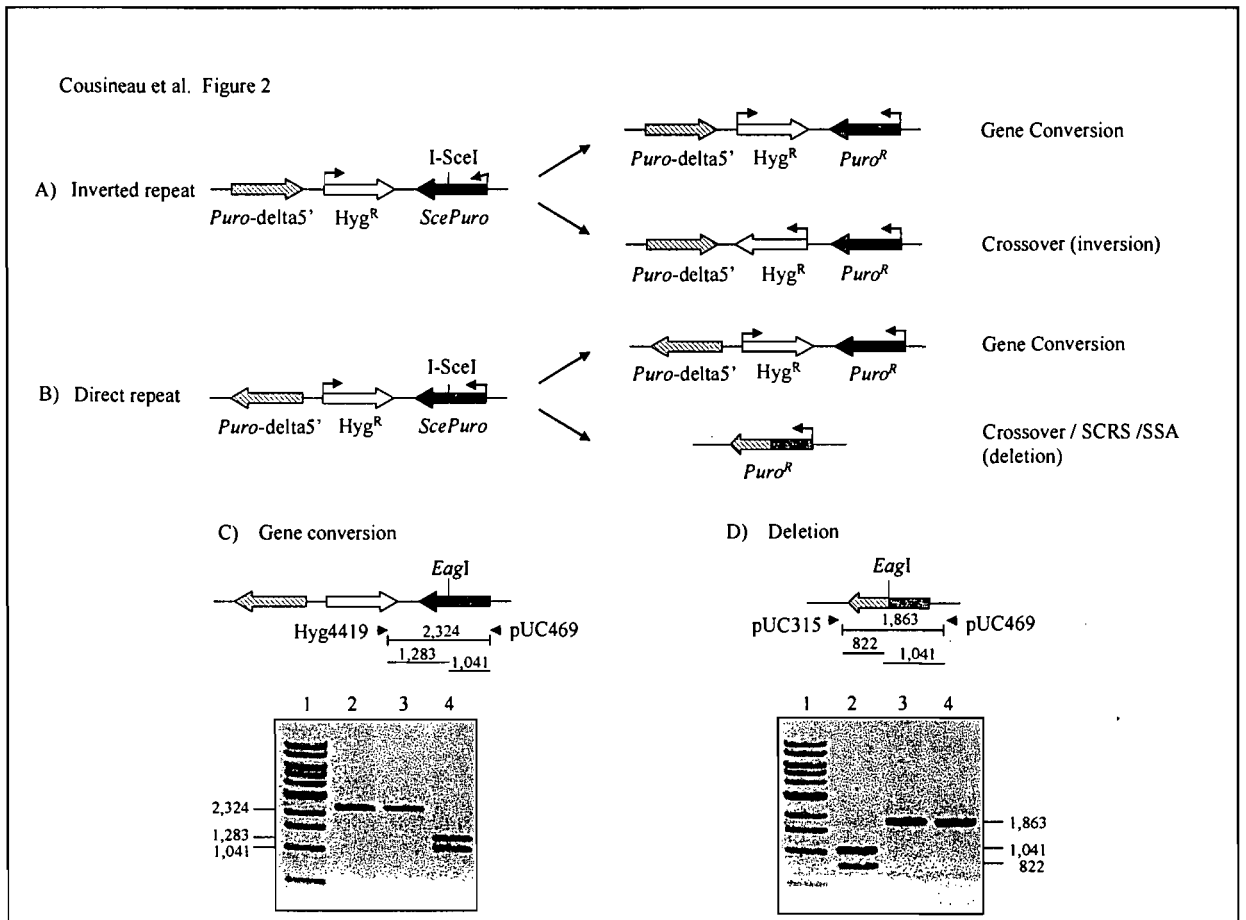


Figure 2. Homologous recombination (HR) between direct and inverted repeats. An HR event between the 2 *Puro* cassettes removes the *I-SceI* insertion and restores a functional *ScePuro* gene and resistance to *Puro* (*Puro^R*). A) The inverted repeat substrate monitors RAD51-dependent gene conversion and crossover (inversion) events. B) The direct repeat substrate also monitors RAD51-dependent gene conversion and crossover (deletion) in addition to RAD51-independent deletion by SCRS or single-strand annealing (SSA). C) A gene conversion event. PCR on *Puro^R* colonies with the primer pair *Hyg4419*/*pUC469* amplifies a fragment of 2,324 bp (lane 2), which is resistant to *I-SceI* cleavage (lane 3) but can be cut by *EagI* (lane 4). D) A deletion event. The primer pair *pUC315*/*pUC469* amplifies a fragment of 1,863 bp (lane 4), which is resistant to *I-SceI* cleavage (lane 3) but can be cut by *EagI* (lane 2). Lane 1 represents a 1-kbp ladder.

Table I. Reduced BRCA1 level increases spontaneous homologous recombination (HR) but reduces I-SceI-induced HR

Cell lines	Spontaneous recombination			I-SceI-induced		
	Frequency ^a	Ratio ^b	Rate ^c	Ratio ^b	Fold induction ^d	Ratio ^e
<u>Inverted repeat</u>						
iA12	$1.94 \pm 0.9 \times 10^{-3}$	1.0	$3.83 \pm 1.21 \times 10^{-4}$	1.0	2.82 ± 0.5	1.00
iA12/BRCA1-11	$3.07 \pm 1.6 \times 10^{-4}$	6.3	$9.58 \pm 2.09 \times 10^{-5}$	4.0	7.03 ± 0.7	2.49
iA12/BRCA1-24	$2.35 \pm 0.5 \times 10^{-4}$	8.3	$9.22 \pm 2.72 \times 10^{-5}$	4.2	17.29 ± 5.1	6.13
<u>Direct repeat</u>						
dA8	$1.71 \pm 0.4 \times 10^{-4}$	1.0	$7.77 \pm 1.35 \times 10^{-6}$	1.0	39.30 ± 6.4	1.00
dA8/BRCA1-16	$2.96 \pm 1.4 \times 10^{-5}$	5.8	$3.08 \pm 0.86 \times 10^{-6}$	2.5	197.08 ± 44.6	5.01

HR frequency or rate of parental clones was arbitrarily set at 1.0.

^a Frequency, representing the mean of 3 or more independent experiments for each cell line, was determined as the number of Puro^R cell clones relative to the total number of viable cells plated 24 h before selection. Parent and BRCA1-expressing derivative cell lines were plated in parallel.

^b Ratio (parent/BRCA1-expressing derivative cell lines) indicates recombination fold decreases in BRCA1-expressing cells relative to their parents ($p < 0.01$).

^c Rate represents the number of recombination events per cell per generation.

^d Fold induction was calculated as the number of Puro^R colonies transfected with I-SceI relative to the number of Puro^R colonies transfected with the control vector. This represents the mean of 3 independent experiments performed in parallel for each cell line and corrected for transfection efficiency with GFP transfection.

^e Ratio (BRCA1-expressing derivative cell lines/parent) indicates recombination fold increases in BRCA1-expressing cells relative to their parents ($p < 0.0001$).

BRCA1 haploinsufficiency reduces the efficiency of HR repair of chromosomal DSBs. To examine whether reduced wild-type BRCA1 protein dosage also affects chromosomal DSB repair, the MCF-7 parental cell lines and their *BRCA1*^{+/-} derivatives were transiently co-transfected in parallel with the pβactine-*SceI* vector, which expresses the meganuclease I-*SceI*, and a GFP-expressing vector employed to evaluate transfection efficiency. When the I-*SceI* site in the full-length *Puro* gene is cleaved, recombination would repair the DSB (32). No apparent difference in cell viability following transfection was noted between *BRCA1*^{+/-} and its *BRCA1*^{+/+} derivative lines (data not shown). I-*SceI* expression increased the frequency of Puro^R colony formation by 2- to 6-fold in *BRCA1*^{+/+} relative to *BRCA1*^{+/-} lines (Table I), indicating that reduced BRCA1 protein dosage also decreases the efficiency of HR repair of chromosomal DSBs.

The BRCA1 C-terminal domain is essential to recombination control. Most inherited *BRCA1* loss-of-function mutations lead to BRCA1 proteins truncated at the C-terminus. The *BRCA1 5382insC* mutation, which is common in hereditary breast/ovarian cancers, causes truncation of the entire second BRCT repeat. This truncation, as others located in the last exon, does not lead to nonsense-mediated mRNA decay nor protein instability (33). The well-established BRCA1-deficient human breast cancer HCC1937 cell line containing such a mutation exhibits both a spontaneous hyper-recombination phenotype (10) and a deficit in HR repair of chromosomal DSBs (10, 34). However, given that HCC1937 cells express truncated BRCA1 protein at a barely detectable level and that BRCA1 is haploinsufficient for recombination control, it becomes unclear whether the recombination phenotype of HCC1937 cells is associated with the mutation itself or is due to a reduced level of truncated BRCA1 protein. Such a mutant may have conserved a function in recombination control. Some C-terminally truncated *BRCA1* mutants seem to retain wild-type BRCA1 functions in human cells(23) or show a partial loss of function in mice (35).

To investigate these possibilities, we elevated *BRCA1 5382insC* expression in HCC1937 cells (Fig. 3). The exogenous or endogenous truncated BRCA1 protein was found twice more abundant in the cytoplasm than the nucleus of HCC1937 cells (36). However, an increased level of truncated BRCA1 protein affected neither the frequency and rate of spontaneous recombination nor the efficiency of chromosomal DSB repair (Table II). These results are consistent with previous demonstrations that, unlike wild-type BRCA1 protein, expression of various cancer-eliciting BRCA1 mutant proteins does not confer radio-resistance or correct DNA repair defect in HCC1937 cells (37), and further indicate that the BRCT domain is essential for the regulation of recombination by BRCA1 in response to the type of DNA damage.

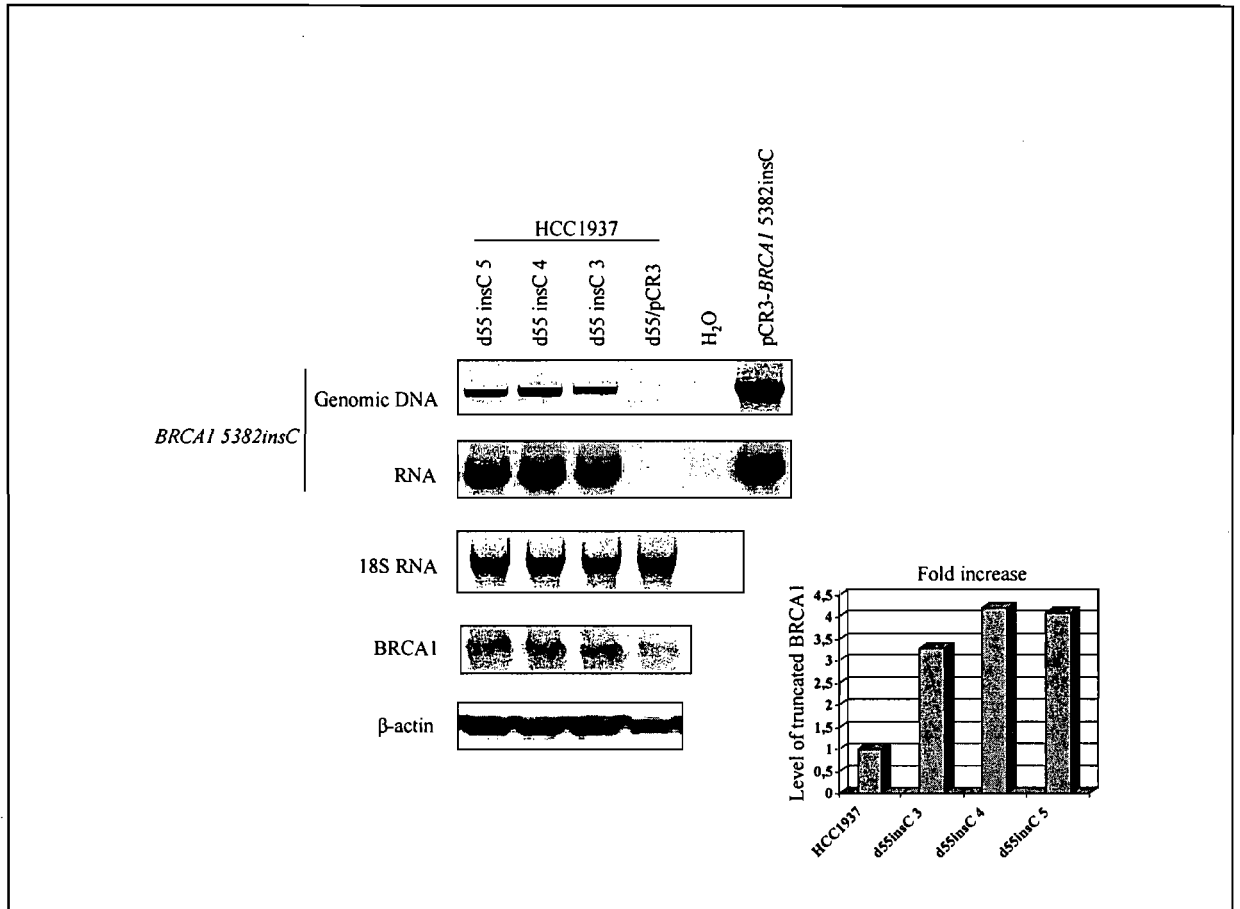


Figure 3. Stable expression of *BRCA1 5382insC* in HCC1937 recombination reporter cell lines. PCR on genomic DNA was carried out to determine *BRCA1* transgene integration. The primer pair was chosen to specifically amplify only the mutated *BRCA1* transgene. mRNA expression from the transgene was demonstrated by qualitative RT-PCR with the same primer pair. As a control for these reactions, rRNA was amplified in parallel in all the cell lines. Water and no RT were used as negative controls, and *BRCA1 5382insC*-expressing vector DNA as a positive control. Western blot analysis revealed that HCC1937 cell clones transfected with *BRCA1 5382insC* express truncated BRCA1 protein 3- to 4-fold more efficiently than the same cell clones transfected with empty vector (d55/pCR3). Fold increases were calculated from band intensity, as described in Figure 1.

Table II. *BRCA1 5382insC* has no effect on spontaneous or I-SceI-induced homologous recombination (HR) in HCC1937 cell lines

Cell lines	Spontaneous recombination				I-SceI-induced	
	Frequency ^a	Ratio ^b	Rate ^c	Ratio ^b	Fold induction ^d	Ratio ^e
d55/pCR3	1.81 ± 1.4 × 10 ⁻⁷	1.0	9.38 ± 4.32 × 10 ⁻⁸	1.0	176.33 ± 22.7	1.0
d55insC 3	2.06 ± 1.1 × 10 ⁻⁷	1.1	1.08 ± 0.49 × 10 ⁻⁷	1.2	206.80 ± 59.8	1.2
d55insC 4	2.80 ± 1.5 × 10 ⁻⁷	1.5	1.38 ± 0.56 × 10 ⁻⁷	1.5	170.75 ± 61.8	1.0
d55insC 5	1.73 ± 1.1 × 10 ⁻⁷	1.0	1.32 ± 0.54 × 10 ⁻⁷	1.4	183.33 ± 71.6	1.0

HR frequency or rate of parental clones was arbitrarily set at 1.0.

^{a,c,d} Frequency, rate and fold induction were determined as described in Table I.

^b Ratio (*BRCA1 5382insC*-expressing derivative cell lines/parent) indicates recombination fold increase in *BRCA1 5382insC*-expressing cells relative to their parents (p=0.7).

^e Ratio (*BRCA1 5382insC*-expressing derivative cell lines/parent) indicates recombination fold increase in *BRCA1 5382insC*-expressing cells relative to their parents (p=0.8).

Truncated BRCA1 protein does not act as a dominant negative mutant. To investigate whether truncated BRCA1 protein affects the stability of wild-type BRCA1 protein and/or interferes with its function, we transfected MCF-7 recombination reporter cell lines with pCR3-*BRCA1 5382insC* (Fig. 4). Truncated BRCA1 protein affected neither spontaneous recombination nor the efficiency of DSB repair (Table III), indicating that this mutant does not affect the function and, by inference, the stability of wild-type BRCA1 protein.

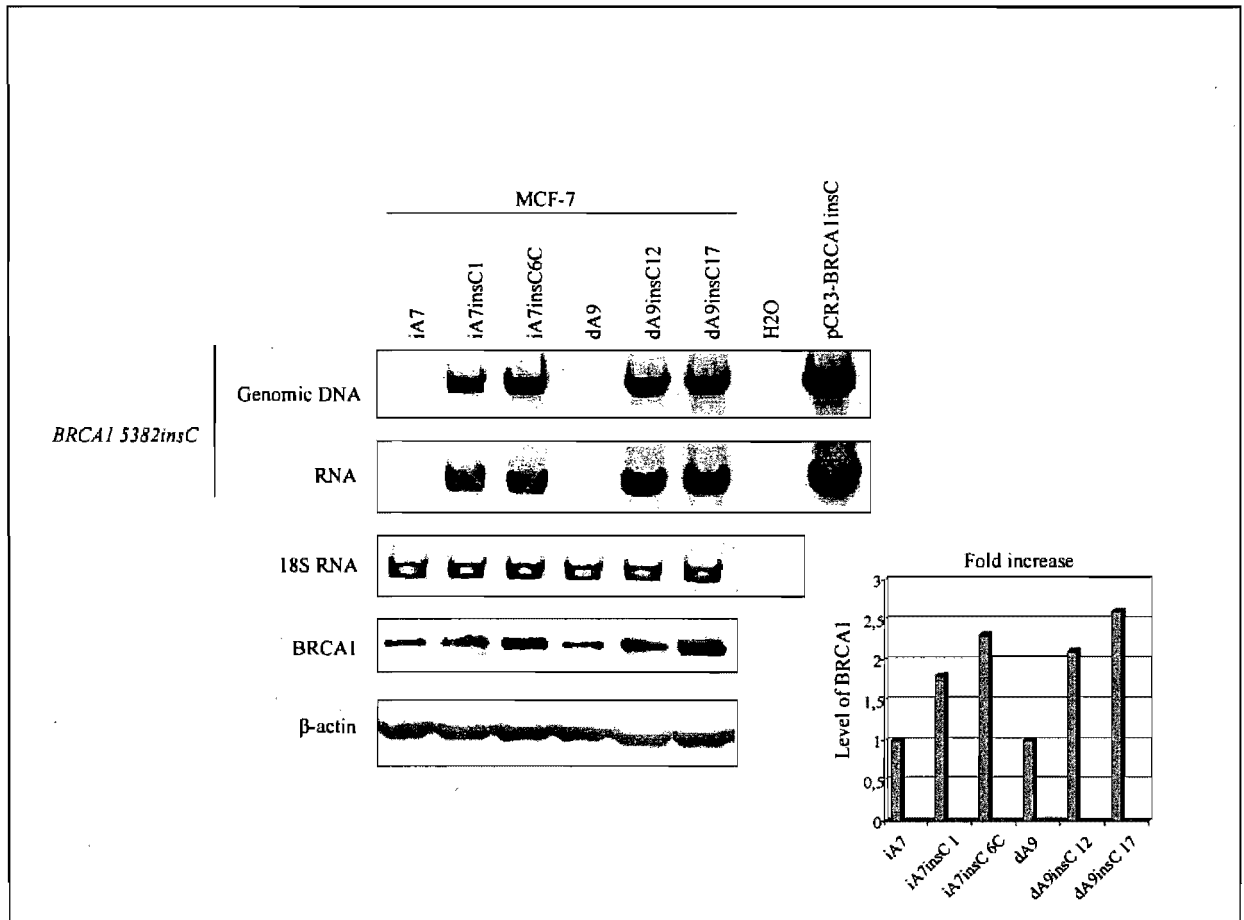


Figure 4. Stable expression of *BRCA1 5382insC* in MCF-7 recombination reporter cell lines. The PCR primer pair was chosen to specifically amplify, from genomic DNA, only the *BRCA1* mutant transgene. mRNA expression from the integrated transgene was demonstrated by qualitative RT-PCR with the same primer pair. As a control for these reactions, rRNA was amplified in parallel in all the cell lines. Water or no RT was used as a negative control, whereas *BRCA1 5382insC*-expressing vector DNA served as a positive control. As the insertion mutation generates a truncated BRCA1 protein with fewer amino acids than wild-type BRCA1 protein, both proteins co-migrate in the Western blot. *BRCA1 5382insC* expression corresponds to an increase in the intensity of the BRCA1 protein band in MCF-7 cell clones relative to the same MCF-7 cell clones transfected with empty vector. Fold increases in expression were calculated from band intensity as described in Figure 1.

Table III. *BRCA1 5382insC* has no effect on spontaneous or I-SceI-induced homologous recombination in MCF-7 cells

Cell lines	Spontaneous recombination				I-SceI-induced	
	Frequency ^a	Ratio ^b	Rate ^c	Ratio ^b	Fold induction ^d	Ratio ^e
<u>Inverted repeat</u>						
iA7	2.05 ± 0.7 × 10 ⁻⁴	1.0	4.94 ± 2.61 × 10 ⁻⁵	1.0	ND ^f	
iA7insC 1	1.29 ± 0.5 × 10 ⁻⁴	1.6	2.78 ± 1.23 × 10 ⁻⁵	1.8	ND	
iA7insC 6C	1.54 ± 0.8 × 10 ⁻⁴	1.3	3.51 ± 1.64 × 10 ⁻⁵	1.4	ND	
<u>Direct repeat</u>						
dA9	2.99 ± 0.4 × 10 ⁻⁶	1.0	7.06 ± 3.19 × 10 ⁻⁷	1.0	217.63 ± 67.6	1.0
dA9insC 12	4.24 ± 1.7 × 10 ⁻⁶	0.7	9.85 ± 3.64 × 10 ⁻⁷	0.7	197.00 ± 59.6	1.1
dA9insC 17	2.59 ± 0.8 × 10 ⁻⁶	1.2	4.89 ± 1.77 × 10 ⁻⁷	1.4	226.00 ± 51.8	1.0

HR frequency or rate of parental clones was arbitrarily set at 1.0.

^{a,c,d} Frequency, rate and fold induction were determined as described in Table I.

^b Ratio (parent/*BRCA1 5382insC*-expressing derivative cell lines) indicates recombination fold decrease in *BRCA1 5382insC*-expressing cells relative to their parents ($p > 0.1$).

^e Ratio (parent/*BRCA1 5382insC*-expressing derivative cell lines) indicates recombination fold decrease in *BRCA1 5382insC*-expressing cells relative to their parents ($p = 0.6$).

^f ND These experiments were not done since the mutant affected neither the frequency nor the proportion of I-SceI-induced recombination events between direct repeats (Table IV). Direct repeats measure both RAD51-dependent and RAD51-independent recombination events (see text).

Truncated BRCA1 protein does not gain a new function in recombination. Wild-type BRCA1 protein binds branched DNA structures (38), and interacts with BLM that processes branched DNA recombination intermediates to suppress crossover and favour gene conversion. Although wild-type BRCA1 protein does not seem to affect this function of BLM (10), truncated BRCA1 mutant protein may retain DNA-binding ability and interfere with the processing of recombination intermediates. To test this hypothesis, we studied the structure of recombination products by PCR. Gene conversion would keep the structure of the reporter intact whereas a crossover event would delete 1 repeat together with the intervening *Hyg* gene at direct repeats but invert this gene at inverted repeats (Fig. 2). However, at direct repeats, spontaneous deletions can also result from RAD51-independent SCRS, whereas DSB-induced deletion can occur by single-strand annealing, a RAD51-independent, error-prone HR pathway (Fig. 2). Truncated BRCA1 protein

did not affect the proportions of gene conversion or deletion/inversion events (Table IV), indicating that this mutant also does not affect the processing of recombination intermediates.

Table IV. Effect of *BRCA1* 5382*insC* on distinct homologous recombination pathways

Cell lines	Spontaneous		I-SceI-induced	
	GC (%)	CO/SCRS (%)	GC (%)	CO/SSA (%)
dA9	34/36 (94)	2/36 (6)	68/74 (92)	6/74 (8)
dA9 ins 12	24/26 (92)	2/26 (8)	71/73 (97)	2/73 (3)
dA9 ins 17	11/12 (92)	1/12 (8)	31/35 (89)	4/35 (11)

Abbreviations: GC, gene conversion; CO, crossover; SCRS, sister chromatid replication slippage; SSA, single-strand annealing (p=0.7).

BRCA1 haploinsufficiency, but not the truncated BRCA1 mutant, confers hypersensitivity to the DNA cross-linking agent MMC. Previous studies have demonstrated that the hypersensitivity of BRCA1/2-deficient cells to the DSB-inducing, DNA inter-strand cross-linking agents MMC and cisplatin is associated with defective S-phase HR (13-15). To investigate whether reduced BRCA1 level also confers hypersensitivity to MMC, we performed a clonogenic survival assay on cell lines with different BRCA1 status. Both parental HCC1937 and MCF-7 cell lines appeared to be more sensitive to MMC than BRCA1-expressing derivatives, but just as sensitive as truncated BRCA1-expressing derivatives (Fig. 5). These data indicate that BRCA1 haploinsufficiency alone sensitizes breast cancer cells to DNA inter-strand cross-linking agents.

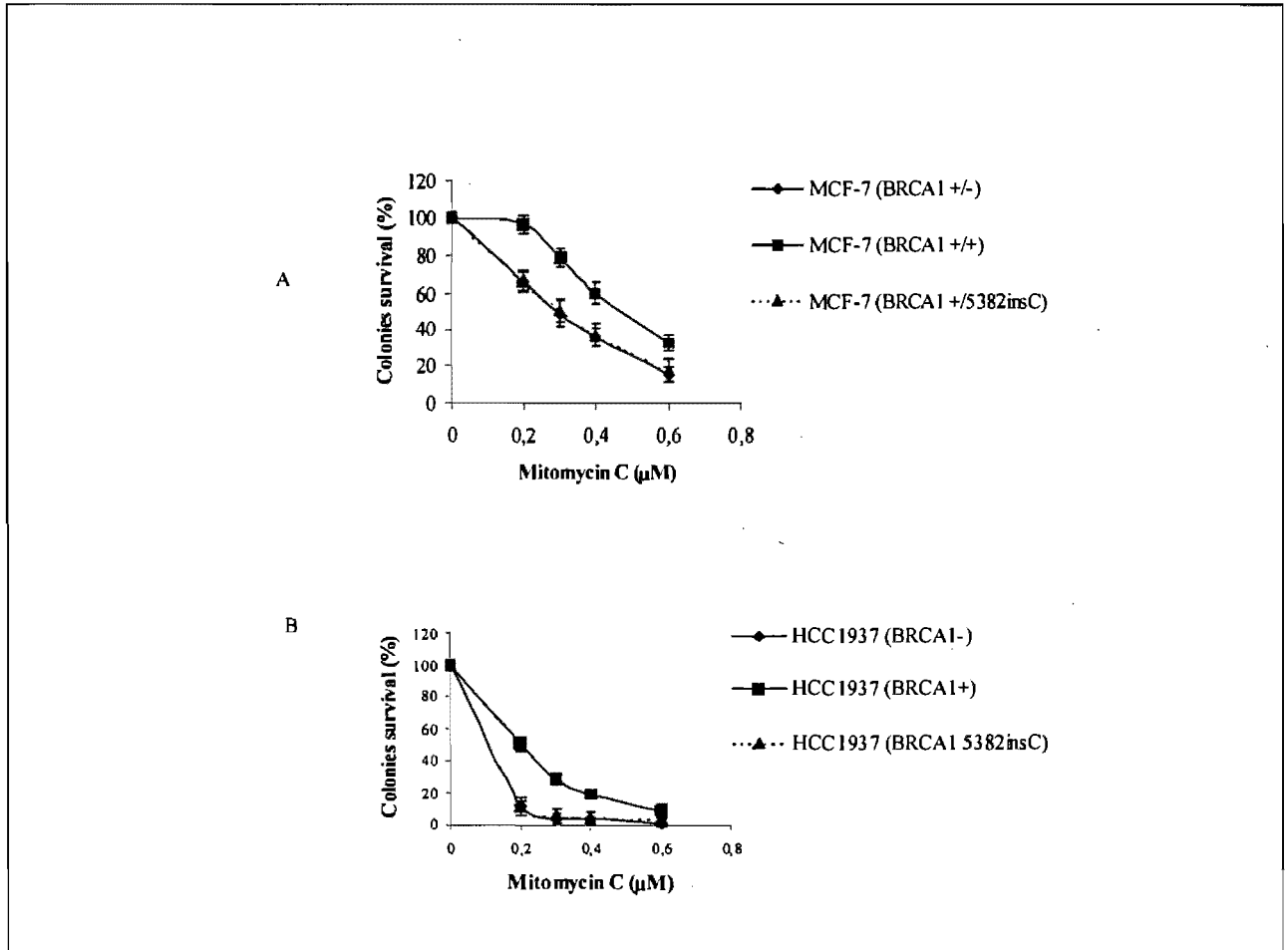


Figure 5. Clonogenic survival assay for MMC. **A)** MCF-7 cells corrected for BRCA1 protein level (BRCA1^{+/+}, IC₅₀=0.50 µM) are more resistant to various dosages of MMC than parental MCF-7 (BRCA^{+/-}, IC₅₀=0.29 µM) cells or MCF-7 cells expressing truncated BRCA1 protein (BRCA1^{+/5382insC}, IC₅₀=0.30 µM). **B)** HCC1937 (BRCA1⁻, IC₅₀=0.11 µM) parental cells are as sensitive as HCC1937 cells expressing truncated BRCA1 protein (BRCA1^{+/5382insC}, IC₅₀=0.11 µM) but more sensitive than HCC1937 expressing wild-type BRCA1 protein (BRCA⁺, IC₅₀=0.20 µM). Standard error bars are shown on the graph. Where error bars are not seen, standard errors were too small to show on the graph.

Discussion

We found that correction of BRCA1 dosage to the wild-type level in MCF-7 recombination reporter cell lines decreased spontaneous HR but increased the efficiency of HR repair of chromosomal DSBs. However, physiological expression of the cancer-eliciting *BRCA1 5382insC* mutant allele, which encodes C-terminally truncated BRCA1 protein, had no effect on either phenotype. These findings indicate that BRCA1 haploinsufficiency alone deregulates recombination control. Consistent with these findings are the observations that MCF-7 cells with reduced *BRCA1* expression undergo spontaneous chromosomal abnormalities during division (31), and expression of wild-type, but not a mutant, *BRCA1* allele reduced the ability of MCF-7 cells to form tumors in mice (29). Such phenotypes are possibly caused by incorrect stoichiometry with BRCA1 interacting proteins and complexes.

Since several biological functions of BRCA1 involve its interaction with other cellular proteins (2), BRCA1 mutants that still retain the ability to bind such proteins may disrupt their function and/or that of wild-type BRCA1 protein. Given that much of BRCA1 in the cell is in a heterodimeric complex with BARD1 (BRCA1-associated RING domain protein), a structurally related protein that is also targeted by mutations in breast/ovarian cancers (39), one would expect that, in our assay system, the truncated BRCA1 mutant would act as dominant negative by sequestering BARD1. BRCA1 interacts with BARD1 via BRCA1 N-terminal region that encompasses the RING domain and this liaison stabilizes both proteins and increases their entry to the nucleus (40). Colocalization of BARD1 with BRCA1, BRCA2, and RAD51 at sites of DNA damage/replication suggested the involvement of BARD1 in HR repair of chromosomal DSBs (3) and is substantiated by recent studies (41). C-terminally truncated BRCA1 protein appears to be stable when expressed in BRCA1-deficient HCC1937 cells and MCF-7 cells and retains its ability to interact with BARD1 (36, 42), but does not affect recombination control nor did it gain a new function in this process. By contrast, over-expression of various BRCA1 mutants in wild-type human cell lines interfered with BRCA1 function in apoptosis, transcription, the DNA damage response, and

cell proliferation (21-23, 26). In addition, BRCA1 C-terminus over-expression alone accelerated cell proliferation and altered G₂-M cell cycle control (43), whereas over-expression of the N-terminal part of BRCA1 caused radio- and chemo-sensitivity, increased tumorigenicity and disrupted mammary gland differentiation in mice (24, 25).

Although the exact reason for this conflict remains to be clearly defined, we entertain the hypothesis that BRCA1 mutants may all act as dominant negatives by a dosage effect. In our assay system, the *BRCA1* mutant allele is expressed at a level similar to that of the endogenous wild-type *BRCA1* allele. In such a physiological condition, which mimics that of cells from carriers of *BRCA1/2* mutations, BARD1 would not be in a limiting amount, and even if it still fully interacts with truncated BRCA1 protein, enough BARD1 would remain available for wild-type BRCA1 protein. By contrast, in other studies, *BRCA1* mutant alleles were highly or moderately over-expressed in wild-type human cells. This would certainly disturb the balance in protein dosage and may be an important determinant of outcome. This hypothesis seems to be supported by findings that reduced or increased expression of either *BARD1* or *BRCA1* results in similar phenotypes, including genome instability and aberrations in cell proliferation, transcription, apoptosis, and the morphogenetic properties of mammary cells (39). An imbalance in BRCA1 and BARD1 protein dosage may affect not only the BRCA1-dependent but also the BRCA1-independent functions of BARD1.

Our findings that increasing the dosage of C-terminally truncated BRCA1 protein either in BRCA1-deficient HCC1937 cells, which weakly express this mutant, or in MCF-7 cells did not affect recombination control indicate that the BRCT domain is essential for this process. Given that such a domain has been implicated in BRCA1 conformational change, BRCA1 nuclear import, and DNA damage-inducible BRCA1 foci as well as RAD51 foci (40, 44), the lack of effect of truncated BRCA1 protein on recombination control could be attributable to aberrations in these processes and/or its inability to interact with BRCA2 that is normally mediated through the BRCT domain (2).

BRCA2 haploinsufficiency may also deregulate recombination control. When compared to wild-type cells, human lymphocytes from carriers of *BRCA2* mutations, or vertebrate cells heterozygous for a *BRCA2* mutation, not only exhibit decreased efficiency of HR repair of DSBs, as revealed by their reduced ability to form RAD51 foci and heightened sensitivity to MMC and cisplatin (45, 46), but also show an increased rate of spontaneous SCR (47), inversions, duplications, and amplifications at some loci (48). Thus, an increment of spontaneous recombination between mis-aligned sister chromatids in carriers of *BRCA1/2* mutations or in wild-type individuals with reduced *BRCA1/2* expression would be expected to augment the loss of heterozygosity, especially at *BRCA1/2* loci, because of the high density of repetitive DNA sequences in and surrounding these genes (17). It is noteworthy that most, if not all, of the rearrangements that were characterized at inherited *BRCA1/2* mutant genes appeared to be recombination-mediated deletions, duplications, triplications, and inversions involving DNA repeats (49). In addition, normal human breast cells from *BRCA1/2* mutation carriers can undergo loss of either the mutant or wild-type *BRCA1/2* allele at a similar frequency (50), consistent with the idea that recombination deregulation is the initial event that triggers genome instability and carcinogenesis (9, 10).

Whether BRCA1 is also haploinsufficient for DSB repair by non-homologous end joining (NHEJ) cannot be addressed with the reporter assay system described here, as it monitors only HR events. NHEJ is the main pathway for repair of ionizing radiation (IR)-induced DSBs (51). Given that BRCA1 plays an important role in the cell's response to IR, several studies investigated whether fibroblasts or lymphocytes from carriers of *BRCA1/2* mutations show enhanced chromosomal radio-sensitivity (reviewed in (20)). Such a phenotype may increase toxicity and the carcinogenic risk of radiotherapy and mammography screening in such individuals. However, although the findings were contradictory, most of them supported the idea that such individuals have no gross defects in their ability to repair radiation-induced DNA breaks, and are not characterized by an enhanced *in vitro* sensitivity (20). These findings are consistent with previous observations that neither BRCA1 nor BRCA2 is required for efficient NHEJ of radiation- or

restriction enzyme-induced DNA breaks or NHEJ-dependent V(D)J rearrangements (4, 52-54). Although lymphocytes from carriers of *BRCA1* mutations seem haploinsufficient for NHEJ fidelity, such a phenotype did not affect global DNA end-joining efficiency, which includes both error-free and error-prone NHEJ events (55). *BRCA1* and *BRCA2* have also been implicated in nucleotide-excision repair (NER), a DNA repair process that can also repair IR-induced DNA damage (4). However, a reduced efficiency in either NER or HR repair cannot be appreciated with the assay systems employed for radiation sensitivity. In addition, a recent study with breast tissue and lymphocytes from a *BRCA1* mutation carrier indicated that *BRCA1* is not haploinsufficient for NER (56). There is evidence that the function of *BRCA1* protein in DNA repair can be genetically dissociated from its function in cell cycle control (34). Thus, aspects other than DNA repair in the cell's response to IR might be affected. However, in larger studies where the *in vivo* radiation response was analyzed, no differences were found in acute or chronic toxicity towards radiotherapy between breast cancer patients carrying *BRCA1/2* mutations or not (20).

In conclusion, our findings together with others indicate that *BRCA1* and *BRCA2* haploinsufficiency alone is sufficient to compromise genome stability by triggering spontaneous recombination events that are likely to account for the increased risk of cancer promoting mutations. Under the assumption that *BRCA1* and *BRCA2* regulate recombination in response to estrogen-induced DNA damage (9, 10), such findings support the idea that dietary nutrients that increase *BRCA1/2* expression and/or reduce estrogen-induced DNA damage may modulate the risk of hereditary breast/ovarian cancer (57). Such dietary nutrients have already been demonstrated to be effective in reducing tumor incidence in women without genetic pre-disposition. Our findings seem to predict that women with decreased *BRCA1/2* expression would benefit more from such interventions, and suggest that chemosensitivity is more appropriate than radio-sensitivity as a biomarker in the screening of carriers of *BRCA1/2* mutations. However, given that chemical drugs that induce DSBs at replication forks are currently used in cancer chemotherapy such findings evoke caution in the management of carriers of *BRCA1/2* mutations. Although

these patients may respond better to chemotherapy than the general population, they may also easily develop severe side effects. Regimens that increase *BRCA1/2* expression may help in this case. By contrast, reagents that reduce *BRCA1/2* expression or interfere with their functions may prove valuable in reducing tumors resistance to chemotherapy in wild-type individuals.

Acknowledgments

We thank Drs. Barbara Weber (University of Pennsylvania Cancer Center, Philadelphia, PA) for generously providing us with the plasmids pCR3-*BRCA1* and pCR3-*BRCA1 5382insC*, and Maria Jasin (Molecular Biology Program, Memorial Sloan-Kettering Institute, New York, NY) for pβactineScel. We also thank Mr. Ovid Da Silva, Research Support Office, Research Center, CHUM, for his editorial assistance.

Grant support: Canadian Institutes of Health Research/Canadian Breast Cancer Research Alliance (A. Belmaaza), and a Canderel fellowship and bursary from Faculté des études supérieures, Université de Montréal, and Institut du Cancer de Montréal (I. Cousineau).

References

1. **Wooster, R., and B. L. Weber.** 2003. Breast and ovarian cancer. *N Engl J Med* **348**:2339-47.
2. **Yoshida, K., and Y. Miki.** 2004. Role of BRCA1 and BRCA2 as regulators of DNA repair, transcription, and cell cycle in response to DNA damage. *Cancer Sci* **95**:866-71.
3. **Scully, R., and D. M. Livingston.** 2000. In search of the tumour-suppressor functions of BRCA1 and BRCA2. *Nature* **408**:429-32.
4. **Venkitaraman, A. R.** 2002. Cancer susceptibility and the functions of BRCA1 and BRCA2. *Cell* **108**:171-82.
5. **Hirano, T.** 2005. Cell biology: holding sisters for repair. *Nature* **433**:467-8.
6. **Meyn, M. S.** 1997. Chromosome instability syndromes: lessons for carcinogenesis. *Curr Top Microbiol Immunol* **221**:71-148.
7. **Lomonosov, M., S. Anand, M. Sangrithi, R. Davies, and A. R. Venkitaraman.** 2003. Stabilization of stalled DNA replication forks by the BRCA2 breast cancer susceptibility protein. *Genes Dev* **17**:3017-22.
8. **Venkitaraman, A. R.** 2004. Tracing the network connecting BRCA and Fanconi anaemia proteins. *Nat Rev Cancer* **4**:266-76.
9. **Abaji, C., I. Cousineau, and A. Belmaaza.** 2005. BRCA2 regulates homologous recombination in response to DNA damage: implications for genome stability and carcinogenesis. *Cancer Res* **65**:4117-25.
10. **Cousineau, I., C. Abaji, and A. Belmaaza.** 2005. BRCA1 regulates RAD51 function in response to DNA damage and suppresses spontaneous sister chromatid replication slippage: implications for sister chromatid cohesion, genome stability, and carcinogenesis. *Cancer Res* **65**:11384-91.
11. **cKitagawa, R., C. J. Bakkenist, P. J. McKinnon, and M. B. Kastan.** 2004. Phosphorylation of SMC1 is a critical downstream event in the ATM-NBS1-BRCA1 pathway. *Genes Dev* **18**:1423-38.
12. **Chen, A., F. E. Kleiman, J. L. Manley, T. Ouchi, and Z. Q. Pan.** 2002. Autoubiquitination of the BRCA1*BARD1 RING ubiquitin ligase. *J Biol Chem* **277**:22085-92.

13. **Rothfuss, A., and M. Grompe.** 2004. Repair kinetics of genomic interstrand DNA cross-links: evidence for DNA double-strand break-dependent activation of the Fanconi anemia/BRCA pathway. *Mol Cell Biol* **24**:123-34.
14. **Jasin, M.** 2002. Homologous repair of DNA damage and tumorigenesis: the BRCA connection. *Oncogene* **21**:8981-93.
15. **Yun, J., Q. Zhong, J. Y. Kwak, and W. H. Lee.** 2005. Hypersensitivity of Brca1-deficient MEF to the DNA interstrand crosslinking agent mitomycin C is associated with defect in homologous recombination repair and aberrant S-phase arrest. *Oncogene* **24**:4009-16.
16. **Zhang, J., and S. N. Powell.** 2005. The role of the BRCA1 tumor suppressor in DNA double-strand break repair. *Mol Cancer Res* **3**:531-9.
17. **Welsh, P. L., and M. C. King.** 2001. BRCA1 and BRCA2 and the genetics of breast and ovarian cancer. *Hum Mol Genet* **10**:705-13.
18. **Monteiro, A. N.** 2003. BRCA1: the enigma of tissue-specific tumor development. *Trends Genet* **19**:312-5.
19. **Santarosa, M., and A. Ashworth.** 2004. Haploinsufficiency for tumour suppressor genes: when you don't need to go all the way. *Biochim Biophys Acta* **1654**:105-22.
20. **Baeyens, A., H. Thierens, K. Claes, B. Poppe, L. de Ridder, and A. Vral.** 2004. Chromosomal radiosensitivity in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. *Int J Radiat Biol* **80**:745-56.
21. **Zhang, H., K. Somasundaram, Y. Peng, H. Tian, D. Bi, B. L. Weber, and W. S. El-Deiry.** 1998. BRCA1 physically associates with p53 and stimulates its transcriptional activity. *Oncogene* **16**:1713-21.
22. **Thangaraju, M., S. H. Kaufmann, and F. J. Couch.** 2000. BRCA1 facilitates stress-induced apoptosis in breast and ovarian cancer cell lines. *J Biol Chem* **275**:33487-96.
23. **Fan, S., R. Yuan, Y. X. Ma, Q. Meng, I. D. Goldberg, and E. M. Rosen.** 2001. Mutant BRCA1 genes antagonize phenotype of wild-type BRCA1. *Oncogene* **20**:8215-35.
24. **Sylvain, V., S. Lafarge, and Y. J. Bignon.** 2002. Dominant-negative activity of a Brca1 truncation mutant: effects on proliferation, tumorigenicity in vivo, and chemosensitivity in a mouse ovarian cancer cell line. *Int J Oncol* **20**:845-53.

25. **Brown, M. A., H. Nicolai, K. Howe, T. Katagiri, N. Lalani el, K. J. Simpson, N. W. Manning, A. Deans, P. Chen, K. K. Khanna, M. R. Wati, B. L. Griffiths, C. F. Xu, G. W. Stamp, and E. Solomon.** 2002. Expression of a truncated Brcal protein delays lactational mammary development in transgenic mice. *Transgenic Res* **11**:467-78.
26. **You, F., N. Chiba, C. Ishioka, and J. D. Parvin.** 2004. Expression of an amino-terminal BRCA1 deletion mutant causes a dominant growth inhibition in MCF10A cells. *Oncogene* **23**:5792-8.
27. **Wei, M., T. A. Grushko, J. Dignam, F. Hagos, R. Nanda, L. Sveen, J. Xu, J. Fackenthal, M. Tretiakova, S. Das, and O. I. Olopade.** 2005. BRCA1 promoter methylation in sporadic breast cancer is associated with reduced BRCA1 copy number and chromosome 17 aneusomy. *Cancer Res* **65**:10692-9.
28. **Lemelin, J. F., C. Abaji, I. Cousineau, and A. Belmaaza.** 2005. Disruption of p53 by the viral oncoprotein HPV16-E6 does not deregulate chromosomal homologous recombination in a transcriptional interference-free assay system. *Cell Cycle* **4**:831-7.
29. **Holt, J. T., M. E. Thompson, C. Szabo, C. Robinson-Benion, C. L. Arteaga, M. C. King, and R. A. Jensen.** 1996. Growth retardation and tumour inhibition by BRCA1. *Nat Genet* **12**:298-302.
30. **Favy, D. A., P. Rio, J. C. Maurizis, C. Hizel, Y. J. Bignon, and D. J. Bernard-Gallon.** 1999. Prolactin-dependent up-regulation of BRCA1 expression in human breast cancer cell lines. *Biochem Biophys Res Commun* **258**:284-91.
31. **Kachhap, S. K., S. P. Vetale, P. Dange, and S. N. Ghosh.** 2001. Reduced expression of the BRCA1 gene and increased chromosomal instability in MCF-7 cell line. *Cell Biol Int* **25**:547-51.
32. **Jasin, M.** 1996. Genetic manipulation of genomes with rare-cutting endonucleases. *Trends Genet* **12**:224-8.
33. **Perrin-Vidoz, L., O. M. Sinilnikova, D. Stoppa-Lyonnet, G. M. Lenoir, and S. Mazoyer.** 2002. The nonsense-mediated mRNA decay pathway triggers degradation of most BRCA1 mRNAs bearing premature termination codons. *Hum Mol Genet* **11**:2805-14.
34. **Zhang, J., H. Willers, Z. Feng, J. C. Ghosh, S. Kim, D. T. Weaver, J. H. Chung, S. N. Powell, and F. Xia.** 2004. Chk2 phosphorylation of BRCA1 regulates DNA double-strand break repair. *Mol Cell Biol* **24**:708-18.
35. **Ludwig, T., P. Fisher, S. Ganesan, and A. Efstratiadis.** 2001. Tumorigenesis in mice carrying a truncating Brcal mutation. *Genes Dev* **15**:1188-93.

36. **Rodriguez, J. A., W. W. Au, and B. R. Henderson.** 2004. Cytoplasmic mislocalization of BRCA1 caused by cancer-associated mutations in the BRCT domain. *Exp Cell Res* **293**:14-21.
37. **Scully, R., S. Ganesan, K. Vlasakova, J. Chen, M. Socolovsky, and D. M. Livingston.** 1999. Genetic analysis of BRCA1 function in a defined tumor cell line. *Mol Cell* **4**:1093-9.
38. **Paull, T. T., D. Cortez, B. Bowers, S. J. Elledge, and M. Gellert.** 2001. Direct DNA binding by Brca1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**:6086-91.
39. **Irminger-Finger, I., and C. E. Jefford.** 2006. Is there more to BARD1 than BRCA1? *Nat Rev Cancer* **6**:382-91.
40. **Henderson, B. R.** 2005. Regulation of BRCA1, BRCA2 and BARD1 intracellular trafficking. *Bioessays* **27**:884-93.
41. **Westermarck, U. K., M. Reyngold, A. B. Olshen, R. Baer, M. Jasin, and M. E. Moynahan.** 2003. BARD1 participates with BRCA1 in homology-directed repair of chromosome breaks. *Mol Cell Biol* **23**:7926-36.
42. **Au, W. W., and B. R. Henderson.** 2005. The BRCA1 RING and BRCT domains cooperate in targeting BRCA1 to ionizing radiation-induced nuclear foci. *J Biol Chem* **280**:6993-7001.
43. **Larson, J. S., J. L. Tonkinson, and M. T. Lai.** 1997. A BRCA1 mutant alters G2-M cell cycle control in human mammary epithelial cells. *Cancer Res* **57**:3351-5.
44. **Zhou, C., P. Huang, and J. Liu.** 2005. The carboxyl-terminal of BRCA1 is required for subnuclear assembly of RAD51 after treatment with cisplatin but not ionizing radiation in human breast and ovarian cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* **336**:952-60.
45. **Arnold, K., M. K. Kim, K. Frerk, L. Edler, L. Savelyeva, P. Schmezer, and R. Wiedemeyer.** 2006. Lower level of BRCA2 protein in heterozygous mutation carriers is correlated with an increase in DNA double strand breaks and an impaired DSB repair. *Cancer Lett.*
46. **Warren, M., C. J. Lord, J. Masabanda, D. Griffin, and A. Ashworth.** 2003. Phenotypic effects of heterozygosity for a BRCA2 mutation. *Hum Mol Genet* **12**:2645-56.
47. **Kim, M. K., S. Zitzmann, F. Westermann, K. Arnold, S. Brouwers, M. Schwab, and L. Savelyeva.** 2004. Increased rates of spontaneous sister chromatid

exchange in lymphocytes of BRCA2+/- carriers of familial breast cancer clusters. *Cancer Lett* **210**:85-94.

48. **Savelyeva, L., A. Claas, I. Matzner, P. Schlag, W. Hofmann, S. Scherneck, B. Weber, and M. Schwab.** 2001. Constitutional genomic instability with inversions, duplications, and amplifications in 9p23-24 in BRCA2 mutation carriers. *Cancer Res* **61**:5179-85.
49. **Mazoyer, S.** 2005. Genomic rearrangements in the BRCA1 and BRCA2 genes. *Hum Mutat* **25**:415-22.
50. **Clarke, C. L., J. Sandle, A. A. Jones, A. Sofronis, N. R. Patani, and S. R. Lakhani.** 2006. Mapping loss of heterozygosity in normal human breast cells from BRCA1/2 carriers. *Br J Cancer* **95**:515-9.
51. **Khanna, K. K., and S. P. Jackson.** 2001. DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. *Nat Genet* **27**:247-54.
52. **Wang, H., Z. C. Zeng, T. A. Bui, S. J. DiBiase, W. Qin, F. Xia, S. N. Powell, and G. Iliakis.** 2001. Nonhomologous end-joining of ionizing radiation-induced DNA double-stranded breaks in human tumor cells deficient in BRCA1 or BRCA2. *Cancer Res* **61**:270-7.
53. **Abbott, D. W., M. E. Thompson, C. Robinson-Benion, G. Tomlinson, R. A. Jensen, and J. T. Holt.** 1999. BRCA1 expression restores radiation resistance in BRCA1-defective cancer cells through enhancement of transcription-coupled DNA repair. *J Biol Chem* **274**:18808-12.
54. **Merel, P., A. Prieur, P. Pfeiffer, and O. Delattre.** 2002. Absence of major defects in non-homologous DNA end joining in human breast cancer cell lines. *Oncogene* **21**:5654-9.
55. **Baldeyron, C., E. Jacquemin, J. Smith, C. Jacquemont, I. De Oliveira, S. Gad, J. Feunteun, D. Stoppa-Lyonnet, and D. Papadopoulos.** 2002. A single mutated BRCA1 allele leads to impaired fidelity of double strand break end-joining. *Oncogene* **21**:1401-10.
56. **Latimer, J. J., W. S. Rubinstein, J. M. Johnson, A. Kanbour-Shakir, V. G. Vogel, and S. G. Grant.** 2005. Haploinsufficiency for BRCA1 is associated with normal levels of DNA nucleotide excision repair in breast tissue and blood lymphocytes. *BMC Med Genet* **6**:26.
57. **Kotsopoulos, J., and S. A. Narod.** 2005. Brief Report: Towards a dietary prevention of hereditary breast cancer. *Cancer Causes Control* **16**:125-138.

Chapitre 5. Résultats supplémentaires

5.1 BRCA1 protège contre l'instabilité génomique associée à l'estrogène

L'utilisation d'un système de mesure de la RH basé sur un plasmide rapporteur permet de comptabiliser la RH intrachromatide, c'est-à-dire entre deux gènes de résistance inclus dans le substrat de recombinaison, mais aussi interchromatide non alignées, c'est-à-dire entre les gènes de résistance situés sur deux chromatides sœurs. Toutefois, ce système ne nous permet pas de visualiser la RH interchromatide entre les chromatides sœurs bien alignées, puisque ce mécanisme va régénérer un marqueur de sélection non fonctionnel, identique à celui présent au départ. Comme nous avons établi que BRCA1 joue un rôle dans la cohésion et/ou l'alignement des chromatides sœurs, un effet de BRCA1 sur la RH pourrait être masqué par une altération du choix du partenaire de recombinaison. C'est pourquoi nous avons voulu écarter cette hypothèse en confirmant les résultats obtenus à l'aide d'un substrat de recombinaison plasmidique avec une technique qui nous permettrait de visualiser également les événements interchromatides bien alignés. Nous avons opté pour la technique de visualisation des SCE.

À l'aide de cette technique nous avons établi que le nombre de SCE varie en fonction du statut de BRCA1. Effectivement, dans notre modèle cellulaire déficient en BRCA1, les HCC1937, l'expression exogène de BRCA1 entraîne une diminution des SCE. Le nombre de SCE par cellules est établi à 14.32 ± 5.38 en absence de BRCA1 alors qu'il passe à 11.55 ± 4.75 lorsque les mêmes cellules sont complémentées pour l'expression de BRCA1 ($p=0.038$, Test T de Student, deux expériences indépendantes, 60 mitoses analysées). Dans ce modèle, le niveau de base de SCE est donc directement influencé par la présence de BRCA1, ce qui vient confirmer l'effet de BRCA1 sur la diminution de la RH spontanée autant intrachromatide qu'interchromatide. Nous avons par la suite voulu tester si l'effet de BRCA1 sur les SCE et la RH est dépendant du niveau d'expression de celui-ci. Effectivement, en utilisant une lignée cellulaire qui ne possède qu'un seul allèle de BRCA1, les MCF-7, nous avons établi que le nombre de SCE par cellules diminue lorsque le niveau de BRCA1 est augmenté, passant de $15,84 \pm 3.57$ à $12,53 \pm 3.22$

($p < 0.0001$)(Table V). Il est intéressant de noter que le nombre de chromosomes présents dans les MCF-7 est supérieur à 46 (ATCC). Il varie plutôt autour d'une moyenne que nous avons établie à 60.68 ± 11.27 . Lorsque comparées, les HCC1937 montrent plus de SCE par chromosomes que les MCF-7, ce qui est consistant avec leur statut respectif de mutant homozygote versus hémizygote pour BRCA1. Certains pourraient croire que les problèmes de ploïdie observés chez les MCF-7 affectent le statut de BRCA1. Il a toutefois été démontré par deux groupes indépendants que malgré cette caractéristique, les MCF-7 ne possèdent qu'un seul allèle de BRCA1 mesuré par marqueurs microsatellites et qu'elles démontrent une diminution d'expression au niveau de l'ARNm comparativement à des cellules possédant deux allèles fonctionnels (400, 401). On peut également mentionner que dans notre étude sur l'haploinsuffisance, nous avons établi que le niveau de protéine associé à l'expression de BRCA1 dans les MCF-7 est équivalent approximativement à la moitié de celui retrouvé dans les cellules HeLa qui possèdent deux allèles de BRCA1 sauvages (voir Figure 1 Chapitre 4). Ces résultats indiquent que BRCA1 inhibe la RH globale en absence de dommages à l'ADN exogènes malgré son rôle dans la cohésion et/ou l'alignement des chromatides.

L'étude des SCE constitue un indicateur du potentiel génotoxique/mutagène d'un produit puisqu'une grande partie des dommages à l'ADN va induire des SCE suite à l'arrêt des fourches de réplication. Il est démontré que l'estrogène entraîne une augmentation du nombre de SCE dans les cellules exposées (402). Nous avons donc voulu évaluer l'importance du niveau d'expression de BRCA1 dans la réponse cellulaire suite à l'exposition à l'estrogène.

Nous avons tout d'abord déterminé les concentrations d'estrogène à utiliser. Il est établi que la concentration d'estrogène physiologique circulante correspond environ à 1×10^{-10} M (383). Toutefois, la concentration d'estrogène présente dans les tissus mammaires serait 10 à 50 fois plus élevée que le niveau retrouvé dans le sang (403), probablement à cause de la présence accrue d'aromatases locales, les enzymes qui catalysent la transformation d'androgène en estrogène (404). De plus, suite à certains traitements hormonaux, le niveau d'estradiol, la forme circulante

d'estrogène, peut varier de 7.00×10^{-8} à 7.00×10^{-6} M (383). Nous avons donc voulu déterminer s'il est vraisemblable de penser que le niveau d'expression de BRCA1 affecte le nombre de SCE suite à une exposition à l'estrogène à des niveaux semblables. Il est important ici de noter qu'à aucun moment nous n'avons retiré les différentes hormones stéroïdes présentes dans le milieu de culture de base puisque le traitement du sérum au charbon, nécessaire pour retirer les hormones stéroïdes, élimine également une grande quantité de facteurs de croissance essentiels à la prolifération des MCF-7. Notre expérimentation nous a permis de confirmer qu'effectivement, l'exposition à l'estrogène entraîne une légère augmentation du nombre de SCE de façon dose-dépendante. Cette augmentation ne s'avère toutefois pas significative aux doses testées. Par contre, nous avons montré qu'une augmentation d'expression de BRCA1 stimule les SCE suite à l'exposition à l'estradiol (Table V)(Figure 16). Ces résultats indiquent que le niveau d'expression de BRCA1 peut affecter la réponse cellulaire au stress estrogénique.

Table V. Effet de BRCA1 sur l'influence de l'estradiol mesurée par le nombre d'échanges entre chromatides sœurs par cellules dans les MCF7

Concentration d'estrogène (M)	MCF-7 (BRCA1 ^{+/-})	MCF-7 (BRCA1 ^{+/+})
0	15,84 ± 3.57	12,53 ± 3.22
1,00E-08	15,88 ± 3.21	15,77 ± 4.12
1,00E-07	15,89 ± 3.96	18,24 ± 3.65
1,00E-06	16,05 ± 3.97	18,85 ± 3.39
1,00E-05	16,15 ± 3.45	19,85 ± 4.11

Calcul pour une moyenne de 60.68 ± 11.27 chromosomes par cellules
Test T de Student

$p < 0.0001$ BRCA1^{+/+} versus BRCA1^{+/-}, sans estrogène

$p > 0.05$ pour les MCF7 BRCA1^{+/-} peu importe la concentration d'estrogène

$p < 0.03$ pour les MCF7 BRCA1^{+/+} peu importe la concentration d'estrogène

30 cellules comptabilisées par conditions par expériences

2 expériences indépendantes

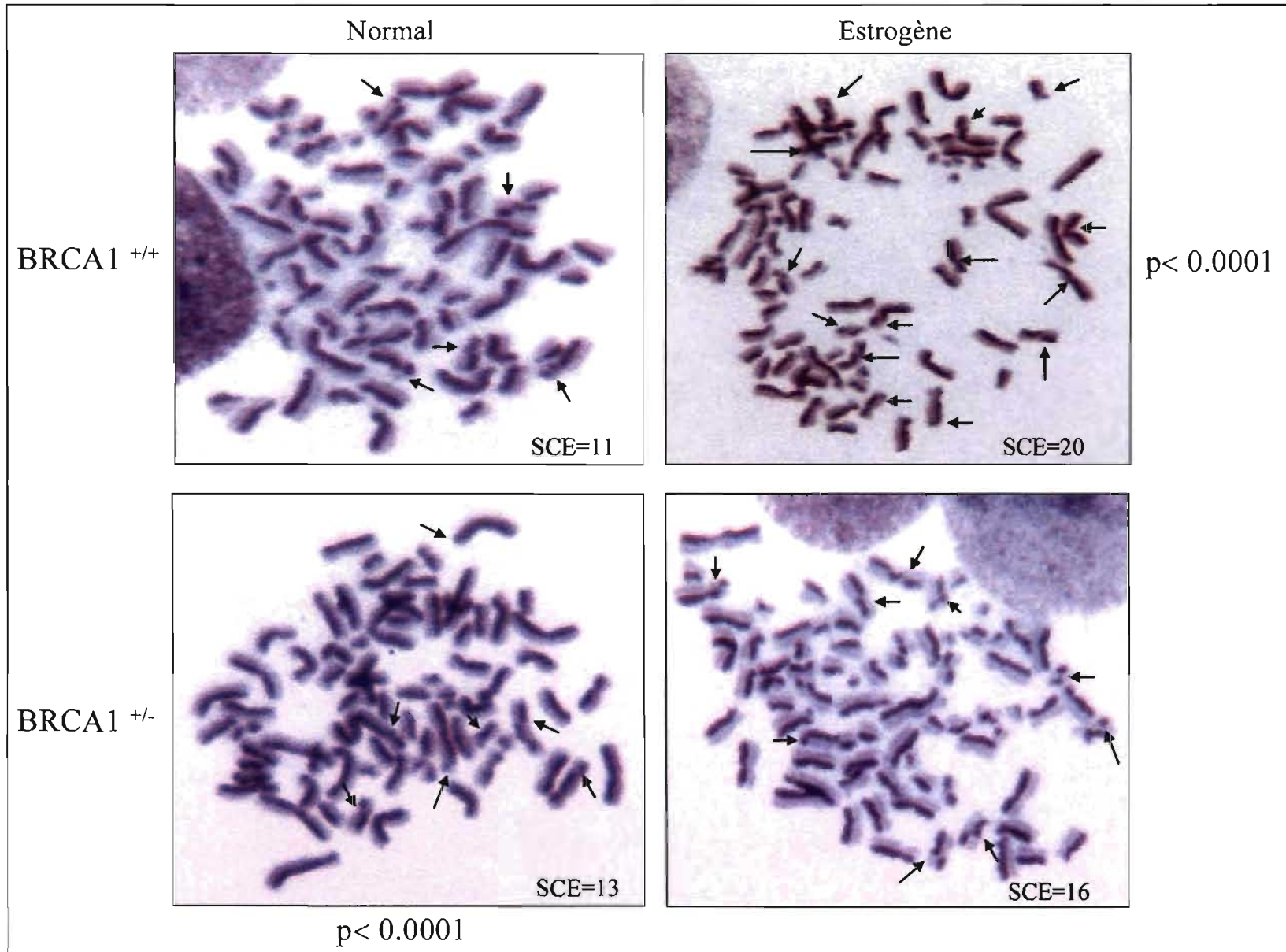


Figure 16. Exemple de visualisation des échanges entre chromatides sœurs dans les MCF-7. La présence de BRCA1 inhibe les échanges entre chromatides sœurs en absence de dommages mais stimule ces échanges lorsque les cellules sont exposées à l'estrogène (détails Table V).

Chapitre 6. Discussion

6.1 Avantages de notre substrat de recombinaison

Il est établi dans une grande variété d'organismes, que deux gènes ou plus, transcriptionnellement actifs et liés en *cis* peuvent se réprimer mutuellement par un phénomène nommé 'interférence transcriptionnelle' ou 'suppression de promoteurs'. L'interférence/suppression survient au niveau de la transcription, agit en *cis*, est épigénétique, héréditaire et peut être associée à une modification de la structure de la chromatine (405, 406). Puisque notre système repose sur la reconstitution d'un marqueur de sélection fonctionnel (*Puro*) pour mesurer les différents mécanismes de RH, l'expression efficace de ce gène rapporteur est aussi essentielle que l'événement d'échange d'informations génétiques en soi. Effectivement, le mécanisme d'interférence/suppression a été à l'origine d'une controverse quant à la fonction de p53 dans la régulation de la RH. L'utilisation d'essais intra-chromosomiques a mené à la conclusion que p53 réprimait la RH (407) alors qu'il n'aurait aucun effet sur la recombinaison extra-chromosomique (408-410), les SCE (410, 411) ou la RH méiotique (412). Il a par la suite été démontré par notre laboratoire que la fonction de p53 n'affecte pas la RH lorsque mesurée à l'aide d'un rapporteur capable d'échapper à l'interférence/suppression (Annexe II). Puisque BRCA1 et BRCA2 affecte à la fois la transcription et le remodelage de la chromatine, l'utilisation d'un rapporteur capable d'éviter l'interférence/suppression était nécessaire.

Ce phénomène survient principalement lorsque les unités transcriptionnelles sont disposées tête à queue et peut donc être diminuée par un arrangement tête à tête ou queue à queue, par l'introduction de frontières transcriptionnelles et par l'utilisation de promoteurs différents (405, 406). Nous avons donc placé nos marqueurs principaux dans une orientation convergente, l'un sous le contrôle du promoteur fort phosphoglycérate kinase (PGK) et l'autre sous le contrôle du promoteur de la thymidine kinase du virus de l'herpès simplex (*HSV-tk*). Il a été déterminé que ce type de substrat ne subit pas d'interférence/suppression (Annexe II). Cet essai nous permet également de mesurer l'effet de l'expression de diverses

protéines sur les différents mécanismes de recombinaison, à l'exception du NHEJ, dans une même lignée cellulaire tout en éliminant l'effet de position.

6.2 Objectif 1 : Déterminer comment les cellules BRCA1-déficientes accumulent des réarrangements chromosomiques

Le BRCA1 humain est très différent du BRCA1 murin et BRCA1 peut affecter la régulation de la RH à plusieurs niveaux. Effectivement, BRCA1 pourrait contrôler l'activité de RAD51 via son interaction avec BRCA2 ou avec la kinase c-ABL qui a la capacité de phosphoryler RAD51. De plus, BRCA1 peut contrôler l'activité du complexe MRN et ainsi moduler la taille de l'ADN simple brin généré, un substrat essentiel à RAD51. L'ADN simple brin est également un substrat essentiel au mécanisme de SSA, un procédé RAD51-indépendant. Nous avons voulu mesurer l'effet de BRCA1 sur l'un et l'autre de ces mécanismes afin de mieux comprendre à quel niveau BRCA1 affecte la régulation de la RH chez l'humain. Si BRCA1 affecte directement ou indirectement RAD51, il aura un effet marqué sur la RH RAD51-dépendante et très peu d'effet sur le SSA. Toutefois, si BRCA1 affecte la réparation de la CDB en modulant la taille de l'ADN simple brin via son action sur le complexe MRN, BRCA1 affectera la RH RAD51-dépendante et le SSA.

Afin de mieux comprendre le rôle de BRCA1, nous avons utilisé une lignée cellulaire de carcinome du sein humain, déficiente en BRCA1, les HCC1937 (413). Cette lignée cellulaire est dérivée d'un patient hétérozygote pour une mutation dans *BRCA1* (*5382insC*) et démontre une perte d'hétérozygotie due à une délétion allélique. L'allèle mutant de BRCA1 est exprimé à un très faible niveau (413), avec une localisation cytoplasmique plus marquée que le BRCA1 sauvage, situation corrigée par la surexpression de BARD1, avec lequel il a conservé la capacité d'interagir. Ce mutant serait également dans l'incapacité de former des foci suite à l'induction de dommages à l'ADN (414, 415). De plus, il a été démontré que cette lignée cellulaire démontre des signes d'instabilité génomique comme de l'aneuploïdie et la perte de plusieurs loci impliqués dans le cancer, incluant p53 (413). Les HCC1937 sont également hyper-sensibles aux RI et démontrent une

défectuosité dans la réparation de CDB qui peut être restaurée par l'expression d'un BRCA1 exogène fonctionnel mais non d'un mutant impliqué dans la carcinogénèse (70). Nous avons donc utilisé un substrat de recombinaison plasmidique, que nous avons intégré dans le génome de ces cellules. Par la suite nous avons complémenté ou non ces cellules pour l'expression de BRCA1 et évalué le rôle de ce suppresseur de tumeur dans la régulation de la RH. Notre essai est basé sur l'utilisation de séquences homologues en répétitions directes qui peuvent se recombiner en absence de dommages exogènes ou suite à l'induction d'une CDB par l'endonucléase *I-SceI* et ainsi reconstituer un marqueur de sélection fonctionnel. Cet essai avait déjà été utilisé avec succès pour évaluer l'impact d'autres tumeurs suppresseurs sur la RH (Annexes II et III).

À l'aide de ce système modèle, nous avons établi que BRCA1 non seulement favorise la réparation d'une CDB principalement par RH RAD51-dépendante mais aussi RAD51-indépendante et qu'il supprime la RH en absence de dommages exogènes. Ces observations suggèrent que BRCA1 régule la RH en fonction du type de dommage. Nous avons également observé que BRCA1 supprime le SCRS, ce qui suggère un rôle dans l'alignement des chromatides sœurs et/ou leur cohésion. En parallèle, nous avons rapporté des résultats similaires concernant BRCA2 (Annexe III), ce qui suggère que BRCA1 et BRCA2 travaillent de concert pour maintenir la stabilité du génome via la régulation de la RH.

6.2.1 Implication de BRCA1 et BRCA2 dans la réparation des CDB

À l'aide de cet essai de recombinaison nous avons confirmé, chez l'humain, le défaut dans la réparation des CDB par RH présent dans les cellules de souris BRCA1/2-déficientes (56, 61). Chez l'humain, la réexpression de BRCA1 entraîne une augmentation de la réparation des CDB, comme pour BRCA2. Cette augmentation de la réparation s'effectue par SSA et par CG mais avec une plus grande proportion de CG. Cette observation suggère que BRCA1, comme BRCA2, aurait la capacité de réguler directement la RH RAD51-dépendante. De plus, elle est en accord avec l'hyper-sensibilité aux agents capables d'induire des CDB des cellules BRCA-déficientes et avec la défectoriosité observée dans la voie de réponse.

aux dommages à l'ADN (59, 64, 302). Plusieurs observations peuvent expliquer l'effet de BRCA1/2 sur la RH RAD51-dépendante. Comme nous en avons discuté au préalable, BRCA2 lie directement RAD51 en plus d'affecter sa localisation nucléaire en réponse aux dommages à l'ADN (416). Toutefois, certains mutants qui ont conservé la capacité de lier RAD51 et de se localiser au noyau, présentent des défauts dans la réparation des CDB par RH (56), ce qui suggère un mode de régulation plus subtile. Effectivement la voie de réponse aux dommages à l'ADN pourrait affecter la nature de la liaison entre BRCA2 et RAD51 ou encore, BRCA2 pourrait réguler l'activation de RAD51 via leur interaction réciproque (voir section 1.4.1.8). Quant à BRCA1, la majorité ne colocalise pas avec RAD51 et BRCA2 durant la phase S ou suite à l'induction de dommages à l'ADN (54). Toutefois, BRCA1 interagit directement avec le complexe MRN qui est impliqué dans l'apprêtement des bouts d'ADN double brin en extrémités simple brin. Il est donc possible qu'une partie du rôle de BRCA1 sur la RH RAD51-dépendante passe par la régulation de MRN pour la production du substrat essentiel à RAD51. Cette interaction expliquerait également l'importance de BRCA1 sur le SSA. Puisque la production d'extrémités simple brin est une étape commune à l'événement de CG et de SSA, une implication de BRCA1 à cette étape devrait se refléter par un changement similaire dans l'efficacité de ces deux mécanismes. Toutefois, l'influence plus grande de BRCA1 sur la CG que sur le SSA suggère un rôle additionnel dans l'activation de RAD51. Comme nous l'avons déjà mentionné, BRCA1 pourrait affecter RAD51 via son interaction avec BRCA2 mais aussi via la régulation de c-ABL. Le mode de régulation de RAD51 par BRCA1 demeure malgré tout encore incertain et plutôt relié à une cascade de signalisation qu'à une interaction directe.

L'utilisation d'un substrat de recombinaison basé sur l'induction d'une CDB site-spécifique basé sur l'endonucléase *I-SceI* soulève certaines questions. L'efficacité de cette technique de mesure repose sur la coupure adéquate du substrat par l'enzyme. Il est reconnu que le degré de compaction de la chromatine pourrait affecter l'efficacité de coupure de *I-SceI*. De plus, nous savons que BRCA1/2 jouent un rôle dans le remodelage de la chromatine. Il est donc raisonnable de

penser que l'expression de BRCA1/2 aurait pu affecter l'induction de la CDB au lieu de sa réparation par RH. Toutefois, nos résultats démontrent qu'en absence de BRCA1, comme de BRCA2, on observe une augmentation du nombre d'événements de SSA. Cette augmentation nous révèle que la diminution de CG ne peut être attribuable à un défaut dans l'induction de la CDB auquel cas nous aurions dû observer une diminution de tous les mécanismes de réparation de la CDB. Nos résultats nous ont donc permis de confirmer l'efficacité de notre approche expérimentale.

Finalement, BRCA1 stimule la réparation des CDB par SSA et par RH mais il s'agit de la première évidence soulignant l'importance de BRCA1 dans l'activation de RAD51 afin de favoriser la réparation précise du dommage.

6.2.2 Importance de l'hyper-recombinaison dans le processus de carcinogenèse

Les CDB constituent le dommage le plus dangereux pour une cellule, compte tenu de l'absence de matrice intacte pour effectuer une réparation sans erreur. La présence d'une CDB non réparée entraîne l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose (417). On peut alors supposer que dans les cellules BRCA1- et BRCA2-déficientes, la défectuosité dans la réparation d'une telle lésion tuerait la cellule qui possède toujours ses mécanismes de contrôle du cycle cellulaire et d'apoptose. Cette observation est en accord avec la létalité embryonnaire associée à ces deux suppresseurs de tumeurs et déjà reliée à une activation des points de contrôle du cycle cellulaire comme une augmentation de p53 et de p21 (37, 45). De plus, les cellules BRCA1/2-déficientes démontrent des capacités différentes à réparer les CDB (les cellules BRCA2-déficientes ont une défectuosité dans la RH, non dans le NHEJ et le SSA est très présent alors que dans les cellules BRCA1-déficientes, tous ces mécanismes semblent affectés) alors qu'elles présentent des anomalies chromosomiques similaires. Ces observations nous amènent donc à proposer que l'instabilité génomique observée dans les cellules BRCA1/2-déficientes reposerait plutôt sur un autre mécanisme que la défectuosité dans la réparation des CDB. Effectivement, nous avons observé un phénotype d'hyper-recombinaison en

absence de dommages exogènes autant dans les cellules BRCA1- que BRCA2-déficientes. L'hyper-recombinaison aurait le potentiel d'induire de l'instabilité génomique à différents niveaux alors que le défaut de réparation des CDB tuerait la cellule et devrait conséquemment éliminer les cellules instables, capables d'initier la carcinogenèse.

L'hyper-recombinaison pourrait être à la base des réarrangements chromosomiques observés dans les cellules déficientes en BRCA1/2 compte tenu des risques associés à la RH (voir section 1.4.1.5). Une augmentation de la RH aurait donc la capacité de favoriser l'accumulation de déficiences génétiques, par exemple l'activation d'oncogènes, la délétion de suppresseurs de tumeurs, l'inactivation de gènes impliqués dans l'apoptose ou le contrôle du cycle cellulaire, malgré la présence de points de contrôle du cycle cellulaire fonctionnels. Ces déficiences pourraient par la suite permettre aux cellules ayant subi une CDB de survivre et de surpasser l'arrêt du cycle cellulaire malgré le déficit dans la réparation d'une telle lésion, ce qui aurait pour conséquence d'accélérer le processus de carcinogenèse en favorisant l'accumulation d'autres anomalies incluant l'aneuploïdie. Nous proposons donc que l'hyper-recombinaison serait l'événement initiateur de l'instabilité observée dans les cellules BRCA négatives et que cette instabilité serait accentuée par un défaut dans la réparation des CDB auxquelles les cellules auraient acquis la capacité de survivre (Figure 17). Ce modèle expliquerait comment les cellules déficientes en BRCA1 ou BRCA2 pourraient accumuler de l'instabilité génomique.

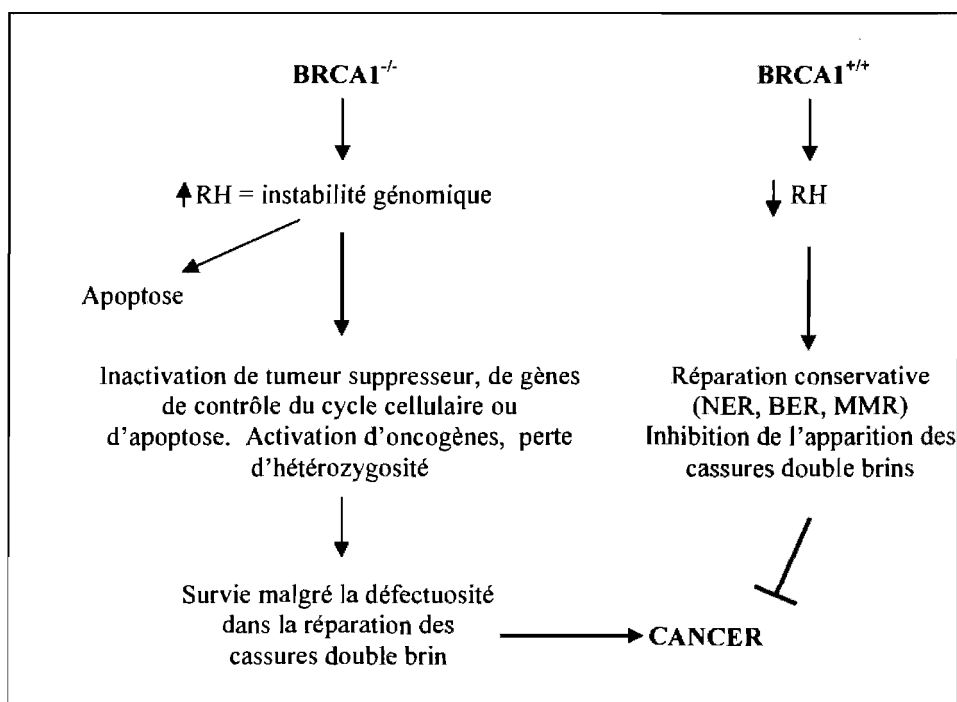


Figure 17. Modèle d'initiation de la carcinogénèse. BRCA1 diminue le niveau de recombinaison homologue (RH) en absence de dommages exogènes, ce qui favorise le maintien de la stabilité du génome. En absence de BRCA1, l'augmentation du niveau de RH spontanée entraîne de l'instabilité génomique qui normalement se traduira par l'induction de l'apoptose. Dans certains cas, l'instabilité peut entraîner l'accumulation d'anomalies chromosomiques qui vont par la suite éliminer les mécanismes de contrôle de la cellule et ainsi favoriser l'accumulation d'encore plus d'anomalies pour ultimement conduire à l'apparition du cancer.

Cette hypothèse permet de mieux comprendre les anomalies chromosomiques observées dans ces cellules. Effectivement, les cellules BRCA1/2-déficientes montrent non seulement des bris chromosomiques qui pourraient être le résultat d'un défaut dans la réparation des CDB mais aussi des chromosomes quadriradiaux (dicentriques), triradiaux (formés par des quadriradiaux instables), des translocations, des délétions, des duplications et de l'aneuploïdie (résultat d'un défaut lors de la ségrégation des chromosomes qui peut s'expliquer par les chromosomes acentriques et dicentriques). Ces anomalies peuvent être mieux expliquées par une hyper-recombinaison et notamment lorsque

les chromatides sœurs sont mal alignées plutôt que par un déficit dans la réparation des CDB. En résumé, malgré le rôle primordial de la RH dans le maintien de la stabilité du génome et le fait que ce mécanisme est habituellement considéré comme étant conservatif, la RH agit comme un couteau à double tranchant et pourrait engendrer des réarrangements chromosomiques, des pertes d'hétérozygotie ou l'activation de proto-oncogène.

On peut supposer que la chronologie des événements lors de l'initiation de la carcinogénèse est primordiale. Dans les individus hétérozygotes, un statut qui n'est pas létal comparativement au double mutant, le second événement dans la tumorigénèse pourrait impliquer l'inactivation de gènes de contrôle du cycle cellulaire plutôt que la perte du deuxième allèle de BRCA, pour permettre éventuellement la survie lors de la perte d'hétérozygotie. Effectivement, une étude sur la séquence d'événements impliqués dans la progression tumorale pancréatique dans des cellules BRCA2-déficientes, révèle que l'inactivation du second allèle de BRCA2 est un événement tardif, qui survient tard dans la progression de la malignité, ce qui vient supporter cette hypothèse (418). De plus, quoique les modèles de souris ne soient pas très informatifs vu l'absence de prédisposition au développement tumoral démontré par les hétérozygotes, certaines études ont démontré que la mutation de p53, un gène très important dans le contrôle du cycle cellulaire et l'apoptose, souvent muté dans les cancers reliés à BRCA1/2, accélère la progression tumorale, ce qui suggère encore une fois que la mutation de gènes impliqués dans le contrôle du cycle cellulaire serait primordiale pour le développement tumoral initial, mutations qui peuvent être favorisées par un processus d'hyper-recombinaison.

Il est important toutefois de mentionner que l'hyper-recombinaison observée autant dans les cellules humaines BRCA1- que BRCA2-déficientes (419-421) et dans les cellules de hamster BRCA2-déficientes (198), n'a pas été rapportée par les études utilisant les cellules de souris. Cette dissension pourrait s'expliquer par une différence dans l'essai utilisé mais aussi par une distinction entre les espèces. En effet, les cellules humaines ou de hamsters BRCA1-, BRCA2-déficientes sont soit exemptes de protéine, la protéine est incapable de se localiser au noyau ou l'allèle

mutant est très faiblement exprimé. Par contraste, les études chez la souris reposent sur l'utilisation de mutants hypomorphes, exprimés à des niveaux nucléaires normaux. Ces mutants hypomorphes peuvent conserver des interactions protéiques et par conséquent séquestrer certains composants essentiels à la RH ou encore conserver certaines fonctions, ce qui aurait pour conséquence de masquer le phénotype d'hyper-recombinaison spontanée. Il est également important de noter que les souris hétérozygotes ne démontrent pas de prédisposition à la carcinogenèse, ce qui pourrait constituer une évidence supplémentaire confirmant que l'hyper-recombinaison serait à la base de l'instabilité génomique.

L'hyper-recombinaison spontanée est observée dans divers syndromes associés aux cancers tels que l'ataxie télangiectasie, le syndrome de Bloom et l'anémie de Fanconi. Ces syndromes démontrent tous des anomalies chromosomiques identiques à celles retrouvées dans les cellules BRCA1/2-déficientes (422). Dans les cellules BLM-déficientes on observe une augmentation de la RH spontanée. Toutefois, le mécanisme sous-jacent à l'hyper-recombinaison associée au syndrome de Bloom semble être différent de celui associé à une déficience dans BRCA1 et BRCA2 (423). Effectivement, il a été démontré qu'une mutation de BLM entraîne une augmentation de SCE (424). De plus, il est impliqué dans la résolution de la jonction de Holliday vers la CG au détriment des CO (425) et dans la terminaison adéquate de l'événement de recombinaison pour éviter d'avoir recours au NHEJ (426). Ces cellules déficientes, en plus du phénotype d'hyper-recombinaison, peuvent accumuler des réarrangements chromosomiques lors de la réparation des CDB alors que nos résultats indiquent que BRCA1 et BRCA2 n'affectent pas la résolution de la jonction de Holliday puisque les CO ne sont pas affectés et que la terminaison se produit de façon adéquate pour qu'on observe la reconstitution d'un gène de résistance fonctionnel avec un très haut rendement spontané. L'utilisation du NHEJ pour terminer la CG se caractérise habituellement par un réarrangement de l'une des deux jonctions (Annexe I), ce qui n'est pas observé dans notre système. De plus, un défaut dans BRCA1, BRCA2, ATM et FANCD1, entraîne une diminution ou au moins un niveau normal de SCE contrairement à BLM (427). Ces observations sont donc plus

consistantes avec un défaut dans la régulation de la RH chez les cellules BRCA1/2-déficientes qu'avec un défaut dans la résolution de l'intermédiaire de recombinaison.

6.2.3 Quel type de dommage induit l'hyper-recombinaison ?

Puisque les cellules BRCA1/2-déficientes démontrent une défectuosité dans la réparation des CDB, l'hyper-recombinaison observée dans ces mêmes cellules doit forcément être engendrée par un autre type de lésion. BRCA1 et BRCA2 ont tous deux été reliés à la réactivation par RH des fourches de réplication arrêtées. Il s'agirait de la principale utilité de la RH mitotique, compte tenu du faible niveau de CDB endogène (428). Lorsque la fourche de réplication rencontre un dommage à l'ADN, l'hélicase chargée de l'ouverture de la chromatine poursuit son chemin alors que la polymérase est ralentie ou même arrêtée. Cette séparation, entraîne la formation d'ADN simple brin qui sera recouvert par RPA et qui activera donc les points de contrôle du cycle cellulaire via ATR (429). À cette étape, il est nécessaire de stabiliser la fourche de réplication afin d'éviter son démantèlement en CDB. La stabilisation de la fourche de réplication se fait en stabilisant l'association de la machinerie de réplication avec la fourche et en restreignant l'activité de recombinaison, actions qui nécessitent l'activation du point de contrôle du cycle cellulaire ATR-dépendant (430-432). Il est déjà établi que la présence de BRCA2 stabilise la fourche de réplication et évite son démantèlement en CDB (184). En revanche, la RH joue un rôle important dans la réparation des CDB engendrées par le démantèlement d'une fourche (433). En accord avec ces observations, les foci RAD52, marqueurs de RH, ne sont pas retrouvés suite aux traitements avec l'hydroxyurée, sauf en absence de points de contrôle du cycle cellulaire et donc en présence de fourches de réplication démantelées (434, 435). La présence de ces points de contrôle du cycle cellulaire est donc nécessaire afin de stabiliser la fourche de réplication et ainsi inhiber la RH. Il est donc probable qu'un déficit dans la stabilisation des fourches de réplication dû à l'activation inadéquate des points de contrôle du cycle cellulaire soit à l'origine de l'hyper-recombinaison observée puisque BRCA1 est essentiel à l'activation d'ATR, la kinase à la tête de

ces voies de signalisation (Figure 18)(159). Dans une telle situation, les dommages à l'ADN rencontrés par la fourche de réplication entraîneraient son démantèlement en CDB et stimulerait la RH.

BRCA1 et BRCA2 ont également été associés aux autres types de réparation. Il est reconnu que p53 favorise le NER via son rôle d'activateur transcriptionnel et de modificateur de l'accessibilité de la chromatine (436, 437). Compte tenu de son interaction avec p53, de son implication dans le contrôle de la transcription p53-dépendante et de son rôle dans le remodelage de la chromatine, BRCA1 pourrait affecter le NER indirectement. De plus, BRCA1 et BRCA2 favorisent directement l'activité du NER (438, 439) et BRCA1 active transcriptionnellement, de façon p53-indépendante, l'expression des gènes XPC, XPE, DDB2 et GADD45 (440, 441). Ces résultats sont en accord avec la nécessité de la restauration de l'expression de BRCA1 en plus de p53 dans les HCC1937 pour effectuer la réparation adéquate des dimères de pyrimidines engendrés lors d'une exposition aux UV et souligne l'importance de BRCA1 dans le NER (441). BRCA1 n'est toutefois pas essentiel au NER mais pourrait être un composant stimulant l'activité de ce mécanisme de réparation. De plus, BRCA1 et BRCA2 interagissent avec RPA qui a été associé au NER (442) et à la majorité des mécanismes de réparation basés sur la présence d'ADN simple brin à l'une ou l'autre des étapes de réparation. Un déficit en BRCA2 entraîne également une réduction de l'activité DNA ligase lors de la réparation par BER (443). Une mutation dans BRCA1 ou BRCA2 entraîne l'hyper-sensibilité à des agents alkylants tel que le méthyle méthane sulfonate qui repose sur le BER pour effectuer une réparation adéquate des lésions engendrées (444, 445). Ces mêmes cellules sont également sensibles aux UV qui nécessitent un processus de NER fonctionnel pour effectuer la réparation (441, 445). Finalement, BRCA1 interagit directement avec MSH2, un composant du MMR (446) et colocalise avec MSH6 dans le BASC (57). Il est donc probable que la présence de BRCA1 et BRCA2 soit nécessaire afin de limiter la RH aux lésions qui ont le potentiel d'être réparées par un mécanisme plus conservatif et donc plus approprié, en plus de stimuler l'activité de ces mécanismes. Il est également possible que BRCA1 et BRCA2 soient nécessaires afin de limiter l'apparition de

CDB lors de la réplication en stimulant la réparation des diverses lésions avant le passage de la fourche de réplication ou en stabilisant la fourche pour éviter que ces lésions ne se transforment en CDB (Figure 18). Dans l'un ou l'autre des scénarios, la présence de BRCA1/2 est nécessaire afin de limiter l'utilisation de la RH pour favoriser le maintien de la stabilité du génome.

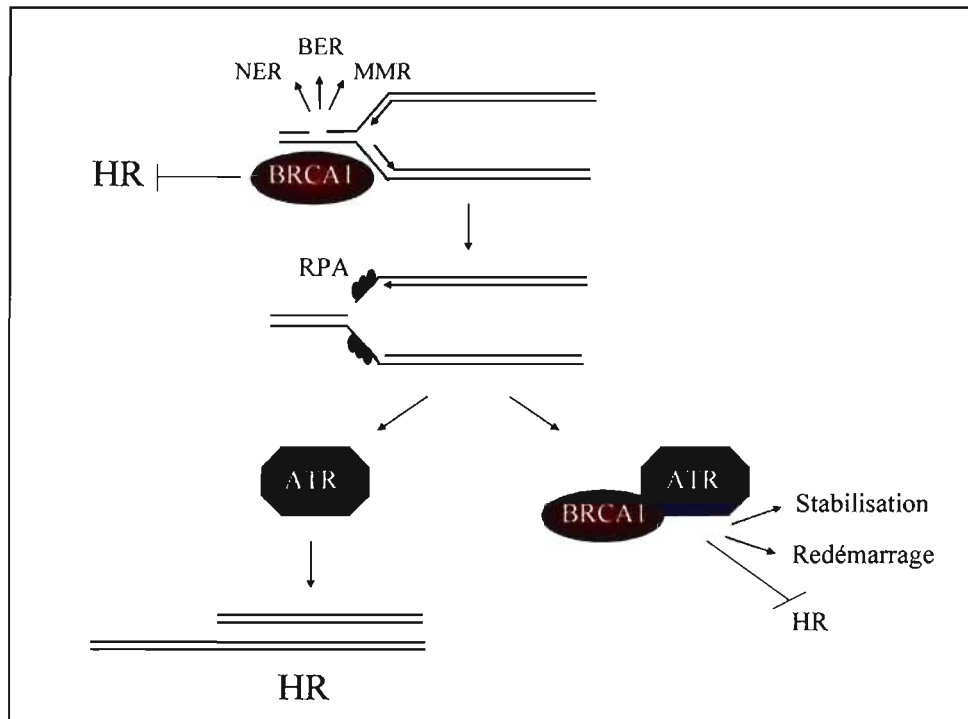


Figure 18. Modèle de régulation de la recombinaison homologue spontanée par BRCA1. BRCA1 pourrait promouvoir la réparation des lésions à l'ADN en stimulant les différents mécanismes de réparation appropriés tels que : la réparation par excision de nucléotide (NER), la réparation par excision de base (BER) et la réparation de base mal appariée (MMR). De plus, BRCA1 peut stimuler l'activation d'ATR lorsque la fourche rencontre un obstacle. L'activation d'ATR et des points de contrôle du cycle cellulaire est essentielle à la stabilisation de la fourche de réplication, un processus qui nécessite l'inhibition de la recombinaison homologue (HR). Dans ce scénario, l'absence de BRCA1 entraîne une augmentation du nombre d'arrêt de la fourche de réplication et un défaut de l'activation des points de contrôle du cycle cellulaire ayant pour conséquence le démantèlement de la fourche de réplication. Ce démantèlement produit une cassure double brin qui pourra stimuler la HR.

Une autre hypothèse quant à la source de l'hyper-recombinaison semble émerger depuis la découverte du rôle de BRCA1 dans la décaténation. En conséquence du processus répliatif de l'ADN en double hélice, lorsque des fourches de réplication adjacentes se rencontrent, les chromatides sœurs seront enchevêtrées. Cet enchevêtrement inter-molécules ou caténation, est différent du «supercoiled» qui constitue un surenroulement intramoléculaire, et repose sur la TopoII pour démêler les duplexes d'ADN. Il est essentiel de procéder à la séparation des chromatides sœurs (décaténation) avant la métaphase afin que la ségrégation des chromosomes s'effectue correctement. BRCA1 est un élément clé du processus de décaténation, probablement via son activité ubiquitine-ligase puisque la poly-ubiquitination de la TopoII accroît son activité (447). De plus, suite à une caténation soutenue des chromatides sœurs due à un traitement avec l'inhibiteur de TopoII ICRF-193, l'arrêt du cycle cellulaire en G₂ (point de contrôle de décaténation) repose sur l'activation d'ATR, une kinase qui est activée par BRCA1 et qui a la capacité de le phosphoryler en retour (448). Ce même type d'inhibiteur qui n'induit pas directement de CDB stimule la RH (449, 450). Il est probable que, lors de la ségrégation des chromosomes en absence de BRCA1, il y ait bris chromosomique dû à ce défaut dans la décaténation. Ces bris chromosomiques auraient pour effet de stimuler la RH. Il est donc possible qu'un défaut dans la décaténation des chromatides, observé dans les cellules déficientes en BRCA1, entraîne le phénotype d'hyper-recombinaison, en plus d'expliquer l'aneuploïdie, la perte et le gain de fragment de chromosomes ou de chromosomes entiers (Figure 19)(451).

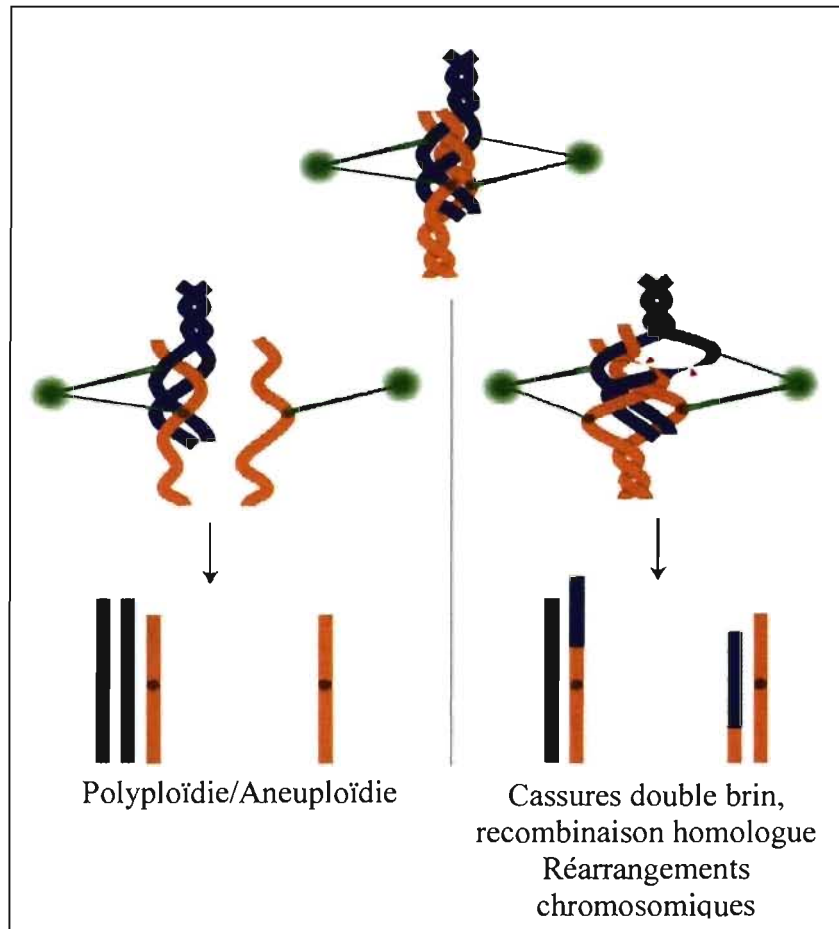


Figure 19. Anormalités chromosomiques reliées à un défaut dans le processus de décaténation. L'enchevêtrement ou caténation des chromatides sœurs peut perturber la ségrégation adéquate des chromosomes. Dans certains cas il peut conduire à la délétion ou à la duplication de chromosomes entiers. Dans d'autres cas, il peut induire des bris chromosomiques qui favoriseront la RH et les réarrangements. (Modifié de 452)

6.2.4 Régulation de la RH en fonction du type de dommage

Suite à l'introduction de dommages à l'ADN, deux principales kinases orchestrent la réponse cellulaire, ATM et ATR. Alors qu'ATR est activée par l'ADN simple brin recouvert par RPA et les agents induisant des arrêts de la fourche de réplication, ATM est plutôt activée par les CDB. L'activation de ces kinases influencera le cycle cellulaire, la réparation de l'ADN et l'apoptose, afin de maintenir la stabilité du génome. Il serait légitime de penser que la cascade de

signalisation engendrée par l'activation de ces deux kinases soit à l'origine de l'effet contradictoire de promotion et d'inhibition de la RH en fonction du type de dommage. Effectivement, il a été démontré que suite à une exposition aux RI ou aux UV, la réponse cellulaire enclenchée par ces kinases est différente. Suivant les RI, la phosphorylation de CHK1, CHK2, et p53 nécessite la présence des deux kinases alors que, suite aux UV, CHK1 et p53 seront phosphorylés par ATR et CHK2 sera phosphorylé par ATM (453). La présence de BRCA1 favorisera la phosphorylation de ces substrats en fonction du type de dommage puisqu'il contribue à l'activation de ces deux kinases (159). De plus, BRCA1 est phosphorylé par ces kinases sur des sites distincts et d'autres se chevauchant, ce qui suggère une réponse différente en fonction du type de dommage. Il est également établi que suite à une exposition aux RI, ATM a la capacité de phosphoryler c-ABL (454) et que cette phosphorylation inhibe son interaction avec BRCA1 (165). L'activation de c-ABL par phosphorylation et sa séparation de BRCA1 entraînent la phosphorylation de RAD51 et la formation de foci suite à l'induction de CDB. Cette phosphorylation peut soit activer RAD51 *in vivo* (455), ou l'inhiber *in vitro* (166). Dans les cellules BRCA1-déficientes, on observe une activation constitutive de c-ABL qui n'est pas affectée par l'exposition aux RI (165). Il est donc possible que BRCA1 régule la fonction de RAD51 en fonction du type de dommage via son contrôle de l'activation de c-ABL. Il est également possible que BRCA2, vu sa liaison à plusieurs molécules de RAD51, protège RAD51 de la phosphorylation induite par c-ABL dans certaines conditions ou active la forme phosphorylée de RAD51 (voir modèle Annexe III Figure 3). Selon ces hypothèses, BRCA1 et BRCA2 coordonnent la signalisation des différents dommages à l'ADN avec le choix de leurs mécanismes de réparation et stimulent ou inhibent ainsi la RH en fonction du type de dommage.

RPA est une protéine essentielle à divers processus biologiques de base tels que la réplication et la réparation de l'ADN par RH ou NER. L'association de RPA avec l'ADN simple brin active ATR. En retour, RPA est phosphorylé par ATR et CHK1, ce qui modifie son aptitude à lier l'ADN (456, 457). Alors que l'interaction de BRCA2 avec ATR est plus qu'incertaine, BRCA1 interagit directement avec

cette kinase et régule l'activité de CHK1. De plus, RPA interagit avec MRE11, BRCA2 et BLM (192, 458, 459) qui colocalisent tous avec BRCA1 et une mutation de RPA cause de l'instabilité génomique et le cancer (460). Il est donc possible que BRCA1 et BRCA2 régulent la RH via leur interaction avec RPA, un élément essentiel à ce mécanisme de réparation ainsi qu'à d'autres processus cellulaires nécessaires au maintien de la stabilité du génome.

La présence de BRCA2 est nécessaire à la formation de foci RAD51 suite à l'induction de dommages à l'ADN. Il est donc possible que BRCA2 régule la localisation cellulaire de RAD51 en fonction du type de dommage ou du cycle cellulaire. BRCA2 séquestrerait RAD51 lors du métabolisme normal de la cellule et l'empêcherait de se rendre aux dommages autres que les CDB, favorisant ainsi l'accessibilité aux facteurs de réparation appartenant à d'autres mécanismes. Par contre, en présence de CDB, BRCA2 pourrait accompagner ou libérer RAD51 afin que celui-ci se rende aux sites de dommages, ce qui stimulerait la RH. Encore une fois, la coordination de la localisation cellulaire de RAD51 en fonction du type de dommage reposerait sur les voies de signalisation de ces dommages.

Comme nous l'avons mentionné, les CDB ne sont vraisemblablement pas à la base de l'hyper-recombinaison spontanée puisque les cellules BRCA1/2-déficientes montrent une défectuosité dans leur réparation. Les autres types de lésions, qui ont ultimement le potentiel de se transformer en CDB s'ils rencontrent la fourche de réplication, devraient reposer sur le MMR, le NER, le BER et le SSBR pour être réparées. Une étape commune à tous ces mécanismes de réparation est la transition par une CSB où il y aura resynthèse à partir du brin homologue et ligation. Cet événement constitue le SSBR. Dans la majorité des cas, le gap engendré ne comprend qu'un seul nucléotide et donc implique la synthèse d'un seul nucléotide mais dans certains cas il y aura synthèse plus longue et il y aura déplacement de l'extrémité opposée à la synthèse, ce qui conduira à la production d'une extrémité d'ADN simple brin non appariée qui devra être clivée. Le clivage s'effectue principalement par FEN-1 et XRCC1 en étant stimulé par PCNA (Figure 20)(461). La branche d'ADN simple brin générée lors de l'événement de SSBR constitue un substrat tout indiqué pour RAD51 et par conséquent, la réparation d'une CSB

pourrait stimuler la RH (Figure 20). Effectivement, il est démontré qu'un déficit en FEN-1 entraîne une augmentation de la RH méiotique chez la levure (462) et de l'instabilité aux sites d'ADN répétitifs (463). Il est également démontré, entre autre par notre laboratoire, que la présence de MSH2 et MSH3 est nécessaire pour le clivage de ces branches d'ADN simple brin non homologues, en stabilisant l'intermédiaire (464)(Annexe I). Puisque BRCA1 et BRCA2 colocalisent avec PCNA, lient l'ADN sous différentes formes (171, 193) et que BRCA1 est retrouvé dans le complexe BASC en compagnie de MSH2, il est possible que BRCA1 et BRCA2 affectent le clivage de la branche d'ADN simple brin et donc inhibe la RH à d'autres lésions que les CDB en contribuant à éliminer le substrat de RAD51.

Cette hypothèse est d'autant plus intéressante qu'elle pourrait contribuer à expliquer le rôle de BRCA1 dans la stimulation de la RH suite à l'induction d'une CDB. Effectivement, le clivage des branches d'ADN simple brin fait partie intégrante du processus de RH. Lors de l'événement de RH, la taille et la nature de la séquence copiée par la molécule receveuse peut varier. Le maintien de la stabilité du génome nécessite une terminaison précise des événements de CG. Une terminaison imprécise implique que la CG est interrompue à divers stades et que la réparation se termine par le NHEJ. Ainsi, la réparation peut se faire partiellement si la synthèse ne couvre pas toute la région à réparer ou entraîner l'acquisition de séquences pouvant s'étendre au-delà de la région d'homologie si la synthèse est trop longue (465, 466). Les protéines XRCC3 (467), MSH2 (Annexe I), BLM (426) et WRN (468) sont impliquées dans la terminaison précise des événements de CG. Lors de la CG, du CO et du SSA, si la synthèse s'étend au-delà de la région à réparer, lors de la terminaison de l'événement, il y aura une branche d'ADN à cliver. La présence de BRCA1, avec MSH2, pourrait s'avérer nécessaire afin de cliver cette branche d'ADN et de procéder à la terminaison adéquate de l'événement de RH pour ainsi favoriser la réparation précise d'une CDB par RH (Figure 20). Il a effectivement été démontré que la présence de MSH2 (Annexe I) et de FEN-1 stimule la RH précise induite par I-SceI, en clivant les branches d'ADN non-homologues (469). Ces observations suggèrent qu'effectivement, la régulation de la RH en fonction du type de dommages médiée par BRCA2 et

surtout BRCA1, pourrait s'effectuer via la stabilisation et/ou le clivage des branches d'ADN simple brin pour permettre la terminaison adéquate de l'événement de RH et inhiber l'hyper-recombinaison.

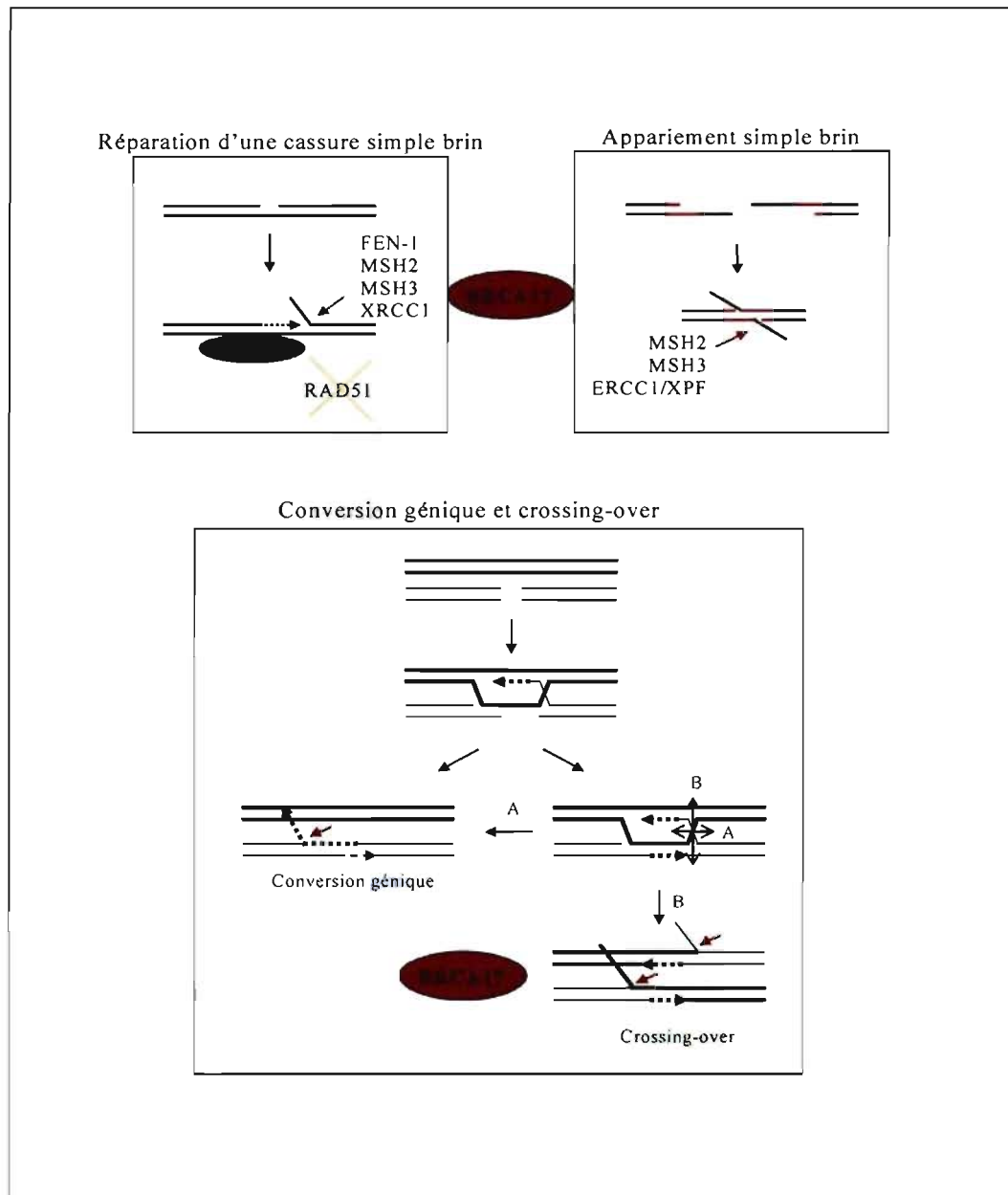


Figure 20. Importance du clivage des branches d'ADN simple brin. Modèle dans lequel BRCA1 pourrait inhiber la RH spontanée en clivant les branches d'ADN simple brin qui autrement pourraient constituer un substrat pour RAD51. Par contraste, BRCA1 pourrait stimuler l'appariement simple brin, la conversion génique et le crossing-over en clivant ces mêmes branches, ce qui faciliterait la terminaison adéquate de l'événement de recombinaison.

6.2.5 Implication de BRCA1 et BRCA2 dans la cohésion et son importance dans le maintien de la stabilité génomique

Nous avons observé une augmentation du niveau de RH spontanée dans les cellules BRCA1/2-déficientes. Cette augmentation correspond à une augmentation de la recombinaison RAD51-dépendante mais aussi RAD51-indépendante. Puisque les délétions sont rares en présence de séquences répétées inversées, incapables de faire du SCRS et que BRCA1/2 n'affectent pas la résolution de l'intermédiaire de recombinaison en CO, les délétions spontanées RAD51-indépendantes sont vraisemblablement le résultat d'une augmentation de SCRS. Ce type d'événement repose sur le glissement de la fourche de réplication et sera plus fréquent lorsque la cohésion entre les chromatides sœurs se relâche. L'effet de BRCA1/2 sur le SCRS suggère donc que ces protéines ont un rôle à jouer dans la cohésion et/ou l'alignement des chromatides sœurs. Comme nous l'avons déjà mentionné, la cascade des voies d'activation de la réponse aux dommages à l'ADN entraîne le recrutement du complexe de cohésine SMC aux sites de dommages marqués par H2AX phosphorylé. La présence de BRCA1 mais aussi de ses partenaires NBS1 et MRE11 est nécessaire à la phosphorylation de SMC1 par ATM pour stimuler la cohésion (470). Puisque BRCA2, tout comme BRCA1, colocalise avec l'histone H2AX phosphorylé, il est possible que leur présence stimule la cohésion et minimise ainsi les erreurs induites par la RH. De plus, les cohésines seront dissociées des chromosomes lors de la prophase, indépendamment d'un clivage protéolytique. Cette dissociation repose sur la phosphorylation des cohésines par PLK, ce qui entraîne une diminution d'affinité pour l'ADN (471). BRCA2 est un substrat de la kinase mitotique PLK1 durant la phase G₂/M, le moment où l'expression de PLK1 est maximale. La phosphorylation a lieu entre les différents motifs BRC et est inhibée par la présence de dommages à l'ADN (234, 235). De plus, BRCA1 aurait la capacité d'inhiber l'expression de l'ARNm de PLK1 (268), ce qui pourrait expliquer son rôle dans la stimulation de la cohésion. Il est donc possible qu'effectivement, BRCA1 comme BRCA2 puissent affecter la cohésion et ainsi avoir un impact direct sur la précision de la RH. Le SCRS peut produire des

réarrangements chromosomiques importants et est donc un élément clé à contrôler pour assurer le maintien de la stabilité du génome.

De plus, la cohésion est essentielle à la ségrégation ordonnée des chromosomes en maintenant les chromatides sœurs liées jusqu'à l'anaphase. Un déficit dans la cohésion entraîne une séparation prématurée des chromatides sœurs et de l'aneuploïdie (109, 472-474), l'aneuploïdie étant un mécanisme d'instabilité génomique courant dans le développement tumoral (475). Compte tenu de l'importance de BRCA1 dans l'activation du complexe de cohésine comprenant SMC1 (voir section 1.4.1.7), un défaut dans la cohésion pourrait expliquer l'aneuploïdie régulièrement observée dans les cellules BRCA1-déficientes (413, 476-478). Il a également été démontré que la présence SMC1 est nécessaire à la stabilisation des chiasmats lors de méiose pour stabiliser les sites d'échanges jusqu'à l'anaphase (472). Ces observations confirment donc que la fonction de BRCA1 dans le maintien de la stabilité du génome pourrait être due, du moins partiellement, à son implication dans la cohésion.

Finalement, il est établi que la présence des complexes SMC est particulièrement essentielle dans les régions à haute teneur en séquences répétitives. En effet, dans ces régions, les séquences répétitives pourraient compétitionner avec la chromatide sœur comme matrice pour la recombinaison. Une augmentation de l'instabilité génomique a été rapportée pour les mutants des complexes SMC au locus de l'ADN ribosomal (479, 480). Puisque le locus de BRCA1 et BRCA2 est constitué en grande partie de séquences répétitives, la diminution de cohésion dans cette région pourrait grandement favoriser la perte d'hétérozygotie qui s'effectue par RH (481).

6.3 Objectif 2 : Comment l'haploinsuffisance de BRCA1 affecte la stabilité génomique?

Jusqu'à présent, il demeure toujours incertain si les cellules BRCA1/2 hétérozygotes démontrent un phénotype pouvant accélérer la perte de l'allèle sauvage restant ou si cette inactivation a lieu de façon aléatoire. Il a effectivement été suggéré que la diminution dans la capacité de réparation de l'ADN pourrait être

la base de la prédisposition au cancer observée chez ces hétérozygotes. Toutefois, cette hypothèse s'est avérée difficile à démontrer puisque le modèle de souris est peu significatif, l'interférence à ARN difficilement applicable et la surexpression indésirable puisqu'elle pourrait affecter la stœchiométrie des interactions protéiques (voir section 1.6). Nous avons donc utilisé le modèle cellulaire des MCF-7. Dans cette lignée cellulaire, la présence d'un seul allèle de *BRCA1* induit une diminution d'expression au niveau de l'ARNm et de la protéine comparativement à des lignées cellulaires qui posséderaient deux allèles (HeLa, MCF-10a et T47D)(400, 401). Suite à l'introduction de nos substrats de recombinaison dans ce système cellulaire, nous avons été en mesure de déterminer l'effet du niveau d'expression de *BRCA1* sauvage et de la présence d'un mutant, pour une même lignée cellulaire ainsi que pour un même site d'intégration sans avoir recourt à la surexpression. Dans cette lignée, nous avons établi qu'une défectuosité dans la régulation de la RH est causée par une diminution d'expression de *BRCA1* mais non par la présence d'un mutant. Ces résultats semblent en accord avec la diminution d'expression de *BRCA1/2* observée dans une grande proportion de cancers sporadiques qui ne contiennent quasi aucun mutant de *BRCA1/2* et montrent que l'haploinsuffisance à elle seule pourrait être responsable de l'instabilité observée dans les MCF-7 et chez les hétérozygotes (47). De plus, l'haploinsuffisance a déjà été démontrée affectant la fonction d'autres suppresseurs de tumeur tel que p53 et p27 (482, 483).

Le mutant associé au cancer que nous avons utilisé (*BRCA1 5382insC*) semble s'exprimer de façon stable, autant dans les HCC1937 que dans les MCF-7 (484, 485) et n'affecte pas l'expression ou la stabilité du *BRCA1* sauvage endogène. Si tel avait été le cas, nous aurions observé un phénotype d'hyper-recombinaison spontanée et une défectuosité dans la réparation des CDB, des caractéristiques associées à un déficit en *BRCA1*. Cette observation confirme celle publiée par Fan *et al.*, selon laquelle l'expression de divers mutants n'affecte pas la stabilité du *BRCA1* sauvage (283). De plus, le mutant *BRCA1 5382insC* ne possède plus la fonction normale de *BRCA1* puisque l'augmentation de son expression devrait alors entraîner une modification des fréquences de RH aussi bien spontanée qu'induite par une CDB. Finalement, le mutant *BRCA1 5382insC* n'a

pas acquis de nouvelles fonctions, tout comme il ne joue pas non plus de rôle dominant négatif, à tout le moins pour ce qui est de la fonction de régulation de la RH. Effectivement, ce même mutant a déjà été associé à une diminution de l'apoptose induite par la privation de sérum (338), ce qui pourrait suggérer que les différents domaines de BRCA1 pourraient être impliqués dans une variété de fonctions. Cette hypothèse suggère donc que le domaine BRCT, muté dans le cas qui nous intéresse, aurait une fonction primordiale dans la régulation de la RH sans toutefois avoir un impact sur l'apoptose médiée par BRCA1.

Compte tenu de sa localisation majoritairement cytoplasmique, il aurait été tentant de spéculer que BRCA1 *5382insC* pourrait séquestrer son partenaire protéique, le suppresseur de tumeur BARD1. BRCA1 dimérise avec BARD1 via son domaine N-terminal et cette liaison stabilise les deux protéines, en plus de favoriser leur entrée au noyau (486). Cette interaction est maintenue dans le mutant BRCA1 *5382insC* (484). BARD1 colocalise avec BRCA2 et RAD51, et certaines évidences suggèrent qu'il participerait avec BRCA1 dans la réparation des CDB par RH (55, 487). Puisque cette fonction demeure intacte malgré l'expression de BRCA1 *5382insC*, on peut affirmer que ce mutant ne séquestre pas BARD1 et n'altère en rien sa fonction. Ceci nous amène à penser que, dans notre modèle hétérozygote, la quantité de BARD1 n'est pas limitante comparativement à celle de BRCA1 sauvage et que, malgré la présence d'un mutant liant BARD1 de façon non fonctionnelle, le BRCA1 sauvage conserve une quantité suffisante de partenaires pour continuer à effectuer sa fonction de régulation de la RH. Cette hypothèse pourrait également expliquer, dans une certaine proportion, les contradictions qu'on retrouve dans la littérature. Effectivement, certaines études ont démontré un rôle dominant négatif de mutants de BRCA1 dans l'apoptose, la transcription, la prolifération et la réparation de l'ADN (283, 334, 335, 488, 489). Selon les différents modèles utilisés dans ces études, le BRCA1 mutant est fortement surexprimé ou encore introduit dans une lignée cellulaire déjà normale pour BRCA1. Dans les deux cas, la présence de BRCA1 en excès pourrait affecter la stœchiométrie d'interaction entre le BRCA1 sauvage et ses différents partenaires protéiques, ce qui expliquerait la fonction dominante négative quelque fois

observée. Cette hypothèse est appuyée par le fait que la diminution d'expression de BARD1 ou de BRCA1 entraîne de l'instabilité génomique, la perte d'inhibition de contact et la modification phénotypique des glandes mammaires de souris (490, 491).

L'absence de phénotype observé lors de l'expression du mutant BRCA1 *5382insC* pourrait également être due à la perte d'interaction avec son partenaire BRCA2. BRCA2, qui interagit avec le domaine C-terminal de BRCA1, muté dans le BRCA1 *5382insC*, est bien connu pour être impliqué dans la régulation de la RH via le contrôle de RAD51. Toutefois, le phénotype associé à une défektivité de BRCA2 est similaire à celui relié à un déficit en BRCA1 et n'est pas observé lors de l'expression de notre BRCA1 mutant, ce qui nous porte à croire que la fonction de ces deux protéines endogène n'est pas affectée par la présence du mutant. Certains modèles suggèrent également une régulation de la RH effectuée par BRCA1 via le remodelage de la chromatine. L'absence d'effet du mutant BRCA1 *5382insC*, qui a perdu son domaine d'interaction avec les histones déacétylases 1 et 2, ainsi qu'avec l'hélicase BACH1 qui est aussi impliquée dans la RH, abonde dans cette direction. Nos résultats suggèrent donc que le domaine C-terminal de BRCA1, qui comprend les deux régions BRCT, serait essentiel à la régulation de la RH, ce qui n'est pas surprenant compte tenu de la multitude d'interactions protéiques qui dépendent de ce domaine et de son importance dans la formation de foci RAD51 et BRCA1 suite à l'induction de dommages à l'ADN (329). Il est de plus établi que la présence des BRCT est nécessaire à la phosphorylation de RAD51 suite à un traitement avec un agent pontant l'ADN (64, 329, 492). En lien direct avec ce raisonnement, on observe une inactivation du domaine C-terminal dans près de 90% des mutations naturelles de BRCA1, ce qui confirme l'importance de ce domaine et potentiellement de la régulation de la RH dans l'initiation de la carcinogénèse (225) (Breast Cancer Information Core [BIC]).

Nos résultats nous ont également permis d'établir que le niveau d'expression de BRCA1, et non la présence d'un mutant tronqué en C-terminal, affecte la chimiorésistance à l'agent pontant l'ADN mitomycin C. Chez la souris, il a déjà été démontré que l'absence de BRCA1 y confère une hyper-sensibilité et que ce

phénotype peut être corrigé par l'introduction d'un BRCA1 exogène (62, 64, 493). Toutefois, la présence d'haploinsuffisance n'a pas été étudiée en comparant une même lignée cellulaire, différente uniquement par son statut en BRCA1, ni en utilisant la délétion complète d'un allèle de BRCA1. Or des mutations hypomorphes peuvent se comporter différemment des mutations nulles. De plus, BRCA1 code pour divers variants d'épissage et certains mutants hypomorphes peuvent conserver quelques-uns de ces variants. Effectivement, une mutation régulièrement utilisée pour étudier l'impact d'une délétion de BRCA1 chez la souris est un mutant qui ne code pas pour l'exon 11. Or, un des variants d'épissage connu pour BRCA1 est justement BRCA1 delta exon 11. Les souris porteuses de cette mutation sont viables, contrairement aux souris BRCA1^{-/-}, ce qui démontre une différence significative entre les deux génotypes et suggère que cette protéine hypomorphe possède une fonction intrinsèque, ce qui rend l'évaluation de l'haploinsuffisance difficile. Ces observations soulignent l'importance du modèle cellulaire dans l'évaluation d'une fonction potentiellement dépendante du dosage protéique.

6.3.1 Modèle d'initiation de la carcinogenèse

Compte tenu des résultats que nous avons obtenus et des évidences qui montrent que l'haploinsuffisance de BRCA2 pourrait elle aussi être à la base d'une dérégulation de la RH (voir section 1.6), nous pouvons maintenant établir un scénario plus détaillé illustrant les événements initiateurs potentiels de la carcinogenèse associée à BRCA1 ou BRCA2. Effectivement, nos résultats ainsi que ceux d'autres équipes démontrent que la diminution d'expression de BRCA1 et BRCA2 entraîne une dérégulation de leurs fonctions et plus particulièrement, de leur fonction dans la réparation de l'ADN. Il est donc fort probable que chez les individus hétérozygotes ou les individus normaux qui présentent une diminution d'expression de BRCA1/2, cette diminution entraîne une augmentation de la RH spontanée ainsi qu'une diminution de la cohésion entre les chromatides sœurs. L'hyper-recombinaison simple, et encore plus si elle se produit entre des chromatides sœurs mal alignées, pourrait très facilement entraîner de l'instabilité

génomique. Cette instabilité conduira à la mutation de divers gènes impliqués dans les processus cellulaires fondamentaux tels que le contrôle du cycle cellulaire ou de l'apoptose. Il est effectivement démontré que l'augmentation de RH entraîne une augmentation des réarrangements chromosomiques (494). La cellule acquiert ainsi la capacité à survivre suite à la délétion de l'allèle BRCA1 sauvage qui demeurerait jusque là fonctionnel. Cette observation permettrait également d'expliquer le haut niveau de mutation dans p53 observé chez les tumeurs associées à BRCA1, puisqu'une telle mutation permettrait effectivement de contrer le défaut de prolifération observé chez les homozygotes mutants. La perte d'hétérozygotie serait donc un événement relativement tardif dans la carcinogenèse et le résultat de la dérégulation de la RH mitotique (495). Cette perte d'hétérozygotie au locus spécifique à BRCA1 ou BRCA2 peut facilement s'expliquer par la haute teneur en séquences répétitives de ces régions (481), à la présence d'un pseudo-gène (Ψ BRCA1) situé à 28 kb en amont de BRCA1 (496) ou encore par une recombinaison interallèle due à une diminution de la cohésion entre les chromatides sœurs. Effectivement, une grande quantité de réarrangements majeurs sont identifiés aux loci de BRCA1/2 et ces réarrangements sont causés par un haut niveau de RH (481). De plus, consistant avec l'hypothèse selon laquelle l'inactivation de BRCA1/2 s'effectue par RH, les porteurs d'une mutation dans ces gènes peuvent subir l'inactivation de l'allèle muté ou de l'allèle fonctionnel à la même fréquence (21, 497) et une mutation de p53 semble précéder des réarrangements chromosomiques par RH, ce qui est en accord avec la séquence d'événements décrite précédemment (106). Suite à la perte d'hétérozygotie, on observerait une dérégulation encore plus marquée de la RH due à une plus grande diminution d'expression de BRCA1 et donc une augmentation de l'instabilité génomique, ce qui permettrait à la cellule de survivre en présence de CDB non réparée. Ce dernier événement accentuerait l'instabilité génomique de façon marquée puisqu'il conduit à des délétions de régions entières de chromosomes (Figure 21). Toutefois, les modifications issues de l'instabilité génomique sont nécessaires à la survie en présence de CDB non réparée et précèdent donc cette ultime étape qui contribue à accentuer l'instabilité des cellules pré-cancéreuses.

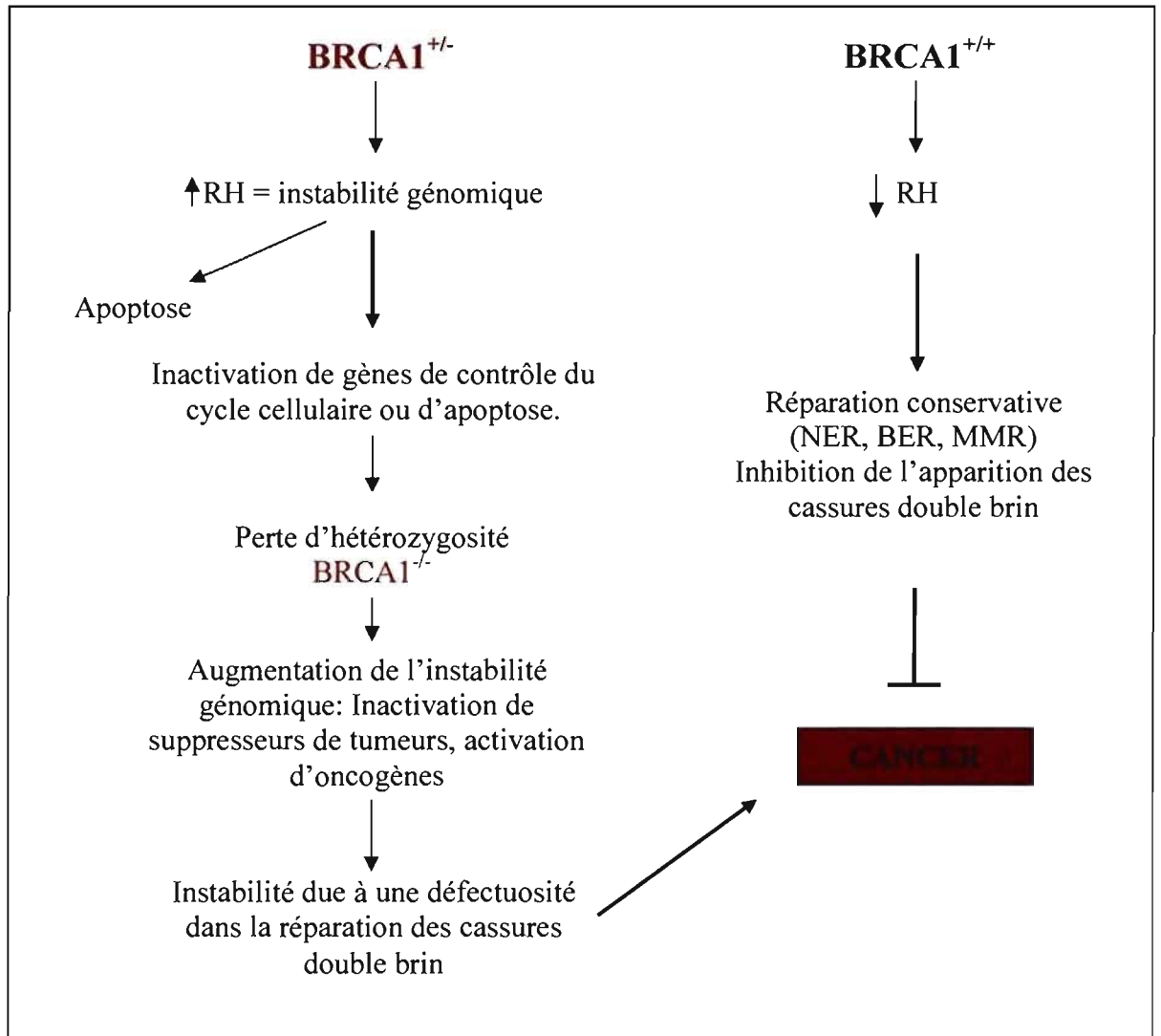


Figure 21. Modèle d'initiation de la carcinogenèse en fonction de l'haploinsuffisance. BRCA1 diminue le niveau de recombinaison homologue (RH), ce qui favorise le maintien de la stabilité du génome. En présence d'une diminution d'expression de BRCA1, l'augmentation du niveau de RH entraîne de l'instabilité génomique qui normalement se traduirait par l'induction de l'apoptose. Dans certains cas, l'instabilité peut entraîner l'accumulation d'anomalités chromosomiques qui vont permettre à la cellule de survivre suite à la perte d'hétérozygoté. Après la perte d'hétérozygoté on assistera à une augmentation de l'instabilité génomique et ultimement à la survie en présence de CDB non réparées, ce qui pourrait conduire à l'apparition du cancer.

6.4 Objectif 3 : En quoi BRCA1 affecte la réponse cellulaire au stress estrogénique?

L'utilisation de notre substrat de recombinaison classique s'avérait peu approprié pour répondre à cette question puisque la mesure de la RH survenant à un locus d'environ 2 kb (taille du gène *Puro*) avait très peu de chance d'être affectée par une stimulation aux estrogènes à des doses approchant le niveau physiologique et à l'échelle du génome entier. Nous avons donc opté pour la technique de visualisation des SCE (voir section 1.4.1.6.1). Encore une fois, le modèle cellulaire des MCF-7 était tout indiqué puisqu'il s'agit d'une des rares lignées de cancer associée à BRCA1 qui est demeurée ER α positive et qui démontre une diminution d'expression de BRCA1. Cette technique nous a tout d'abord permis de confirmer une partie des résultats obtenus dans nos premières études, c'est-à-dire que la diminution d'expression de BRCA1 stimule les SCE et donc la RH en absence de dommages exogènes. Ensuite, après avoir soumis notre modèle cellulaire à une exposition à l'estrogène, nous avons démontré que l'estrogène entraîne une augmentation des SCE et que BRCA1 stimule les SCE induits par l'estrogène. Ces résultats suggèrent que BRCA1 est essentiel à la réparation adéquate des dommages induits par le stress estrogénique et plus particulièrement au redémarrage des fourches de réplication. Comme nous l'avons déjà discuté, cette augmentation de SCE pourrait être due à une augmentation du stress réplicatif à cause de l'accélération de la réplication ou encore due au potentiel génotoxique de l'estrogène. Néanmoins, la présence de BRCA1 en quantité suffisante serait essentielle au maintien de la stabilité du génome en favorisant le redémarrage des fourches de réplication suite à l'induction de lésions.

Jusqu'à présent, on ne connaît pas encore la raison exacte de la prédisposition de certains tissus au développement de tumeurs associées à BRCA1/2. Parmi les hypothèses invoquées: il est possible que BRCA1 affecte directement le niveau d'estrogène via son rôle sur l'expression des aromatasés. Dans ce cas, les risques inhérents à une exposition à l'estrogène seraient réduits à la source en limitant directement la production d'estrogène et, par conséquent, l'exposition à cette hormone. Notre modèle cellulaire, les MCF-7, a conservé l'expression

d'aromatases (498). Comme le sérum nécessaire à la croissance cellulaire contient de l'androgène qui peut être converti en estrogène par les aromatases, l'effet de BRCA1 sur l'expression des aromatases se manifesterait aussi bien en absence qu'en présence de stimulation à l'estrogène puisque l'exposition à l'estradiol n'affecte pas l'expression de BRCA1 ni celle des aromatases (392, 499). Il est donc possible que la diminution de SCE en présence de BRCA1 soit due à une diminution de l'exposition à l'estrogène produit à partir du milieu normal mais peu probable, vu le faible niveau d'androgène présent dans le milieu. Toutefois, on observe définitivement une promotion des SCE par BRCA1 lors de la stimulation à l'estradiol, une stimulation indépendante de la présence d'aromatases. Ces observations nous indiquent que le niveau d'expression de BRCA1 affecte directement le nombre de SCE peu importe l'activité de l'aromatase. Donc, si la régulation du niveau d'expression des aromatases par BRCA1 pourrait expliquer la spécificité tissulaire des cancers associés à BRCA1, elle ne représente vraisemblablement pas la seule explication.

Deuxièmement, la défectuosité de BRCA1 pourrait promouvoir la prolifération cellulaire via la dé-répression des voies de signalisation du ER α , ce qui aurait pour effet de favoriser l'instabilité via le stress réplicatif. L'accélération de la réplication, additionnée à une augmentation du nombre de lésions causées par l'estrogène, peuvent entraîner une augmentation des risques de rencontres entre la fourche et des lésions non réparées, favorisant ainsi le démantèlement des fourches de réplication en CDB, ce qui aurait pour conséquence d'accentuer le nombre de réarrangements chromosomiques. Toutefois, on sait que les cellules ayant une mutation de BRCA2 développent des tumeurs dans les mêmes tissus que ceux mutées dans BRCA1 et que ces cellules démontrent les mêmes anomalies chromosomiques alors que BRCA2 n'a aucun effet connu sur la répression du récepteur de l'estrogène. Cette dernière observation nous indique clairement que l'inhibition de l'effet mitogénique du ER α n'est pas la cause unique de la protection tissu-spécifique conférée par BRCA1.

Troisièmement, la présence de BRCA1 pourrait permettre la stabilisation des fourches de réplication via l'activation des points de contrôle du cycle cellulaire.

Ceci aurait pour effet de réduire le démantèlement des fourches de réplication en plus de réduire les réarrangements chromosomiques occasionnés par ce démantèlement puisqu'on sait que la RH, nécessaire au redémarrage de la fourche de réplication, comporte certains risques. En absence de BRCA1 les fourches seraient plus instables et les CDB engendrées seraient réparées avec une moins grande efficacité, en plus d'être réparées par des mécanismes non conservatifs.

Quatrièmement, une défectuosité dans BRCA1/2 pourrait avoir un effet qui favorise la transformation spécifique à certains tissus. Plus concrètement, cette défectuosité pourrait sensibiliser les cellules à l'effet d'un mutagène local tel que l'estrogène, ce qui expliquerait la spécificité tissulaire malgré la présence ubiquitaire de BRCA1/2. Conformément à cette hypothèse, il est possible que la perte d'hétérozygotie soit plus fréquente dans certains tissus, ce qui prédisposerait les hétérozygotes pour BRCA1/2 au développement tumoral. Les loci de *BRCA1* et *BRCA2* sont constitués d'une forte proportion de séquences répétitives. Une dérégulation de la RH et une augmentation de l'instabilité génomique, dues au stress estrogénique, pourraient se refléter dans une augmentation de fréquence de la perte de l'allèle sauvage et de l'instabilité génomique en générale. Certaines évidences expérimentales évaluant la perte d'hétérozygotie par RH ont démontré que le niveau de perte d'hétérozygotie varie selon le tissu étudié (495), de façon inter-individuelle et que les femmes montrent un niveau plus élevé que les hommes (501). Ces observations seraient en accord avec l'hypothèse selon laquelle l'estrogène stimule les SCE et donc la RH, le mécanisme à la base des réarrangements chromosomiques et de la perte d'hétérozygotie. Par conséquent, l'exposition à l'estrogène pourrait favoriser la perte d'hétérozygotie dans les tissus cibles.

Ces observations nous portent à croire que BRCA1 pourrait agir sur les stress estrogénique à différents niveaux. Il faut toutefois garder en tête que ces hypothèses ne sont peut-être pas exhaustives et certainement pas mutuellement exclusives. Effectivement, la présence de BRCA1 et BRCA2 est reconnue pour stimuler les différents types de réparation tels que le NER, le BER et le MMR. La réparation adéquate des lésions à l'ADN diminue les risques de collisions avec la

fourche de réplication, ce qui entraîne une réduction des SCE et de la RH en générale. Il est effectivement démontré que l'activité adéquate du NER et du BER diminue les SCE, tout comme un traitement avec des agents alkylants ou capables d'induire des dommages oxydatifs stimule les SCE (502-505). Suite à une exposition à l'estrogène, l'effet génotoxique de cette hormone peut accroître le nombre de lésions. Il est donc fort probable que l'effet génotoxique de l'estrogène, additionné à son effet pro-prolifératif, accentuent les risques d'arrêt des fourches de réplication et donc, par conséquent, les risques de réarrangements chromosomiques par RH ou SCE mal alignés. Chez les hétérozygotes, la diminution d'expression de BRCA1/2 pourrait entraîner une diminution de la cohésion entre les chromatides sœurs, une augmentation des SCRS et un défaut dans le redémarrage des fourches de réplication par RH (observé par une diminution des SCE). La présence de BRCA1 serait donc nécessaire afin de stimuler la réparation des lésions causées par l'estrogène en amont de la fourche, stabiliser celle-ci lorsqu'elle rencontre un dommage non réparé, mais aussi favoriser les événements de RH conservatifs (stimuler la cohésion et les CG, inhiber les SCRS ainsi que les SCE) pour redémarrer les fourches de réplication et limiter ainsi les réarrangements génomiques et les risques de perte d'hétérozygoté en présence d'estrogène. Les loci de BRCA1/2 seraient particulièrement vulnérables à la perte d'hétérozygoté induite par l'estrogène compte tenu de leur haut niveau de séquences répétitives. De plus, la perte d'hétérozygoté de BRCA1/2 pourrait être plus fréquente dans les tissus des seins et des ovaires que dans tous autres tissus compte tenu de leur haut niveau d'exposition à cette hormone vu la présence d'aromatases locales (500). En d'autres termes, la présence de BRCA1 et potentiellement BRCA2, serait nécessaire à la gestion adéquate du stress estrogénique à de multiple niveau pour éviter l'instabilité génomique, particulièrement dans les tissus cibles (Figure 22). La pénétrance incomplète des cancers associés à BRCA1/2 pourrait être reliée à l'influence des facteurs de reproduction (506).

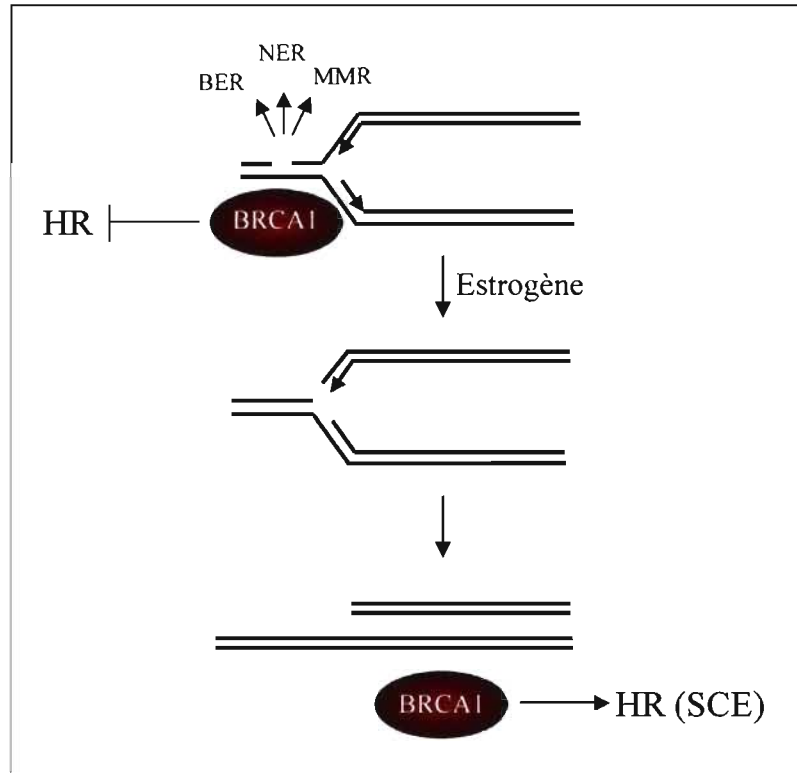


Figure 22. Rôles de BRCA1 dans la gestion du stress estrogénique. BRCA1 stimule les différents mécanismes de réparation de l'ADN, ce qui pourrait expliquer la diminution de RH. Toutefois, en présence d'une stimulation à l'estrogène, le nombre de lésions augmente, ce qui accroît les risques de collision avec la fourche de réplication. Le démantèlement de la fourche de réplication en CDB nécessiterait la présence de BRCA1 pour la réparation conservatrice. Une diminution d'expression de BRCA1 pourrait à la fois entraîner une diminution dans la capacité des cellules à redémarrer leurs fourches de réplication endommagées mais aussi accroître les risques de réarrangements puisque BRCA1 est nécessaire à la RH conservatrice.

Chapitre 7. Perspectives

7.1 Comment BRCA1 peut à la fois promouvoir et inhiber la RH?

Les différents résultats obtenus soulèvent évidemment une multitude de questions. Nous avons tout d'abord démontré l'importance de BRCA1, tout comme BRCA2, dans la régulation de la RH en fonction du type de dommage. Comment une protéine peut-elle à la fois promouvoir la réparation des CDB par RH et inhiber ce même mécanisme aux autres types de lésions?

7.1.1 Contrôle de la RH via les kinases ATM, ATR et c-ABL

Une des hypothèses possibles se situe au niveau de la signalisation des dommages à l'ADN. Comme nous l'avons déjà mentionné, les kinases ATM et ATR semblent très importantes dans la détection et la signalisation des différents types de dommages à l'ADN (voir section 1.4.1.7). Leur phosphorylation pourrait entraîner les effets contradictoires d'activation ou d'inhibition de RAD51 selon la lésion à réparer. De plus, nous avons souligné l'importance de c-ABL dans la régulation de RAD51 (166). Il est donc probable que ces kinases donnent des signaux contradictoires en fonction de la lésion rencontrée. ATR a la capacité de reconnaître et d'être activée par les CSB ou l'arrêt des fourches de réplication. ATM est plutôt reconnue pour être activée par les CDB (507) mais également pour inhiber l'hyper-recombinaison (508). Malgré qu'il n'y ait pas encore de lien établi entre BRCA2 et ces deux kinases, elles phosphorylent BRCA1 sur différents résidus. De plus, c-ABL, qui interagit avec BRCA1, a la capacité de phosphoryler RAD51 suite à une activation par ATM (165, 454). Nous proposons, dans le modèle exposé en annexe III, que BRCA2 pourrait protéger RAD51 de la phosphorylation par c-ABL ou encore activer la forme phosphorylée de RAD51. Ces différents signaux pourraient donc être relayés par BRCA1 et BRCA2, ce qui entraînerait l'activation ou l'inactivation de RAD51 et de la RH en fonction du type de dommage. Il est donc possible que la régulation de la RH médiée par BRCA1 et BRCA2 se fasse via ces kinases (Figure 23).

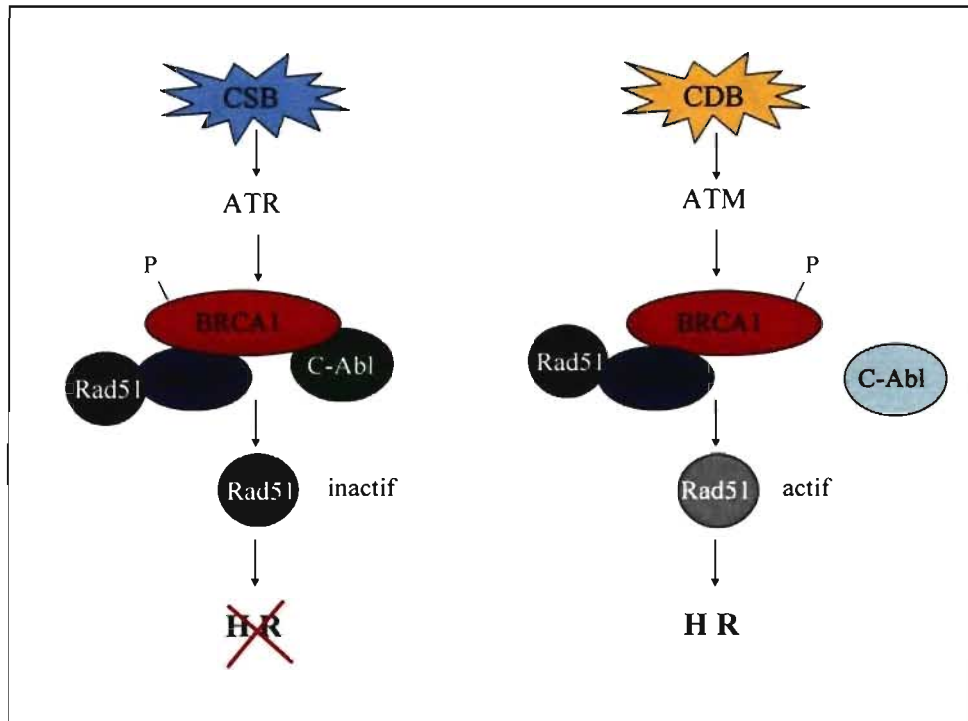


Figure 23. BRCA1/2 pourraient réguler la RH via les kinases impliquées dans la signalisation des différents dommages à l'ADN. La kinase ATR est principalement responsable de la détection des cassures simple brin (CSB) et de l'arrêt des fourches de répliation. Puisqu'elle phosphoryle BRCA1, il est probable que le signal d'inhibition de RAD51 en absence de CSB émane d'elle. En présence de cassures double brin (CDB) c'est la kinase ATM qui est principalement activée. Suite à la phosphorylation de BRCA1, celui-ci se détache de c-ABL. Puisqu'ATM phosphoryle BRCA1 sur des résidus différents d'ATR et que c-ABL a la capacité de phosphoryler RAD51, il est possible que le signal de promotion de la RH en présence de CDB relève de ces kinases.

Pour tester ces hypothèses, nous procéderons à la diminution d'expression par interférence à ARN de ces kinases dans nos modèles cellulaires rapporteurs déficients, HCC1937 et CAPAN-1, ainsi que dans leurs dérivés exprimant BRCA1 ou BRCA2 respectivement. Si nos hypothèses s'avèrent correctes, la diminution d'expression de ces kinases qui émettent le signal de promotion ou d'inhibition de la RH devrait inhiber l'effet de BRCA1/2. Dans la mesure où BRCA1/2 protégeraient RAD51 de la phosphorylation par c-ABL, l'inhibition de cette kinase devrait entraîner une diminution de la phosphorylation de RAD51 suite à

l'induction d'une CDB par I-SceI et rendre la fonction de RAD51 indépendante de BRCA1/2, ce qui se traduirait par une fréquence de recombinaison similaire entre les clones parentaux et leurs dérivés qui expriment BRCA1/2. Cette hypothèse semble appuyée par l'hyper-sensibilité aux RI des cellules déficientes en c-ABL (509). Deuxièmement, la diminution d'expression d'ATM pourrait affecter la phosphorylation/activation de BRCA1, peut-être également l'activation de son partenaire BRCA2, et donc altérer la réponse cellulaire aux CDB induites par I-SceI dans les cellules exprimant BRCA1/2 sans affecter les lignées cellulaires déficientes. Dans le cas où la réponse cellulaire aux CDB médiée par BRCA1/2 passe par ATM, la diminution d'expression de celle-ci entraînerait des fréquences de recombinaison identique entre les cellules ATM- et BRCA1/2-déficientes. Finalement, une situation similaire pourrait s'appliquer à ATR. Il est effectivement possible qu'ATR puisse activer RAD51 suite à l'induction d'une CDB puisque ATR est recruté aux sites de CDB après l'apprêtement des bouts et leur recouvrement par RPA, ce qui constitue un substrat pour RAD51. L'effet de promotion de la RH, en présence d'une CDB, médié par BRCA1/2 pourrait donc être dépendant d'ATR.

Un raisonnement similaire s'applique pour la régulation de l'hyper-recombinaison. Il est possible que l'inhibition d'ATM entraîne un phénotype d'hyper-recombinaison qui ne serait pas accentué par une déficience en BRCA1/2, ce qui impliquerait ATM dans l'inhibition de l'hyper-recombinaison médiée par BRCA1/2. De même pour ATR, la diminution de son expression pourrait entraîner une hyper-recombinaison autant dans les clones parents que dans leurs dérivés exprimant BRCA1/2, ce qui démontrerait que l'hyper-recombinaison induite par un défaut de BRCA1/2 dépend de la signalisation d'ATR. Cette hypothèse est d'autant plus plausible que l'activation des points de contrôle du cycle cellulaire par ATR est nécessaire à l'inhibition de la RH pour la stabilisation des fourches de réplication (voir section 6.2.3)(430-432). Il est toutefois important de mentionner que la mutation d'ATR est létale chez la souris (510). Il est donc possible que la diminution d'expression soit difficile à obtenir. Puisqu'ATR phosphoryle BRCA1 sur la sérine 1423 suite à l'arrêt des fourches de réplication, nous pourrions avoir recourt à un BRCA1 mutant non phosphorylable sur ce résidu pour évaluer

l'importance d'ATR dans l'inhibition de l'hyper-recombinaison BRCA1-dépendante. Il a déjà été démontré que l'utilisation de ce mutant n'affecte pas la réparation d'une CDB par RH mais son impact sur la RH spontanée n'a jamais été évalué (161). Si la phosphorylation de BRCA1 par ATR sur ce résidu est importante pour l'inhibition de l'hyper-recombinaison spontanée, la fréquence de RH des cellules HCC1937 exprimant ce mutant devrait être plus élevée que celle des mêmes cellules exprimant le BRCA1 sauvage. Finalement, puisque c-ABL interagit avec BRCA1 en absence de CDB et que cette interaction est inhibée lorsqu'ATM est activée, il est possible que BRCA1 séquestre c-ABL pour inhiber son interaction avec RAD51 et donc que le statut de BRCA1 n'affecte pas la RH spontanée en absence de c-ABL. Ces différentes expériences nous permettraient d'établir laquelle de ces kinases, impliquées dans la signalisation des différents dommages à l'ADN, pourrait être responsable de la promotion et/ou de l'inhibition de la RH en fonction du type de dommage.

7.1.2 Contrôle de la RH via le clivage des intermédiaires de recombinaison

Comme nous l'avons déjà mentionné, BRCA1 lie directement l'ADN, sans spécificité de séquence et avec une préférence pour les structures en branches (171). Un rôle pour BRCA1 dans l'enlèvement de ces structures a été suggéré avec la découverte de la colocalisation de BRCA1 avec MSH2 et BLM (57), deux protéines qui lient ces intermédiaires de recombinaison et participent à leur clivage (464). Ces structures d'ADN simple brin non homologues sont présentes lors du SSB (voir section 6.2.4). Puisqu'il s'agit d'un substrat idéal pour la RH RAD51-dépendante, leur clivage par BRCA1 pourrait expliquer l'inhibition de la RH spontanée. Toutefois, puisque ces structures sont également présentes lors du SSA, de la CG et du CO, leur clivage est également nécessaire à la terminaison adéquate de l'événement de RH, ce qui pourrait expliquer le rôle de BRCA1 dans la promotion de la réparation d'une CDB par RH.

Pour déterminer directement si BRCA1 est impliqué dans le clivage de ces structures temporaires d'ADN, nous avons produit deux substrats de recombinaison

ayant la capacité de réparer une CDB par SSA uniquement. Dans le premier, pdir0, on retrouve un gène de résistance à la Puro ayant subi l'insertion du site de restriction I-SceI. De part et d'autre du site de restriction, on retrouve une région du gène de résistance à la Puro qui est dupliquée (nucléotides 688 à 1001). Lors de l'induction de la CDB, la dégradation autour de la lésion exposera la région d'homologie et cette duplication sera utilisée pour l'appariement durant l'événement de SSA (Figure 24). Ce mécanisme de réparation n'entraînera pas la formation d'extrémités 3' simple brin non-homologues, à l'exception des 9 nucléotides représentant le site de restriction. Il est établi que la présence de MSH2 est nécessaire pour le clivage d'une structure de plus de 30 nucléotides (464), on peut donc supposer que dans le cas de pdir0, la présence de MSH2 et potentiellement celle de BRCA1, ne serait pas nécessaire. Par opposition, nous avons construit pdirL. Ce substrat de recombinaison est identique en tout point à pdir0 à l'exception de l'introduction d'une région d'ADN non-homologue de part et d'autre du site de restriction. Lors de l'événement de SSA, la dégradation aura lieu à partir de la CDB jusqu'à la région d'homologie. Une fois cette région d'homologie découverte, il y aura appariement. La présence de l'ADN non-homologue produira alors une branche d'ADN simple brin de 150 nucléotides de chaque côté de la cassure (Figure 24). Ces branches nécessiteront la présence de MSH2 pour être stabilisées et retirées afin de terminer la réparation adéquatement.

L'introduction de ces deux substrats dans notre modèle cellulaire déficient en BRCA1, les HCC1937, suivi de la complémentation des cellules pour l'expression de BRCA1, nous permettra de comparer les fréquences de réparation d'une CDB dans chacun des cas. Les résultats précédents, obtenus à l'aide de pCAdir qui produit lui aussi des branches d'ADN 3' simple-brin, nous permettent de supposer qu'en présence de pdirL, BRCA1 stimulera la réparation de la CDB par SSA. Toutefois, si BRCA1 est impliqué dans le clivage des intermédiaires de recombinaison, sa présence ne devrait pas influencer la fréquence de réparation de la CDB induite dans pdir0 puisque celui-ci ne produit pas de branches suffisamment longues pour nécessiter son intervention. Nous pourrions alors établir si BRCA1 joue un rôle à ce niveau.

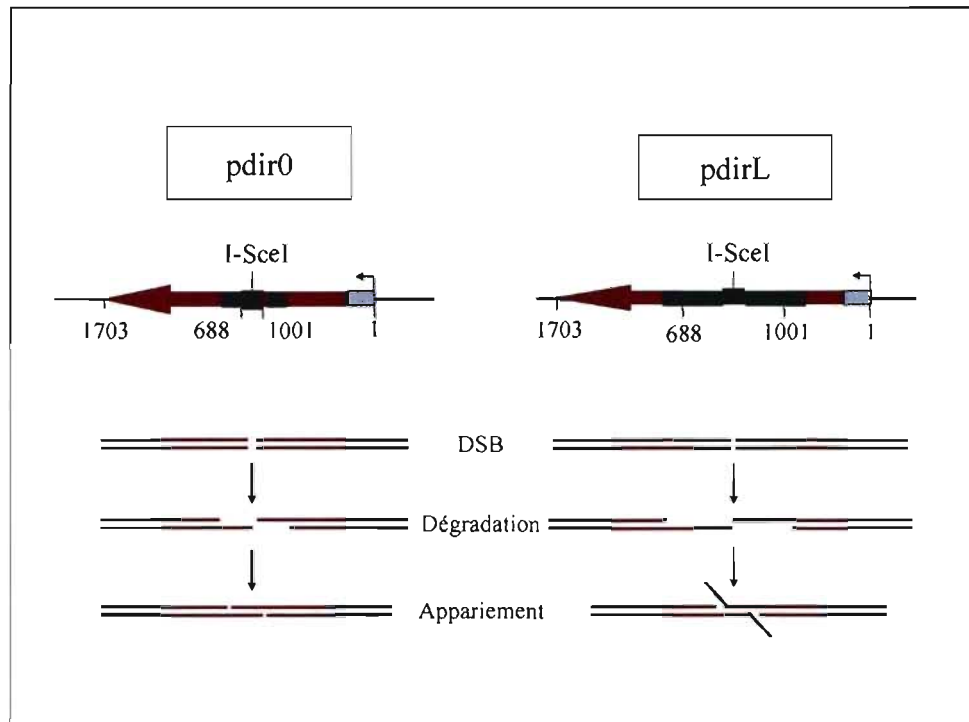


Figure 24. Substrats de recombinaison pour évaluer l'importance de BRCA1 dans la stabilisation et/ou le clivage des branches d'ADN non-homologues. Pdir0 contient un gène de résistance à la Puromycin dans lequel nous avons introduit un site de restriction pour l'endonucléase I-SceI. De part et d'autre de ce site de restriction se trouve une région du gène de résistance à la Puromycin d'environ 300 paires de bases qui est dupliquée. Lors de l'induction de la CDB, la dégradation autour de la lésion exposera la région d'homologie dupliquée qui sera utilisée pour l'appariement. Lors de cet événement de réparation on ne produira aucune branche nécessitant la présence de MSH2. PdirL est construit sur le même format à l'exception d'une insertion d'ADN non-homologue de part et d'autre du site de restriction (représentée en vert). Lors de la réparation de la CDB, cet ADN non-homologue formera des branches d'ADN qui devront être clivées pour la terminaison adéquate de l'événement.

7.2 Est-ce que l'haploinsuffisance accroît la perte d'hétérozygoté?

Très peu de choses sont connues sur les mécanismes qui causent la perte d'hétérozygoté. Elle pourrait être le fruit de la non-disjonction des chromosomes qui conduit à l'aneuploïdie ou à des délétions entraînées par un problème dans le contrôle de la recombinaison mitotique. Les loci de BRCA1 et BRCA2 contiennent

une proportion anormalement élevée de séquences répétitives, soit 47% chacun (511, 512). Il a déjà été proposé que ces séquences soient impliquées dans la RH méiotique, ce qui favoriserait l'apparition de larges délétions qui seraient à l'origine de certaines mutations germinales observées (26). Serait-il possible qu'un mécanisme analogue survenant à la mitose soit impliqué dans la perte d'hétérozygoté? Nos résultats semblent appuyer cette hypothèse. Effectivement, nous avons établi que les cellules qui présentent une diminution d'expression de BRCA1 démontrent un phénotype d'hyper-recombinaison et un défaut dans la réparation des CDB alors que ces caractéristiques ne sont pas affectées par la présence d'un allèle mutant de BRCA1 (*5382insC*). Il serait donc probable que la dérégulation de la RH engendrée par l'haploinsuffisance de BRCA1/2 soit responsable de l'accroissement des risques de perte d'hétérozygoté à ces locus, ce qui expliquerait le haut niveau d'apparition tumorale chez ces individus.

Afin d'établir si la diminution d'expression de BRCA1/2 affecte bel et bien la perte d'hétérozygoté, nous pourrions intégrer le gène de la *Thymidine Kinase* du virus de l'Herpes simplex (*HSV-TK*) dans un intron du seul allèle de BRCA1 présent dans notre système cellulaire décrit précédemment, les MCF-7. En effet, les MCF-7 qui expriment un niveau réduit de BRCA1 accumulent des anomalies chromosomiques durant leurs divisions et la restauration de l'expression de BRCA1 sauvage dans ces mêmes cellules diminue leur potentiel de tumorigénèse chez la souris (327). Ce marquage nous permettra de mesurer la fréquence de délétion du *HSV-TK* en fonction du niveau d'expression de BRCA1 puisque ce gène suicide rend les cellules sensibles à la drogue ganciclovir (513). L'acquisition de la résistance au ganciclovir nous indiquera la perte de *HSV-TK* et conséquemment celle de BRCA1. Nos résultats précédents suggèrent que la diminution d'expression de BRCA1 devrait stimuler la perte d'hétérozygoté.

Ce modèle cellulaire nous permettra également d'évaluer l'importance de divers facteurs génétiques et environnementaux sur la perte d'hétérozygoté. Ces informations sont primordiales pour l'établissement de stratégies préventives destinées à la population en générale mais plus particulièrement pour les hétérozygotes. Effectivement, une grande proportion des tumeurs associées à

BRCA1 ont subi une mutation de p53 (395, 397). Toutefois, l'ordre dans lequel ces deux gènes sont inactivés demeure inconnu. À l'aide de notre essai, nous pourrions déterminer si le niveau de perte d'hétérozygoté est affecté par la diminution d'expression de p53 ou si au contraire, la perte de p53 est postérieure à la perte d'hétérozygoté. Effectivement, nous pourrions déterminer le statut de p53 dans les cellules ayant subi une perte d'hétérozygoté spontanée. En parallèle, nous pourrions également diminuer l'expression de p53 par interférence à RNA ou avec l'expression de la protéine E6 du virus du papillome et vérifier l'impact sur le niveau de perte d'hétérozygoté. En théorie, si la perte d'hétérozygoté est postérieure à la délétion de p53, une diminution d'expression de p53 devrait accroître le niveau de perte d'hétérozygoté et la majorité des cellules ayant subi une perte d'hétérozygoté spontanée devraient avoir également subi la délétion de p53.

De plus, ce système nous permettra de tester une multitude de produits autant de chimiothérapie, alimentaires ou environnementaux, sur la perte d'hétérozygoté de BRCA1. Par exemple, nous savons que l'exposition à l'estrogène augmente les risques de carcinogénèse. Nous pourrions tester l'impact de divers types d'exposition aux estrogènes sur la perte d'hétérozygoté, par exemple la consommation de divers contraceptifs oraux ou de thérapies hormonales. De plus, les phytoestrogènes ont été décrits comme étant capables de réduire les risques associés à une exposition à l'estrogène. Ces produits pourraient donc avoir un impact sur la perte d'hétérozygoté. Parmi ceux-ci, on retrouve la génistéine, un dérivé du soya. En plus de jouer un rôle sur l'activité du récepteur à l'estrogène comme la majorité des phytoestrogènes, la génistéine stimule l'expression de BRCA1 (514). Il serait intéressant dans ce cas de mesurer l'importance d'un traitement à base de génistéine sur l'aptitude des cellules au maintien de la stabilité du génome. Ce type d'essai est également valable pour BRCA2 puisqu'il est aussi impliqué dans le maintien de la stabilité du génome et la carcinogénèse. Ces expérimentations nous permettront de mieux comprendre l'importance de différents facteurs dans la perte d'hétérozygoté de BRCA1/2 et par le fait même, de pouvoir

mieux cerner les populations à risques de développer un cancer du sein ou de l'ovaire dans un avenir plus ou moins éloigné.

7.3 Quelle propriété de l'estrogène entraîne l'augmentation des SCE?

Le potentiel oncogénique de l'estrogène a longtemps été considéré uniquement du point de vue de son récepteur. Toutefois, l'estrogène aurait vraisemblablement deux façons de favoriser les SCE. Elle peut tout d'abord stimuler la prolifération via son récepteur, ce qui aurait pour effet d'augmenter le stress réplicatif. Mais elle peut aussi directement induire des dommages à l'ADN, indépendamment de l'action de son récepteur, puisqu'il s'agit d'une hormone stéroïde perméable à la membrane cellulaire (366). Afin de déterminer lequel de ces deux mécanismes est réellement impliqué et si un effet synergique s'applique, nous pourrions tester l'effet de divers inhibiteurs sur l'induction de SCE. L'utilisation d'un inhibiteur d'aromatase tel que le létrozole abolirait les deux effets de l'estrogène, l'effet pro-prolifératif et l'effet génotoxique, en éliminant la production d'estrogène à la source. Par contraste, l'utilisation d'un inhibiteur du récepteur de l'estrogène comme le tamoxifen, inhiberait uniquement les conséquences de l'estrogène qui découle de son interaction avec son récepteur. La comparaison de l'effet de ces inhibiteurs sur l'induction de SCE par l'estrogène pourrait nous indiquer leur importance relative. Certaines évidences tendent à démontrer que ces deux effets de l'estrogène seraient impliqués dans la carcinogenèse. Effectivement, il est démontré que l'ovariectomie combinée à un traitement au tamoxifen diminue les risques de récurrence du cancer du sein de façon plus importante que le traitement au tamoxifen seul qui pourtant devrait inhiber tout effet de l'estrogène nécessitant le récepteur (515). Quoique l'inhibition partielle du récepteur ne puisse être exclue, ces résultats suggèrent que l'effet oncogénique de l'estrogène ne serait pas uniquement dû à la présence de son récepteur, ce qui est en accord avec l'observation qu'une grande partie des cancers du sein et de l'ovaire deviennent négatifs pour l'expression du récepteur de l'estrogène durant le processus de carcinogenèse.

Encore une fois dans le but d'établir laquelle des fonctions de l'estrogène contribuent à l'initiation de la carcinogenèse, nous pourrions utiliser les divers intermédiaires de cette hormone. Effectivement, l'estrogène sous sa forme naturelle, a la capacité de se lier au récepteur, en plus d'être métabolisée par les enzymes cellulaires. Cette hormone active donc les deux voies, celle du récepteur et celle de réponse aux dommages à l'ADN. L'utilisation directe d'intermédiaires du métabolisme de l'estrogène, tels que les quinones (voir section 1.7), nous permettrait de séparer ces deux voies puisque ceux-ci conservent le potentiel génotoxique de l'estrogène sans toutefois avoir la capacité de lier le récepteur.

Dans le même objectif, nous pourrions utiliser une lignée cellulaire de cancer du sein déficiente pour le récepteur à l'estrogène, par exemple les HCC1937. Dans cette lignée cellulaire, nous pourrions réintroduire l'expression du récepteur. Suite à une stimulation à l'estrogène en parallèle de ces deux lignées, qui possèdent ou non le récepteur, nous serions en mesure de déterminer le nombre de SCE induit par l'estrogène. En absence du récepteur, seul l'effet génotoxique de l'estrogène pourrait être impliqué. En comparant l'effet en absence du récepteur à celui obtenu en présence de celui-ci, nous serons à même de conclure laquelle des deux fonctions de l'estrogène entraîne une augmentation des SCE et si on observe un effet additif ou synergique. La réexpression de BRCA1 dans cette lignée cellulaire déficiente, qui exprime ou non le récepteur, pourrait en plus nous indiquer à quelle étape BRCA1 affecte la réponse cellulaire à l'estrogène.

Puisque BRCA2 possède une fonction similaire à celle de BRCA1 dans la régulation de la RH en fonction du type de dommage et la même spécificité tissulaire, il serait intéressant d'établir si sa présence est également impliquée dans la gestion du stress estrogénique. Un essai similaire, basé sur l'utilisation d'une lignée cellulaire qui exprime ou non BRCA2 et le ER α , pourrait nous éclairer sur le rôle de BRCA2 dans la régulation des SCE.

Certaines expérimentations préliminaires effectuées dans la lignée cellulaire ER α - et BRCA1-déficientes, les HCC1937, nous indiquent que l'estrogène stimule les SCE malgré l'absence du récepteur, des résultats appuyés par un autre groupe (516), et que la présence de BRCA1 est nécessaire pour stimuler significativement

les SCE. De plus, la présence de BRCA2, tout comme celle de BRCA1, semble inhiber les SCE spontanés mais être nécessaire à leur induction suite à une exposition à l'estrogène. Ces résultats suggèrent que l'effet génotoxique de l'estrogène pourrait avoir un rôle important à jouer et que BRCA2 serait également impliquée dans la protection contre le stress estrogénique.

Ces essais pourraient s'avérer utiles dans l'identification de substances capables de bloquer ou d'amplifier le potentiel génotoxique des métabolites de l'estrogène, ce qui pourrait ultimement être très important dans la prévention et la thérapie du cancer (8, 506).

7.4 Est-ce que BRCA1 affecte la recombinaison homologe spontanée et les échanges entre les chromatides sœurs en stimulant la réparation des dommages à l'ADN en amont de la fourche de réplication?

Nous avons émis l'hypothèse selon laquelle le rôle de BRCA1 dans la réduction des SCE et de la RH spontanée repose sur la stimulation des mécanismes de réparation en amont de la fourche de réplication tels que le MMR, le NER et le BER, afin d'éviter une collision entre les fourches et les lésions à l'ADN. BRCA1 pourrait donc stimuler ces mécanismes de réparation et ainsi réduire les réarrangements chromosomiques. Nous pourrions tester cette hypothèse en ayant recours à nos modèles cellulaires déficient en BRCA1 ou haploinsuffisant, les HCC1937 et les MCF-7 respectivement. Dans ces modèles, nous pourrions procéder à la diminution d'expression de divers gènes impliqués dans le NER, le BER et le MMR, par interférence à ARN. Nous pourrions cibler, dans le MMR, MSH2 ou MSH6, des partenaires de BRCA1 (57). Dans le BER nous pourrions cibler XRCC1, une protéine qui possède un domaine BRCT similaire à BRCA1 (517) ou la ligase III dont l'efficacité est affectée par une mutation dans BRCA2 (443). Dans le cas du NER, nous pourrions cibler XPC, XPE, DDB2 ou GADD45, les gènes stimulés transcriptionnellement par BRCA1 (440, 441). Par la suite, nous pourrions évaluer l'impact du statut de BRCA1 sur l'inhibition des SCE et de la RH spontanée en fonction du statut génétique de nos modèles. Compte tenu du type de lésions causées par l'estrogène, donc potentiellement impliqués dans la

carcinogénèse associée à BRCA1, nous devrions nous concentrer tout d'abord sur les mécanismes de NER et de BER (voir section 1.7). Dans la mesure où BRCA1 affecterait la RH via la stimulation de ces divers mécanismes de réparation, l'inhibition de ceux-ci devrait abolir ou réduire l'effet de BRCA1 sur la régulation de la RH.

7.5 Effet de différents mutants ou polymorphismes de signification inconnue

L'identification de nouvelles mutations dans les gènes de susceptibilité BRCA1 et BRCA2 fournit l'opportunité d'aider à identifier les femmes à haut risque de développer le cancer du sein et de l'ovaire. Une sérieuse limitation quant à l'obtention d'un bénéfice au niveau clinique à partir de ces informations repose sur la détermination de l'importance fonctionnelle de ces nouveaux mutants. Nous avons mis au point dans le laboratoire un essai fonctionnel simple et rapide afin de mesurer la capacité des cellules à effectuer la réparation de l'ADN par RH. Notre essai, basé sur la sensibilité à la mitomycin C, nous permettrait d'établir l'importance de différentes mutations ou polymorphismes de BRCA1 ou de BRCA2 sur la régulation de la RH puisque la réparation de ce type de lésion repose sur la RH. Selon nos résultats, cette fonction semble étroitement liée au maintien de la stabilité du génome, donc l'établissement du niveau de résistance à la mitomycin C pourrait être un test valable afin de définir l'importance fonctionnelle de divers mutations ou polymorphismes. Effectivement, la présence d'un BRCA1 et d'un BRCA2 non-fonctionnel entraîne une hyper-sensibilité à cet agent pontant l'ADN. Jusqu'à présent, la validation de ces mutants était rendue difficile à cause d'un manque de tests diagnostiques. Un des tests proposés précédemment était basé sur la résistance aux RI. Hors, chez les mammifères, les dommages induits par de telles radiations sont principalement réparés par NHEJ (88, 518). Puisqu'un défaut de BRCA1 n'affecte pas l'efficacité du NHEJ ou de la recombinaison V(D)J, mais affecte plutôt la fidélité de la réparation par NHEJ, la mesure de l'hyper-sensibilité aux RI ne constitue pas un test diagnostique adéquat (206, 208, 210, 213). De plus, les lésions causées par une exposition aux RI surviennent à n'importe quel moment du cycle cellulaire. Toutefois, chez les mammifères, la RH

constitue le mécanisme prédominant de réparation des CDB seulement durant la phase S-G₂, lorsque la chromatide sœur est disponible comme matrice pour la réparation. À la lumière de ces informations, nous pouvons conclure que l'utilisation d'agents pontants l'ADN tels que la mitomycin C ou encore le cisplatine, serait de meilleurs outils pour détecter un défaut dans la réparation par RH que les RI. Notre essai pourra donc éventuellement permettre de mieux définir l'effet biologique des mutations de significations inconnues ou des différents polymorphismes de BRCA1 et potentiellement de BRCA2 (liste détaillée des mutations et polymorphismes de signification inconnue sur le site du BIC <http://research.nhgri.nih.gov/bic/>). Il pourrait donc s'avérer utile en clinique pour l'établissement d'une stratégie préventive pour les femmes à risques de développer un cancer du sein ou de l'ovaire.

7.6 Conclusion: prévention et thérapies

Le rôle de BRCA1 ainsi que de BRCA2 dans le maintien de la stabilité du génome est désormais bien établi. Nos résultats démontrent BRCA1 est essentiel à la cohésion/alignement des chromatides sœurs et à la régulation de la RH en fonction du type de dommage. Les fonctions de BRCA1 sont dose-dépendante et sont essentielles à la gestion du stress estrogénique. Dans l'optique de l'établissement d'une stratégie préventive, tout régime ou nutriment capable d'accentuer l'expression de BRCA1 pourrait s'avérer positif pour les femmes en générale mais surtout pour les femmes hétérozygotes, en diminuant l'effet de la présence d'un seul allèle de BRCA1. Certaines composantes alimentaires telles que la génistéine, un produit présent dans le soya ou l'indole-3-carbinol, présent dans les légumes crucifères, sont capables de stimuler l'expression de BRCA1 mais aussi de BRCA2 (519). Compte tenu de l'importance de BRCA1 et BRCA2 dans la réparation de l'ADN, la consommation de nutriments capables de réduire les dommages oxydatifs tels que le sélénium ou le thé vert pourrait s'avérer intéressante afin de réduire les risques de carcinogénèse, particulièrement chez les hétérozygotes où la réparation des dommages à l'ADN est moins efficace (520-522). De plus, puisque le processus de carcinogénèse associé à BRCA1 et BRCA2 repose

vraisemblablement sur le métabolisme de l'estrogène, tous nutriments capables de moduler le métabolisme de l'estrogène pourraient s'avérer utile. Parmi ceux-ci on retrouve encore une fois l'indole-3-carbinol qui peut réduire l'activité du ER α (523, 524) ou les différents phytoestrogènes. Les phytoestrogènes sont des molécules d'origines végétales qui ont la capacité de lier le ER mais avec une activité estrogénique très faible. Certaines évidences autant *in vivo* qu'*in vitro* suggèrent que les phytoestrogènes peuvent réduire les risques de cancers reliés aux hormones, potentiellement en interférant avec la synthèse, le métabolisme et la transduction de signaux par les hormones stéroïdes. Parmi les plus grandes sources de phytoestrogènes on retrouve le soya et les graines de lin mais aussi le vin rouge, l'origan, la réglisse, la camomille et le clou de girofle. De plus, les polyphénols présents dans le thé et le soya, entraînent une diminution d'expression d'aromatases, une conséquence souhaitable pour réduire l'effet de l'estrogène à la source (revue complète dans 8).

L'utilisation de ces différentes stratégies afin de minimiser les conséquences d'une diminution de BRCA1 pourrait s'avérer utile pour la prévention mais également dans le cadre d'une chimiothérapie. Effectivement, les traitements associés aux cancers du sein et de l'ovaire reposent souvent sur l'utilisation de chimiothérapies. L'utilisation de drogues capables d'induire des pontages entre les brins d'ADN ou directement des CDB, affecte grandement la prolifération des cellules tumorales déficientes en BRCA1. Toutefois, chez les hétérozygotes, ces différentes thérapies pourraient avoir des effets secondaires plus importants que chez les individus porteurs de BRCA1 fonctionnel, en affectant les cellules saines. Nos résultats suggèrent donc certaines précautions dans le traitement de ces femmes et que l'utilisation d'une diète capable de stimuler l'expression de BRCA1 pourrait être bénéfique afin de réduire les effets secondaires des traitements chez ces femmes.

Finalement, une meilleure connaissance des différents rôles de BRCA1 dans le maintien de la stabilité du génome nous conduit maintenant à l'élaboration de nouvelles stratégies thérapeutiques et préventives afin de limiter l'incidence des tumeurs associée à cette protéine essentielle et à en faciliter le traitement.

Chapitre 8. Références

1. **Rahman, N., and M. R. Stratton.** 1998. The genetics of breast cancer susceptibility. *Annu Rev Genet* **32**:95-121.
2. **Schwab, M., A. Claas, and L. Savelyeva.** 2002. BRCA2: a genetic risk factor for breast cancer. *Cancer Lett* **175**:1-8.
3. **Welsh, P. L., E. L. Schubert, and M. C. King.** 1998. Inherited breast cancer: an emerging picture. *Clin Genet* **54**:447-58.
4. **Garber, J. E., and A. R. Hartman.** 2004. Prophylactic oophorectomy and hormone replacement therapy: protection at what price? *J Clin Oncol* **22**:978-80.
5. **Hartmann, L. C., A. Degnim, and D. J. Schaid.** 2004. Prophylactic mastectomy for BRCA1/2 carriers: progress and more questions. *J Clin Oncol* **22**:981-3.
6. **Metcalf, K. A.** 2004. Prophylactic bilateral mastectomy for breast cancer prevention. *J Womens Health (Larchmt)* **13**:822-9.
7. **Narod, S. A.** 2001. Hormonal prevention of hereditary breast cancer. *Ann N Y Acad Sci* **952**:36-43.
8. **Kotsopoulos, J., and S. A. Narod.** 2005. Towards a dietary prevention of hereditary breast cancer. *Cancer Causes Control* **16**:125-38.
9. **Hall, J. M., M. K. Lee, B. Newman, J. E. Morrow, L. A. Anderson, B. Huey, and M. C. King.** 1990. Linkage of early-onset familial breast cancer to chromosome 17q21. *Science* **250**:1684-9.
10. **Miki, Y., J. Swensen, D. Shattuck-Eidens, P. A. Futreal, K. Harshman, S. Tavtigian, Q. Liu, C. Cochran, L. M. Bennett, W. Ding, and et al.** 1994. A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science* **266**:66-71.
11. **Wooster, R., S. L. Neuhausen, J. Mangion, Y. Quirk, D. Ford, N. Collins, K. Nguyen, S. Seal, T. Tran, D. Averill, and et al.** 1994. Localization of a breast cancer susceptibility gene, BRCA2, to chromosome 13q12-13. *Science* **265**:2088-90.
12. **King, M. C., J. H. Marks, and J. B. Mandell.** 2003. Breast and ovarian cancer risks due to inherited mutations in BRCA1 and BRCA2. *Science* **302**:643-6.
13. **Ford, D., D. F. Easton, M. Stratton, S. Narod, D. Goldgar, P. Devilee, D. T. Bishop, B. Weber, G. Lenoir, J. Chang-Claude, H. Sobol, M. D. Teare, J. Struewing, A. Arason, S. Scherneck, J. Peto, T. R. Rebbeck, P. Tonin, S.**

- Neuhausen, R. Barkardottir, J. Eyfjord, H. Lynch, B. A. Ponder, S. A. Gayther, M. Zelada-Hedman, and et al. 1998. Genetic heterogeneity and penetrance analysis of the BRCA1 and BRCA2 genes in breast cancer families. The Breast Cancer Linkage Consortium. *Am J Hum Genet* **62**:676-89.
14. Easton, D. F., L. Steele, P. Fields, W. Ormiston, D. Averill, P. A. Daly, R. McManus, S. L. Neuhausen, D. Ford, R. Wooster, L. A. Cannon-Albright, M. R. Stratton, and D. E. Goldgar. 1997. Cancer risks in two large breast cancer families linked to BRCA2 on chromosome 13q12-13. *Am J Hum Genet* **61**:120-8.
 15. Narod, S. A. 2006. Modifiers of risk of hereditary breast cancer. *Oncogene* **25**:5832-6.
 16. Serova, O. M., S. Mazoyer, N. Puget, V. Dubois, P. Tonin, Y. Y. Shugart, D. Goldgar, S. A. Narod, H. T. Lynch, and G. M. Lenoir. 1997. Mutations in BRCA1 and BRCA2 in breast cancer families: are there more breast cancer-susceptibility genes? *Am J Hum Genet* **60**:486-95.
 17. Schubert, E. L., M. K. Lee, H. C. Mefford, R. H. Argonza, J. E. Morrow, J. Hull, J. L. Dann, and M. C. King. 1997. BRCA2 in American families with four or more cases of breast or ovarian cancer: recurrent and novel mutations, variable expression, penetrance, and the possibility of families whose cancer is not attributable to BRCA1 or BRCA2. *Am J Hum Genet* **60**:1031-40.
 18. Cleton-Jansen, A. M., N. Collins, S. R. Lakhani, J. Weissenbach, P. Devilee, C. J. Cornelisse, and M. R. Stratton. 1995. Loss of heterozygosity in sporadic breast tumours at the BRCA2 locus on chromosome 13q12-q13. *Br J Cancer* **72**:1241-4.
 19. Meng, Z. H., Y. Ben, Z. Li, K. Chew, B. M. Ljung, M. D. Lagios, and S. H. Dairkee. 2004. Aberrations of breast cancer susceptibility genes occur early in sporadic breast tumors and in acquisition of breast epithelial immortalization. *Genes Chromosomes Cancer* **41**:214-22.
 20. Russell, P. A., P. D. Pharoah, K. De Foy, S. J. Ramus, I. Symmonds, A. Wilson, I. Scott, B. A. Ponder, and S. A. Gayther. 2000. Frequent loss of BRCA1 mRNA and protein expression in sporadic ovarian cancers. *Int J Cancer* **87**:317-21.
 21. King, T. A., W. Li, E. Brogi, C. J. Yee, M. L. Gemignani, N. Olvera, D. A. Levine, L. Norton, M. E. Robson, K. Offit, P. I. Borgen, and J. Boyd. 2007. Heterogenic Loss of the Wild-Type BRCA Allele in Human Breast Tumorigenesis. *Ann Surg Oncol* **14**:2510-8.
 22. Merajver, S. D., T. S. Frank, J. Xu, T. M. Pham, K. A. Calzone, P. Bennett-Baker, J. Chamberlain, J. Boyd, J. E. Garber, F. S. Collins, and et al. 1995. Germline BRCA1 mutations and loss of the wild-type allele in tumors from families with early onset breast and ovarian cancer. *Clin Cancer Res* **1**:539-44.

23. **Collins, N., R. McManus, R. Wooster, J. Mangion, S. Seal, S. R. Lakhani, W. Ormiston, P. A. Daly, D. Ford, D. F. Easton, and et al.** 1995. Consistent loss of the wild type allele in breast cancers from a family linked to the BRCA2 gene on chromosome 13q12-13. *Oncogene* **10**:1673-5.
24. **Gudmundsson, J., G. Johannesdottir, J. T. Bergthorsson, A. Arason, S. Ingvarsson, V. Egilsson, and R. B. Barkardottir.** 1995. Different tumor types from BRCA2 carriers show wild-type chromosome deletions on 13q12-q13. *Cancer Res* **55**:4830-2.
25. **Neuhausen, S. L., and C. J. Marshall.** 1994. Loss of heterozygosity in familial tumors from three BRCA1-linked kindreds. *Cancer Res* **54**:6069-72.
26. **Welsh, P. L., and M. C. King.** 2001. BRCA1 and BRCA2 and the genetics of breast and ovarian cancer. *Hum Mol Genet* **10**:705-13.
27. **Rosen, E. M., S. Fan, R. G. Pestell, and I. D. Goldberg.** 2003. BRCA1 gene in breast cancer. *J Cell Physiol* **196**:19-41.
28. **Powell, S. N.** 2005. The roles of BRCA1 and BRCA2 in the cellular response to ionizing radiation. *Radiat Res* **163**:699-700.
29. **Wooster, R., G. Bignell, J. Lancaster, S. Swift, S. Seal, J. Mangion, N. Collins, S. Gregory, C. Gumbs, and G. Micklem.** 1995. Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA2. *Nature* **378**:789-92.
30. **Deng, C. X.** 2006. BRCA1: cell cycle checkpoint, genetic instability, DNA damage response and cancer evolution. *Nucleic Acids Res* **34**:1416-26.
31. **Bignell, G., G. Micklem, M. R. Stratton, A. Ashworth, and R. Wooster.** 1997. The BRC repeats are conserved in mammalian BRCA2 proteins. *Hum Mol Genet* **6**:53-8.
32. **Bork, P., N. Blomberg, and M. Nilges.** 1996. Internal repeats in the BRCA2 protein sequence. *Nat Genet* **13**:22-3.
33. **Wong, A. K., R. Pero, P. A. Ormonde, S. V. Tavtigian, and P. L. Bartel.** 1997. RAD51 interacts with the evolutionarily conserved BRC motifs in the human breast cancer susceptibility gene brca2. *J Biol Chem* **272**:31941-4.
34. **Chen, P. L., C. F. Chen, Y. Chen, J. Xiao, Z. D. Sharp, and W. H. Lee.** 1998. The BRC repeats in BRCA2 are critical for RAD51 binding and resistance to methyl methanesulfonate treatment. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**:5287-92.

35. **Esashi, F., V. E. Galkin, X. Yu, E. H. Egelman, and S. C. West.** 2007. Stabilization of RAD51 nucleoprotein filaments by the C-terminal region of BRCA2. *Nat Struct Mol Biol* **14**:468-74.
36. **Davies, O. R., and L. Pellegrini.** 2007. Interaction with the BRCA2 C terminus protects RAD51-DNA filaments from disassembly by BRC repeats. *Nat Struct Mol Biol* **14**:475-83.
37. **Hakem, R., J. L. de la Pompa, and T. W. Mak.** 1998. Developmental studies of Brca1 and Brca2 knock-out mice. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* **3**:431-45.
38. **Ludwig, T., D. L. Chapman, V. E. Papaioannou, and A. Efstratiadis.** 1997. Targeted mutations of breast cancer susceptibility gene homologs in mice: lethal phenotypes of Brca1, Brca2, Brca1/Brca2, Brca1/p53, and Brca2/p53 nullizygous embryos. *Genes Dev* **11**:1226-41.
39. **Gowen, L. C., B. L. Johnson, A. M. Latour, K. K. Sulik, and B. H. Koller.** 1996. Brca1 deficiency results in early embryonic lethality characterized by neuroepithelial abnormalities. *Nat Genet* **12**:191-4.
40. **Sharan, S. K., M. Morimatsu, U. Albrecht, D. S. Lim, E. Regel, C. Dinh, A. Sands, G. Eichele, P. Hasty, and A. Bradley.** 1997. Embryonic lethality and radiation hypersensitivity mediated by Rad51 in mice lacking Brca2. *Nature* **386**:804-10.
41. **Suzuki, A., J. L. de la Pompa, R. Hakem, A. Elia, R. Yoshida, R. Mo, H. Nishina, T. Chuang, A. Wakeham, A. Itie, W. Koo, P. Billia, A. Ho, M. Fukumoto, C. C. Hui, and T. W. Mak.** 1997. Brca2 is required for embryonic cellular proliferation in the mouse. *Genes Dev* **11**:1242-52.
42. **Patel, K. J., V. P. Yu, H. Lee, A. Corcoran, F. C. Thistlethwaite, M. J. Evans, W. H. Colledge, L. S. Friedman, B. A. Ponder, and A. R. Venkitaraman.** 1998. Involvement of Brca2 in DNA repair. *Mol Cell* **1**:347-57.
43. **Connor, F., D. Bertwistle, P. J. Mee, G. M. Ross, S. Swift, E. Grigorieva, V. L. Tybulewicz, and A. Ashworth.** 1997. Tumorigenesis and a DNA repair defect in mice with a truncating Brca2 mutation. *Nat Genet* **17**:423-30.
44. **Mak, T. W., A. Hakem, J. P. McPherson, A. Shehabeldin, E. Zabolocki, E. Migon, G. S. Duncan, D. Bouchard, A. Wakeham, A. Cheung, J. Karaskova, I. Sarosi, J. Squire, J. Marth, and R. Hakem.** 2000. Brca1 required for T cell lineage development but not TCR loci rearrangement. *Nat Immunol* **1**:77-82.
45. **Hakem, R., J. L. de la Pompa, A. Elia, J. Potter, and T. W. Mak.** 1997. Partial rescue of Brca1 (5-6) early embryonic lethality by p53 or p21 null mutation. *Nat Genet* **16**:298-302.

46. **Brugarolas, J., and T. Jacks.** 1997. Double indemnity: p53, BRCA and cancer. p53 mutation partially rescues developmental arrest in Brca1 and Brca2 null mice, suggesting a role for familial breast cancer genes in DNA damage repair. *Nat Med* **3**:721-2.
47. **Tirkkonen, M., O. Johannsson, B. A. Agnarsson, H. Olsson, S. Ingvarsson, R. Karhu, M. Tanner, J. Isola, R. B. Barkardottir, A. Borg, and O. P. Kallioniemi.** 1997. Distinct somatic genetic changes associated with tumor progression in carriers of BRCA1 and BRCA2 germ-line mutations. *Cancer Res* **57**:1222-7.
48. **Venkitaraman, A. R.** 2002. Cancer susceptibility and the functions of BRCA1 and BRCA2. *Cell* **108**:171-82.
49. **Tutt, A., A. Gabriel, D. Bertwistle, F. Connor, H. Paterson, J. Peacock, G. Ross, and A. Ashworth.** 1999. Absence of Brca2 causes genome instability by chromosome breakage and loss associated with centrosome amplification. *Curr Biol* **9**:1107-10.
50. **Yu, V. P., M. Koehler, C. Steinlein, M. Schmid, L. A. Hanakahi, A. J. van Gool, S. C. West, and A. R. Venkitaraman.** 2000. Gross chromosomal rearrangements and genetic exchange between nonhomologous chromosomes following BRCA2 inactivation. *Genes Dev* **14**:1400-6.
51. **Vogelstein, B., and K. W. Kinzler.** 2004. Cancer genes and the pathways they control. *Nat Med* **10**:789-99.
52. **Scully, R., J. Chen, A. Plug, Y. Xiao, D. Weaver, J. Feunteun, T. Ashley, and D. M. Livingston.** 1997. Association of BRCA1 with Rad51 in mitotic and meiotic cells. *Cell* **88**:265-75.
53. **Tashiro, S., J. Walter, A. Shinohara, N. Kamada, and T. Cremer.** 2000. Rad51 accumulation at sites of DNA damage and in postreplicative chromatin. *J Cell Biol* **150**:283-91.
54. **Chen, J., D. P. Silver, D. Walpita, S. B. Cantor, A. F. Gazdar, G. Tomlinson, F. J. Couch, B. L. Weber, T. Ashley, D. M. Livingston, and R. Scully.** 1998. Stable interaction between the products of the BRCA1 and BRCA2 tumor suppressor genes in mitotic and meiotic cells. *Mol Cell* **2**:317-28.
55. **Westermarck, U. K., M. Reingold, A. B. Olshen, R. Baer, M. Jasin, and M. E. Moynahan.** 2003. BARD1 participates with BRCA1 in homology-directed repair of chromosome breaks. *Mol Cell Biol* **23**:7926-36.

56. **Moynahan, M. E., A. J. Pierce, and M. Jasin.** 2001. BRCA2 is required for homology-directed repair of chromosomal breaks. *Mol Cell* **7**:263-72.
57. **pWang, Y., D. Cortez, P. Yazdi, N. Neff, S. J. Elledge, and J. Qin.** 2000. BASC, a super complex of BRCA1-associated proteins involved in the recognition and repair of aberrant DNA structures. *Genes Dev* **14**:927-39.
58. **Foray, N., V. Randrianarison, D. Marot, M. Perricaudet, G. Lenoir, and J. Feunteun.** 1999. Gamma-rays-induced death of human cells carrying mutations of BRCA1 or BRCA2. *Oncogene* **18**:7334-42.
59. **Abbott, D. W., M. L. Freeman, and J. T. Holt.** 1998. Double-strand break repair deficiency and radiation sensitivity in BRCA2 mutant cancer cells. *J Natl Cancer Inst* **90**:978-85.
60. **Zheng, L., S. Li, T. G. Boyer, and W. H. Lee.** 2000. Lessons learned from BRCA1 and BRCA2. *Oncogene* **19**:6159-75.
61. **Moynahan, M. E., J. W. Chiu, B. H. Koller, and M. Jasin.** 1999. Brca1 controls homology-directed DNA repair. *Mol Cell* **4**:511-8.
62. **Moynahan, M. E., T. Y. Cui, and M. Jasin.** 2001. Homology-directed dna repair, mitomycin-c resistance, and chromosome stability is restored with correction of a Brca1 mutation. *Cancer Res* **61**:4842-50.
63. **Snouwaert, J. N., L. C. Gowen, A. M. Latour, A. R. Mohn, A. Xiao, L. DiBiase, and B. H. Koller.** 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**:7900-7.
64. **Bhattacharyya, A., U. S. Ear, B. H. Koller, R. R. Weichselbaum, and D. K. Bishop.** 2000. The breast cancer susceptibility gene BRCA1 is required for subnuclear assembly of Rad51 and survival following treatment with the DNA cross-linking agent cisplatin. *J Biol Chem* **275**:23899-903.
65. **Tutt, A., D. Bertwistle, J. Valentine, A. Gabriel, S. Swift, G. Ross, C. Griffin, J. Thacker, and A. Ashworth.** 2001. Mutation in Brca2 stimulates error-prone homology-directed repair of DNA double-strand breaks occurring between repeated sequences. *Embo J* **20**:4704-16.
66. **Rothfuss, A., and M. Grompe.** 2004. Repair kinetics of genomic interstrand DNA cross-links: evidence for DNA double-strand break-dependent activation of the Fanconi anemia/BRCA pathway. *Mol Cell Biol* **24**:123-34.

67. **Dronkert, M. L., and R. Kanaar.** 2001. Repair of DNA interstrand cross-links. *Mutat Res* **486**:217-47.
68. **McHugh, P. J., W. R. Sones, and J. A. Hartley.** 2000. Repair of intermediate structures produced at DNA interstrand cross-links in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **20**:3425-33.
69. **De Silva, I. U., P. J. McHugh, P. H. Clingen, and J. A. Hartley.** 2000. Defining the roles of nucleotide excision repair and recombination in the repair of DNA interstrand cross-links in mammalian cells. *Mol Cell Biol* **20**:7980-90.
70. **Scully, R., S. Ganesan, K. Vlasakova, J. Chen, M. Socolovsky, and D. M. Livingston.** 1999. Genetic analysis of BRCA1 function in a defined tumor cell line. *Mol Cell* **4**:1093-9.
71. **van Gent, D. C., J. H. Hoeijmakers, and R. Kanaar.** 2001. Chromosomal stability and the DNA double-stranded break connection. *Nat Rev Genet* **2**:196-206.
72. **Karran, P.** 2000. DNA double strand break repair in mammalian cells. *Curr Opin Genet Dev* **10**:144-50.
73. **Haber, J. E.** 1992. Exploring the pathways of homologous recombination. *Curr Opin Cell Biol* **4**:401-12.
74. **Takata, M., M. S. Sasaki, E. Sonoda, C. Morrison, M. Hashimoto, H. Utsumi, Y. Yamaguchi-Iwai, A. Shinohara, and S. Takeda.** 1998. Homologous recombination and non-homologous end-joining pathways of DNA double-strand break repair have overlapping roles in the maintenance of chromosomal integrity in vertebrate cells. *Embo J* **17**:5497-508.
75. **Rothkamm, K., I. Kruger, L. H. Thompson, and M. Lobrich.** 2003. Pathways of DNA double-strand break repair during the mammalian cell cycle. *Mol Cell Biol* **23**:5706-15.
76. **Lettier, G., Q. Feng, A. A. de Mayolo, N. Erdeniz, R. J. Reid, M. Lisby, U. H. Mortensen, and R. Rothstein.** 2006. The role of DNA double-strand breaks in spontaneous homologous recombination in *S. cerevisiae*. *PLoS Genet* **2**:e194.
77. **Meselson, M. S., and C. M. Radding.** 1975. A general model for genetic recombination. *Proc Natl Acad Sci U S A* **72**:358-61.
78. **Paull, T. T., and M. Gellert.** 1998. The 3' to 5' exonuclease activity of Mre 11 facilitates repair of DNA double-strand breaks. *Mol Cell* **1**:969-79.

79. **Wold, M. S.** 1997. Replication protein A: a heterotrimeric, single-stranded DNA-binding protein required for eukaryotic DNA metabolism. *Annu Rev Biochem* **66**:61-92.
80. **Van Dyck, E., A. Z. Stasiak, A. Stasiak, and S. C. West.** 1999. Binding of double-strand breaks in DNA by human Rad52 protein. *Nature* **398**:728-31.
81. **Baumann, P., and S. C. West.** 1997. The human Rad51 protein: polarity of strand transfer and stimulation by hRP-A. *Embo J* **16**:5198-206.
82. **Benson, F. E., P. Baumann, and S. C. West.** 1998. Synergistic actions of Rad51 and Rad52 in recombination and DNA repair. *Nature* **391**:401-4.
83. **Baumann, P., F. E. Benson, and S. C. West.** 1996. Human Rad51 protein promotes ATP-dependent homologous pairing and strand transfer reactions in vitro. *Cell* **87**:757-66.
84. **Paques, F., and J. E. Haber.** 1999. Multiple pathways of recombination induced by double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev* **63**:349-404.
85. **Sonoda, E., M. S. Sasaki, J. M. Buerstedde, O. Bezzubova, A. Shinohara, H. Ogawa, M. Takata, Y. Yamaguchi-Iwai, and S. Takeda.** 1998. Rad51-deficient vertebrate cells accumulate chromosomal breaks prior to cell death. *Embo J* **17**:598-608.
86. **Lim, D. S., and P. Hasty.** 1996. A mutation in mouse rad51 results in an early embryonic lethal that is suppressed by a mutation in p53. *Mol Cell Biol* **16**:7133-43.
87. **Tsuzuki, T., Y. Fujii, K. Sakumi, Y. Tominaga, K. Nakao, M. Sekiguchi, A. Matsushiro, Y. Yoshimura, and Morita T.** 1996. Targeted disruption of the Rad51 gene leads to lethality in embryonic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**:6236-40.
88. **Khanna, K. K., and S. P. Jackson.** 2001. DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. *Nat Genet* **27**:247-54.
89. **Yoshikawa, K., T. Ogawa, R. Baer, H. Hemmi, K. Honda, A. Yamauchi, T. Inamoto, K. Ko, S. Yazumi, H. Motoda, H. Kodama, S. Noguchi, A. F. Gazdar, Y. Yamaoka, and R. Takahashi.** 2000. Abnormal expression of BRCA1 and BRCA1-interactive DNA-repair proteins in breast carcinomas. *Int J Cancer* **88**:28-36.
90. **Kato, M., K. Yano, F. Matsuo, H. Saito, T. Katagiri, H. Kurumizaka, M. Yoshimoto, F. Kasumi, F. Akiyama, G. Sakamoto, H. Nagawa, Y. Nakamura,**

- and **Y. Miki**. 2000. Identification of Rad51 alteration in patients with bilateral breast cancer. *J Hum Genet* **45**:133-7.
91. **Gonzalez, R., J. M. Silva, G. Dominguez, J. M. Garcia, G. Martinez, J. Vargas, M. Provencio, P. Espana, and F. Bonilla**. 1999. Detection of loss of heterozygosity at RAD51, RAD52, RAD54 and BRCA1 and BRCA2 loci in breast cancer: pathological correlations. *Br J Cancer* **81**:503-9.
 92. **Vispe, S., C. Cazaux, C. Lesca, and M. Defais**. 1998. Overexpression of Rad51 protein stimulates homologous recombination and increases resistance of mammalian cells to ionizing radiation. *Nucleic Acids Res* **26**:2859-64.
 93. **Maacke, H., K. Jost, S. Opitz, S. Miska, Y. Yuan, L. Hasselbach, J. Luttes, H. Kalthoff, and H. W. Sturzbecher**. 2000. DNA repair and recombination factor Rad51 is over-expressed in human pancreatic adenocarcinoma. *Oncogene* **19**:2791-5.
 94. **Maacke, H., S. Opitz, K. Jost, W. Hamdorf, W. Henning, S. Kruger, A. C. Feller, A. Lopens, K. Diedrich, E. Schwinger, and H. W. Sturzbecher**. 2000. Over-expression of wild-type Rad51 correlates with histological grading of invasive ductal breast cancer. *Int J Cancer* **88**:907-13.
 95. **Szostak, J. W., T. L. Orr-Weaver, R. J. Rothstein, and F. W. Stahl**. 1983. The double-strand-break repair model for recombination. *Cell* **33**:25-35.
 96. **Orr-Weaver, T. L., A. Nicolas, and J. W. Szostak**. 1988. Gene conversion adjacent to regions of double-strand break repair. *Mol Cell Biol* **8**:5292-8.
 97. **West, S. C.** 2003. Molecular views of recombination proteins and their control. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**:435-45.
 98. **Johnson, R. D., and M. Jasin**. 2000. Sister chromatid gene conversion is a prominent double-strand break repair pathway in mammalian cells. *Embo J* **19**:3398-407.
 99. **Belmaaza, A., and P. Chartrand**. 1994. One-sided invasion events in homologous recombination at double-strand breaks. *Mutat Res* **314**:199-208.
 100. **Holliday, R.** 1964. A mechanism for gene conversion in fungi. *Genet. Res.* **5**:232-304.
 101. **Mohaghegh, P., and I. D. Hickson**. 2001. DNA helicase deficiencies associated with cancer predisposition and premature ageing disorders. *Hum Mol Genet* **10**:741-6.

102. **Simchen, G., and Y. Hugerat.** 1993. What determines whether chromosomes segregate reductionally or equationally in meiosis? *Bioessays* **15**:1-8.
103. **Smith, K. N., and A. Nicolas.** 1998. Recombination at work for meiosis. *Curr Opin Genet Dev* **8**:200-11.
104. **Helleday, T.** 2003. Pathways for mitotic homologous recombination in mammalian cells. *Mutat Res* **532**:103-15.
105. **Kolomietz, E., M. S. Meyn, A. Pandita, and J. A. Squire.** 2002. The role of Alu repeat clusters as mediators of recurrent chromosomal aberrations in tumors. *Genes Chromosomes Cancer* **35**:97-112.
106. **Tanooka, H., A. Ootsuyama, and H. Sasaki.** 1998. Homologous recombination between p53 and its pseudogene in a radiation-induced mouse tumor. *Cancer Res* **58**:5649-51.
107. **Cavenee, W. K., T. P. Dryja, R. A. Phillips, W. F. Benedict, R. Godbout, B. L. Gallie, A. L. Murphree, L. C. Strong, and R. L. White.** 1983. Expression of recessive alleles by chromosomal mechanisms in retinoblastoma. *Nature* **305**:779-84.
108. **Slebos, R. J., M. A. Resnick, and J. A. Taylor.** 1998. Inactivation of the p53 tumor suppressor gene via a novel Alu rearrangement. *Cancer Res* **58**:5333-6.
109. **Revenkova, E., M. Eijpe, C. Heyting, C. A. Hodges, P. A. Hunt, B. Liebe, H. Scherthan, and R. Jessberger.** 2004. Cohesin SMC1 beta is required for meiotic chromosome dynamics, sister chromatid cohesion and DNA recombination. *Nat Cell Biol* **6**:555-62.
110. **Cortes-Ledesma, F., G. de Piccoli, J. E. Haber, L. Aragon, and A. Aguilera.** 2007. SMC proteins, new players in the maintenance of genomic stability. *Cell Cycle* **6**:914-8.
111. **Sjogren, C., and K. Nasmyth.** 2001. Sister chromatid cohesion is required for postreplicative double-strand break repair in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Biol* **11**:991-5.
112. **Schar, P., M. Fasi, and R. Jessberger.** 2004. SMC1 coordinates DNA double-strand break repair pathways. *Nucleic Acids Res* **32**:3921-9.
113. **Strom, L., H. B. Lindroos, K. Shirahige, and C. Sjogren.** 2004. Postreplicative recruitment of cohesin to double-strand breaks is required for DNA repair. *Mol Cell* **16**:1003-15.

114. **Sonoda, E., T. Matsusaka, C. Morrison, P. Vagnarelli, O. Hoshi, T. Ushiki, K. Nojima, T. Fukagawa, I. C. Waizenegger, J. M. Peters, W. C. Earnshaw, and S. Takeda.** 2001. Scc1/Rad21/Mcd1 is required for sister chromatid cohesion and kinetochore function in vertebrate cells. *Dev Cell* **1**:759-70.
115. **Cortes-Ledesma, F., and A. Aguilera.** 2006. Double-strand breaks arising by replication through a nick are repaired by cohesin-dependent sister-chromatid exchange. *EMBO Rep* **7**:919-26.
116. **Shaposhnikov, S. A., S. B. Akopov, I. P. Chernov, P. D. Thomsen, C. Joergensen, A. R. Collins, E. Frengen, and L. G. Nikolaev.** 2007. A map of nuclear matrix attachment regions within the breast cancer loss-of-heterozygosity region on human chromosome 16q22.1. *Genomics* **89**:354-61.
117. **Ma, H., A. J. Siegel, and R. Berezney.** 1999. Association of chromosome territories with the nuclear matrix. Disruption of human chromosome territories correlates with the release of a subset of nuclear matrix proteins. *J Cell Biol* **146**:531-42.
118. **Cook, P. R.** 1999. The organization of replication and transcription. *Science* **284**:1790-5.
119. **Bischof, O., S. H. Kim, J. Irving, S. Beresten, N. A. Ellis, and J. Campisi.** 2001. Regulation and localization of the Bloom syndrome protein in response to DNA damage. *J Cell Biol* **153**:367-80.
120. **D'Andrea, A. D., and M. Grompe.** 2003. The Fanconi anaemia/BRCA pathway. *Nat Rev Cancer* **3**:23-34.
121. **Mladenov, E., B. Anachkova, and I. Tsaneva.** 2006. Sub-nuclear localization of Rad51 in response to DNA damage. *Genes Cells* **11**:513-24.
122. **Qiao, F., A. Moss, and G. M. Kupfer.** 2001. Fanconi anemia proteins localize to chromatin and the nuclear matrix in a DNA damage- and cell cycle-regulated manner. *J Biol Chem* **276**:23391-6.
123. **Mladenov, E., I. Tsaneva, and B. Anachkova.** 2007. Activation of the S phase DNA damage checkpoint by mitomycin C. *J Cell Physiol* **211**:468-76.
124. **Huber, L. J., and L. A. Chodosh.** 2005. Dynamics of DNA repair suggested by the subcellular localization of Brca1 and Brca2 proteins. *J Cell Biochem* **96**:47-55.
125. **Atanassov, B., A. Gospodinov, I. Stoimenov, E. Mladenov, G. Russev, I. Tsaneva, and B. Anachkova.** 2005. Repair of DNA interstrand crosslinks may take place at the nuclear matrix. *J Cell Biochem* **96**:126-36.

126. **Campbell, C., I. Marondel, K. Montgomery, K. Krauter, and R. Kucherlapati.** 1995. Unequal homologous recombination of human DNA on a yeast artificial chromosome. *Nucleic Acids Res* **23**:3691-5.
127. **Elliott, B., C. Richardson, and M. Jasin.** 2005. Chromosomal translocation mechanisms at intronic alu elements in mammalian cells. *Mol Cell* **17**:885-94.
128. **Batzer, M. A., and P. L. Deininger.** 2002. Alu repeats and human genomic diversity. *Nat Rev Genet* **3**:370-9.
129. **Tremblay, A., M. Jasin, and P. Chartrand.** 2000. A double-strand break in a chromosomal LINE element can be repaired by gene conversion with various endogenous LINE elements in mouse cells. *Mol Cell Biol* **20**:54-60.
130. **Deininger, P. L., and M. A. Batzer.** 1999. Alu repeats and human disease. *Mol Genet Metab* **67**:183-93.
131. **Chen, W., and S. Jinks-Robertson.** 1999. The role of the mismatch repair machinery in regulating mitotic and meiotic recombination between diverged sequences in yeast. *Genetics* **151**:1299-313.
132. **Hedges, D. J., and P. L. Deininger.** 2007. Inviting instability: Transposable elements, double-strand breaks, and the maintenance of genome integrity. *Mutat Res* **616**:46-59.
133. **Mieczkowski, P. A., F. J. Lemoine, and T. D. Petes.** 2006. Recombination between retrotransposons as a source of chromosome rearrangements in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *DNA Repair (Amst)* **5**:1010-20.
134. **Uddin, R. K., Y. Zhang, V. M. Siu, Y. S. Fan, R. L. O'Reilly, J. Rao, and S. M. Singh.** 2006. Breakpoint Associated with a novel 2.3 Mb deletion in the VCFS region of 22q11 and the role of Alu (SINE) in recurring microdeletions. *BMC Med Genet* **7**:18.
135. **Smit, A. F.** 1999. Interspersed repeats and other mementos of transposable elements in mammalian genomes. *Curr Opin Genet Dev* **9**:657-63.
136. **Shaw, C. J., and J. R. Lupski.** 2004. Implications of human genome architecture for rearrangement-based disorders: the genomic basis of disease. *Hum Mol Genet* **13 Spec No 1**:R57-64.
137. **Bellosillo, B., and I. Tusquets.** 2006. Pitfalls and caveats in BRCA sequencing. *Ultrastruct Pathol* **30**:229-35.
138. **Thompson, L. H., K. W. Brookman, L. E. Dillehay, A. V. Carrano, J. A. Mazrimas, C. L. Mooney, and J. L. Minkler.** 1982. A CHO-cell strain having

hypersensitivity to mutagens, a defect in DNA strand-break repair, and an extraordinary baseline frequency of sister-chromatid exchange. *Mutat Res* **95**:427-40.

139. **Saleh-Gohari, N., H. E. Bryant, N. Schultz, K. M. Parker, T. N. Cassel, and T. Helleday.** 2005. Spontaneous homologous recombination is induced by collapsed replication forks that are caused by endogenous DNA single-strand breaks. *Mol Cell Biol* **25**:7158-69.
140. **Wang, Z. Q., L. Stingl, C. Morrison, M. Jantsch, M. Los, K. Schulze-Osthoff, and E. F. Wagner.** 1997. PARP is important for genomic stability but dispensable in apoptosis. *Genes Dev* **11**:2347-58.
141. **Schreiber, V., D. Hunting, C. Trucco, B. Gowans, D. Grunwald, G. De Murcia, and J. M. De Murcia.** 1995. A dominant-negative mutant of human poly(ADP-ribose) polymerase affects cell recovery, apoptosis, and sister chromatid exchange following DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**:4753-7.
142. **Carrano, A. V., L. H. Thompson, P. A. Lindl, and J. L. Minkler.** 1978. Sister chromatid exchange as an indicator of mutagenesis. *Nature* **271**:551-3.
143. **Stoilov, L., A. Wojcik, A. K. Giri, and G. Obe.** 2002. SCE formation after exposure of CHO cells prelabelled with BrdU or biotin-dUTP to various DNA-damaging agents. *Mutagenesis* **17**:399-403.
144. **Wolff, S., J. Bodycote, and R. B. Painter.** 1974. Sister chromatid exchanges induced in Chinese hamster cells by UV irradiation of different stages of the cell cycle: the necessity for cells to pass through S. *Mutat Res* **25**:73-81.
145. **Sonoda, E., M. S. Sasaki, C. Morrison, Y. Yamaguchi-Iwai, M. Takata, and S. Takeda.** 1999. Sister chromatid exchanges are mediated by homologous recombination in vertebrate cells. *Mol Cell Biol* **19**:5166-9.
146. **Wilson, D. M., 3rd, and L. H. Thompson.** 2007. Molecular mechanisms of sister-chromatid exchange. *Mutat Res* **616**:11-23.
147. **Lambert, S., Y. Saintigny, F. Delacote, F. Amiot, B. Chaput, M. Lecomte, S. Huck, P. Bertrand, and B. S. Lopez.** 1999. Analysis of intrachromosomal homologous recombination in mammalian cell, using tandem repeat sequences. *Mutat Res* **433**:159-68.
148. **Jasin, M.** 1996. Genetic manipulation of genomes with rare-cutting endonucleases. *Trends Genet* **12**:224-8.

149. **Burma, S., B. P. Chen, M. Murphy, A. Kurimasa, and D. J. Chen.** 2001. ATM phosphorylates histone H2AX in response to DNA double-strand breaks. *J Biol Chem* **276**:42462-7.
150. **Nakamura, T. M., L. L. Du, C. Redon, and P. Russell.** 2004. Histone H2A phosphorylation controls Crb2 recruitment at DNA breaks, maintains checkpoint arrest, and influences DNA repair in fission yeast. *Mol Cell Biol* **24**:6215-30.
151. **Celeste, A., O. Fernandez-Capetillo, M. J. Kruhlak, D. R. Pilch, D. W. Staudt, A. Lee, R. F. Bonner, W. M. Bonner, and A. Nussenzweig.** 2003. Histone H2AX phosphorylation is dispensable for the initial recognition of DNA breaks. *Nat Cell Biol* **5**:675-9.
152. **Nelms, B. E., R. S. Maser, J. F. MacKay, M. G. Lagally, and J. H. Petrini.** 1998. In situ visualization of DNA double-strand break repair in human fibroblasts. *Science* **280**:590-2.
153. **Zhong, Q., C. F. Chen, S. Li, Y. Chen, C. C. Wang, J. Xiao, P. L. Chen, Z. D. Sharp, and W. H. Lee.** 1999. Association of BRCA1 with the hRad50-hMre11-p95 complex and the DNA damage response. *Science* **285**:747-50.
154. **Paull, T. T., E. P. Rogakou, V. Yamazaki, C. U. Kirchgessner, M. Gellert, and W. M. Bonner.** 2000. A critical role for histone H2AX in recruitment of repair factors to nuclear foci after DNA damage. *Curr Biol* **10**:886-95.
155. **Greenberg, R. A., B. Sobhian, S. Pathania, S. B. Cantor, Y. Nakatani, and D. M. Livingston.** 2006. Multifactorial contributions to an acute DNA damage response by BRCA1/BARD1-containing complexes. *Genes Dev* **20**:34-46.
156. **Cortez, D., Y. Wang, J. Qin, and S. J. Elledge.** 1999. Requirement of ATM-dependent phosphorylation of brca1 in the DNA damage response to double-strand breaks. *Science* **286**:1162-6.
157. **Gatei, M., S. P. Scott, I. Filippovitch, N. Soronika, M. F. Lavin, B. Weber, and K. K. Khanna.** 2000. Role for ATM in DNA damage-induced phosphorylation of BRCA1. *Cancer Res* **60**:3299-304.
158. **Tibbetts, R. S., D. Cortez, K. M. Brumbaugh, R. Scully, D. Livingston, S. J. Elledge, and R. T. Abraham.** 2000. Functional interactions between BRCA1 and the checkpoint kinase ATR during genotoxic stress. *Genes Dev* **14**:2989-3002.
159. **Foray, N., D. Marot, A. Gabriel, V. Randrianarison, A. M. Carr, M. Perricaudet, A. Ashworth, and P. Jeggo.** 2003. A subset of ATM- and ATR-dependent phosphorylation events requires the BRCA1 protein. *Embo J* **22**:2860-71.

160. **Lee, J. S., K. M. Collins, A. L. Brown, C. H. Lee, and J. H. Chung.** 2000. hCds1-mediated phosphorylation of BRCA1 regulates the DNA damage response. *Nature* **404**:201-4.
161. **Zhang, J., H. Willers, Z. Feng, J. C. Ghosh, S. Kim, D. T. Weaver, J. H. Chung, S. N. Powell, and F. Xia.** 2004. Chk2 phosphorylation of BRCA1 regulates DNA double-strand break repair. *Mol Cell Biol* **24**:708-18.
162. **Gatei, M., B. B. Zhou, K. Hobson, S. Scott, D. Young, and K. K. Khanna.** 2001. Ataxia telangiectasia mutated (ATM) kinase and ATM and Rad3 related kinase mediate phosphorylation of Brcal at distinct and overlapping sites. In vivo assessment using phospho-specific antibodies. *J Biol Chem* **276**:17276-80.
163. **Shen, S. X., Z. Weaver, X. Xu, C. Li, M. Weinstein, L. Chen, X. Y. Guan, T. Ried, and C. X. Deng.** 1998. A targeted disruption of the murine Brcal gene causes gamma-irradiation hypersensitivity and genetic instability. *Oncogene* **17**:3115-24.
164. **McCarthy, E. E., J. T. Celebi, R. Baer, and T. Ludwig.** 2003. Loss of Bard1, the heterodimeric partner of the Brcal tumor suppressor, results in early embryonic lethality and chromosomal instability. *Mol Cell Biol* **23**:5056-63.
165. **Foray, N., D. Marot, V. Randrianarison, N. D. Venezia, D. Picard, M. Perricaudet, V. Favaudon, and P. Jeggo.** 2002. Constitutive association of BRCA1 and c-Abl and its ATM-dependent disruption after irradiation. *Mol Cell Biol* **22**:4020-32.
166. **Yuan, Z. M., Y. Huang, T. Ishiko, S. Nakada, T. Utsugisawa, S. Kharbanda, R. Wang, P. Sung, A. Shinohara, R. Weichselbaum, and D. Kufe.** 1998. Regulation of Rad51 function by c-Abl in response to DNA damage. *J Biol Chem* **273**:3799-802.
167. **Conilleau, S., Y. Takizawa, H. Tachiwana, F. Fleury, H. Kurumizaka, and M. Takahashi.** 2004. Location of Tyrosine 315, a Target for Phosphorylation by cAbl Tyrosine Kinase, at the Edge of the Subunit-Subunit Interface of the Human Rad51 Filament. *J Mol Biol* **339**:797-804.
168. **Slupianek, A., C. Schmutte, G. Tomblin, M. Nieborowska-Skorska, G. Hoser, M. O. Nowicki, A. J. Pierce, R. Fishel, and T. Skorski.** 2001. BCR/ABL regulates mammalian RecA homologs, resulting in drug resistance. *Mol Cell* **8**:795-806.
169. **Pellegrini, L., and A. Venkitaraman.** 2004. Emerging functions of BRCA2 in DNA recombination. *Trends Biochem Sci* **29**:310-6.

170. **Gudmundsdottir, K., and A. Ashworth.** 2006. The roles of BRCA1 and BRCA2 and associated proteins in the maintenance of genomic stability. *Oncogene* **25**:5864-74.
171. **Paull, T. T., D. Cortez, B. Bowers, S. J. Elledge, and M. Gellert.** 2001. Direct DNA binding by Brca1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**:6086-91.
172. **Stark, J. M., A. J. Pierce, J. Oh, A. Pastink, and M. Jasin.** 2004. Genetic steps of mammalian homologous repair with distinct mutagenic consequences. *Mol Cell Biol* **24**:9305-16.
173. **Unal, E., A. Arbel-Eden, U. Sattler, R. Shroff, M. Lichten, J. E. Haber, and D. Koshland.** 2004. DNA damage response pathway uses histone modification to assemble a double-strand break-specific cohesin domain. *Mol Cell* **16**:991-1002.
174. **cKitagawa, R., C. J. Bakkenist, P. J. McKinnon, and M. B. Kastan.** 2004. Phosphorylation of SMC1 is a critical downstream event in the ATM-NBS1-BRCA1 pathway. *Genes Dev* **18**:1423-38.
175. **Kim, S. T., B. Xu, and M. B. Kastan.** 2002. Involvement of the cohesin protein, Smc1, in Atm-dependent and independent responses to DNA damage. *Genes Dev* **16**:560-70.
176. **Yazdi, P. T., Y. Wang, S. Zhao, N. Patel, E. Y. Lee, and J. Qin.** 2002. SMC1 is a downstream effector in the ATM/NBS1 branch of the human S-phase checkpoint. *Genes Dev* **16**:571-82.
177. **Garg, R., S. Callens, D. S. Lim, C. E. Canman, M. B. Kastan, and B. Xu.** 2004. Chromatin association of rad17 is required for an ataxia telangiectasia and rad-related kinase-mediated S-phase checkpoint in response to low-dose ultraviolet radiation. *Mol Cancer Res* **2**:362-9.
178. **Lindroos, H. B., L. Strom, T. Itoh, Y. Katou, K. Shirahige, and C. Sjogren.** 2006. Chromosomal association of the Smc5/6 complex reveals that it functions in differently regulated pathways. *Mol Cell* **22**:755-67.
179. **Lehmann, A. R.** 2005. The role of SMC proteins in the responses to DNA damage. *DNA Repair (Amst)* **4**:309-14.
180. **De Piccoli, G., F. Cortes-Ledesma, G. Ira, J. Torres-Rosell, S. Uhle, S. Farmer, J. Y. Hwang, F. Machin, A. Ceschia, A. McAleenan, V. Cordon-Preciado, A. Clemente-Blanco, F. Vilella-Mitjana, P. Ullal, A. Jarmuz, B. Leitao, D. Bressan, F. Dotiwala, A. Papusha, X. Zhao, K. Myung, J. E. Haber, A. Aguilera, and L. Aragon.** 2006. Smc5-Smc6 mediate DNA double-strand-break repair by promoting sister-chromatid recombination. *Nat Cell Biol* **8**:1032-4.

181. **Potts, P. R., M. H. Porteus, and H. Yu.** 2006. Human SMC5/6 complex promotes sister chromatid homologous recombination by recruiting the SMC1/3 cohesin complex to double-strand breaks. *Embo J* **25**:3377-88.
182. **Tarsounas, M., D. Davies, and S. C. West.** 2003. BRCA2-dependent and independent formation of RAD51 nuclear foci. *Oncogene* **22**:1115-23.
183. **Yu, D. S., E. Sonoda, S. Takeda, C. L. Huang, L. Pellegrini, T. L. Blundell, and A. R. Venkitaraman.** 2003. Dynamic control of Rad51 recombinase by self-association and interaction with BRCA2. *Mol Cell* **12**:1029-41.
184. **Lomonosov, M., S. Anand, M. Sangrithi, R. Davies, and A. R. Venkitaraman.** 2003. Stabilization of stalled DNA replication forks by the BRCA2 breast cancer susceptibility protein. *Genes Dev* **17**:3017-22.
185. **Galkin, V. E., F. Esashi, X. Yu, S. Yang, S. C. West, and E. H. Egelman.** 2005. BRCA2 BRC motifs bind RAD51-DNA filaments. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**:8537-42.
186. **Pellegrini, L., D. S. Yu, T. Lo, S. Anand, M. Lee, T. L. Blundell, and A. R. Venkitaraman.** 2002. Insights into DNA recombination from the structure of a RAD51-BRCA2 complex. *Nature* **420**:287-93.
187. **Chen, C. F., P. L. Chen, Q. Zhong, Z. D. Sharp, and W. H. Lee.** 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**:32931-5.
188. **Davies, A. A., J. Y. Masson, M. J. McIlwraith, A. Z. Stasiak, A. Stasiak, A. R. Venkitaraman, and S. C. West.** 2001. Role of BRCA2 in control of the RAD51 recombination and DNA repair protein. *Mol Cell* **7**:273-82.
189. **Yang, H., Q. Li, J. Fan, W. K. Holloman, and N. P. Pavletich.** 2005. The BRCA2 homologue Brh2 nucleates RAD51 filament formation at a dsDNA-ssDNA junction. *Nature* **433**:653-7.
190. **Morimatsu, K., and S. C. Kowalczykowski.** 2003. RecFOR proteins load RecA protein onto gapped DNA to accelerate DNA strand exchange: a universal step of recombinational repair. *Mol Cell* **11**:1337-47.
191. **Kojic, M., H. Yang, C. F. Kostrub, N. P. Pavletich, and W. K. Holloman.** 2003. The BRCA2-interacting protein DSS1 is vital for DNA repair, recombination, and genome stability in *Ustilago maydis*. *Mol Cell* **12**:1043-9.

192. **Wong, J. M., D. Ionescu, and C. J. Ingles.** 2003. Interaction between BRCA2 and replication protein A is compromised by a cancer-predisposing mutation in BRCA2. *Oncogene* **22**:28-33.
193. **Yang, H., P. D. Jeffrey, J. Miller, E. Kinnucan, Y. Sun, N. H. Thoma, N. Zheng, P. L. Chen, W. H. Lee, and N. P. Pavletich.** 2002. BRCA2 function in DNA binding and recombination from a BRCA2-DSS1-ssDNA structure. *Science* **297**:1837-48.
194. **Esashi, F., N. Christ, J. Gannon, Y. Liu, T. Hunt, M. Jasin, and S. C. West.** 2005. CDK-dependent phosphorylation of BRCA2 as a regulatory mechanism for recombinational repair. *Nature* **434**:598-604.
195. **Orelli, B. J., and D. K. Bishop.** 2001. BRCA2 and homologous recombination. *Breast Cancer Res* **3**:294-8.
196. **San Filippo, J., P. Chi, M. G. Sehorn, J. Etchin, L. Krejci, and P. Sung.** 2006. Recombination mediator and Rad51 targeting activities of a human BRCA2 polypeptide. *J Biol Chem* **281**:11649-57.
197. **Saeki, H., N. Siaud, N. Christ, W. W. Wiegant, P. P. van Buul, M. Han, M. Z. Zdzienicka, J. M. Stark, and M. Jasin.** 2006. Suppression of the DNA repair defects of BRCA2-deficient cells with heterologous protein fusions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**:8768-73.
198. **Larminat, F., M. Germanier, E. Papouli, and M. Defais.** 2002. Deficiency in BRCA2 leads to increase in non-conservative homologous recombination. *Oncogene* **21**:5188-92.
199. **Hefferin, M. L., and A. E. Tomkinson.** 2005. Mechanism of DNA double-strand break repair by non-homologous end joining. *DNA Repair (Amst)* **4**:639-48.
200. **D'Amours, D., and S. P. Jackson.** 2002. The Mre11 complex: at the crossroads of dna repair and checkpoint signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**:317-27.
201. **Luo, G., M. S. Yao, C. F. Bender, M. Mills, A. R. Bladl, A. Bradley, and J. H. Petrini.** 1999. Disruption of mRad50 causes embryonic stem cell lethality, abnormal embryonic development, and sensitivity to ionizing radiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**:7376-81.
202. **Yamaguchi-Iwai, Y., E. Sonoda, M. S. Sasaki, C. Morrison, T. Haraguchi, Y. Hiraoka, Y. M. Yamashita, T. Yagi, M. Takata, C. Price, N. Kakazu, and S. Takeda.** 1999. Mre11 is essential for the maintenance of chromosomal DNA in vertebrate cells. *Embo J* **18**:6619-29.

203. **Zhu, J., S. Petersen, L. Tessarollo, and A. Nussenzweig.** 2001. Targeted disruption of the Nijmegen breakage syndrome gene NBS1 leads to early embryonic lethality in mice. *Curr Biol* **11**:105-9.
204. **Averbeck, D.** 2000. [Mechanisms of repair and radiation-induced mutagenesis in higher eukaryotes]. *Cancer Radiother* **4**:335-54.
205. **Burma, S., B. P. Chen, and D. J. Chen.** 2006. Role of non-homologous end joining (NHEJ) in maintaining genomic integrity. *DNA Repair (Amst)* **5**:1042-8.
206. **Wang, H., Z. C. Zeng, T. A. Bui, S. J. DiBiase, W. Qin, F. Xia, S. N. Powell, and G. Iliakis.** 2001. Nonhomologous end-joining of ionizing radiation-induced DNA double-stranded breaks in human tumor cells deficient in BRCA1 or BRCA2. *Cancer Res* **61**:270-7.
207. **Bau, D. T., Y. C. Mau, and C. Y. Shen.** 2006. The role of BRCA1 in non-homologous end-joining. *Cancer Lett* **240**:1-8.
208. **Zhuang, J., J. Zhang, H. Willers, H. Wang, J. H. Chung, D. C. van Gent, D. E. Hallahan, S. N. Powell, and F. Xia.** 2006. Checkpoint kinase 2-mediated phosphorylation of BRCA1 regulates the fidelity of nonhomologous end-joining. *Cancer Res* **66**:1401-8.
209. **Wang, H. C., W. C. Chou, S. Y. Shieh, and C. Y. Shen.** 2006. Ataxia telangiectasia mutated and checkpoint kinase 2 regulate BRCA1 to promote the fidelity of DNA end-joining. *Cancer Res* **66**:1391-400.
210. **Baldeyron, C., E. Jacquemin, J. Smith, C. Jacquemont, I. De Oliveira, S. Gad, J. Feunteun, D. Stoppa-Lyonnet, and D. Papadopoulos.** 2002. A single mutated BRCA1 allele leads to impaired fidelity of double strand break end-joining. *Oncogene* **21**:1401-10.
211. **Zhong, Q., T. G. Boyer, P. L. Chen, and W. H. Lee.** 2002. Deficient nonhomologous end-joining activity in cell-free extracts from Brcal-null fibroblasts. *Cancer Res* **62**:3966-70.
212. **Bau, D. T., Y. P. Fu, S. T. Chen, T. C. Cheng, J. C. Yu, P. E. Wu, and C. Y. Shen.** 2004. Breast cancer risk and the DNA double-strand break end-joining capacity of nonhomologous end-joining genes are affected by BRCA1. *Cancer Res* **64**:5013-9.
213. **Merel, P., A. Prieur, P. Pfeiffer, and O. Delattre.** 2002. Absence of major defects in non-homologous DNA end joining in human breast cancer cell lines. *Oncogene* **21**:5654-9.

214. **Coupiér, I., C. Baldeyron, A. Rousseau, V. Mosseri, S. Pages-Berhouet, V. Caux-Moncoutier, D. Papadopoulo, and D. Stoppa-Lyonnet.** 2004. Fidelity of DNA double-strand break repair in heterozygous cell lines harbouring BRCA1 missense mutations. *Oncogene* **23**:914-9.
215. **Lin, F. L., K. Sperle, and N. Sternberg.** 1984. Model for homologous recombination during transfer of DNA into mouse L cells: role for DNA ends in the recombination process. *Mol Cell Biol* **4**:1020-34.
216. **Sugawara, N., F. Paques, M. Colaiacovo, and J. E. Haber.** 1997. Role of *Saccharomyces cerevisiae* Msh2 and Msh3 repair proteins in double-strand break-induced recombination. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**:9214-9.
217. **Lander, E. S., L. M. Linton, B. Birren, C. Nusbaum, M. C. Zody, J. Baldwin, K. Devon, K. Dewar, M. Doyle, W. FitzHugh, R. Funke, D. Gage, K. Harris, A. Heaford, J. Howland, L. Kann, J. Lehoczký, R. LeVine, P. McEwan, K. McKernan, J. Meldrim, J. P. Mesirov, C. Miranda, W. Morris, J. Naylor, C. Raymond, M. Rosetti, R. Santos, A. Sheridan, C. Sougnez, N. Stange-Thomann, N. Stojanovic, A. Subramanian, D. Wyman, J. Rogers, J. Sulston, R. Ainscough, S. Beck, D. Bentley, J. Burton, C. Clee, N. Carter, A. Coulson, R. Deadman, P. Deloukas, A. Dunham, I. Dunham, R. Durbin, L. French, D. Grafham, S. Gregory, T. Hubbard, S. Humphray, A. Hunt, M. Jones, C. Lloyd, A. McMurray, L. Matthews, S. Mercer, S. Milne, J. C. Mullikin, A. Mungall, R. Plumb, M. Ross, R. Shownkeen, S. Sims, R. H. Waterston, R. K. Wilson, L. W. Hillier, J. D. McPherson, M. A. Marra, E. R. Mardis, L. A. Fulton, A. T. Chinwalla, K. H. Pepin, W. R. Gish, S. L. Chissoe, M. C. Wendl, K. D. Delehaunty, T. L. Miner, A. Delehaunty, J. B. Kramer, L. L. Cook, R. S. Fulton, D. L. Johnson, P. J. Minx, S. W. Clifton, T. Hawkins, E. Branscomb, P. Predki, P. Richardson, S. Wenning, T. Slezak, N. Doggett, J. F. Cheng, A. Olsen, S. Lucas, C. Elkin, E. Uberbacher, M. Frazier, et al.** 2001. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* **409**:860-921.
218. **Lobrich, M., and P. A. Jeggo.** 2007. The impact of a negligent G2/M checkpoint on genomic instability and cancer induction. *Nat Rev Cancer* **7**:861-9.
219. **Vaughn, J. P., P. L. Davis, M. D. Jarboe, G. Huper, A. C. Evans, R. W. Wiseman, A. Berchuck, J. D. Iglehart, P. A. Futreal, and J. R. Marks.** 1996. BRCA1 expression is induced before DNA synthesis in both normal and tumor-derived breast cells. *Cell Growth Differ* **7**:711-5.
220. **Ruffner, H., and I. M. Verma.** 1997. BRCA1 is a cell cycle-regulated nuclear phosphoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**:7138-43.
221. **Xu, B., S. Kim, and M. B. Kastan.** 2001. Involvement of Brcal in S-phase and G(2)-phase checkpoints after ionizing irradiation. *Mol Cell Biol* **21**:3445-50.

222. **Xu, B., A. H. O'Donnell, S. T. Kim, and M. B. Kastan.** 2002. Phosphorylation of serine 1387 in Brca1 is specifically required for the Atm-mediated S-phase checkpoint after ionizing irradiation. *Cancer Res* **62**:4588-91.
223. **Lee, J. H., and T. T. Paull.** 2005. ATM activation by DNA double-strand breaks through the Mre11-Rad50-Nbs1 complex. *Science* **308**:551-4.
224. **Zou, L., and S. J. Elledge.** 2003. Sensing DNA damage through ATRIP recognition of RPA-ssDNA complexes. *Science* **300**:1542-8.
225. **Somasundaram, K., H. Zhang, Y. X. Zeng, Y. Houvras, Y. Peng, G. S. Wu, J. D. Licht, B. L. Weber, and W. S. El-Deiry.** 1997. Arrest of the cell cycle by the tumour-suppressor BRCA1 requires the CDK-inhibitor p21WAF1/Cip1. *Nature* **389**:187-90.
226. **Aprelikova, O. N., B. S. Fang, E. G. Meissner, S. Cotter, M. Campbell, A. Kuthiala, M. Bessho, R. A. Jensen, and E. T. Liu.** 1999. BRCA1-associated growth arrest is RB-dependent. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**:11866-71.
227. **Yarden, R. I., S. Pardo-Reoyo, M. Sgagias, K. H. Cowan, and L. C. Brody.** 2002. BRCA1 regulates the G2/M checkpoint by activating Chk1 kinase upon DNA damage. *Nat Genet* **30**:285-9.
228. **Wang, X. W., Q. Zhan, J. D. Coursen, M. A. Khan, H. U. Kontny, L. Yu, M. C. Hollander, P. M. O'Connor, A. J. Fornace, Jr., and C. C. Harris.** 1999. GADD45 induction of a G2/M cell cycle checkpoint. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**:3706-11.
229. **Wang, R. H., H. Yu, and C. X. Deng.** 2004. A requirement for breast-cancer-associated gene 1 (BRCA1) in the spindle checkpoint. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**:17108-13.
230. **Futamura, M., H. Arakawa, K. Matsuda, T. Katagiri, S. Saji, Y. Miki, and Y. Nakamura.** 2000. Potential role of BRCA2 in a mitotic checkpoint after phosphorylation by hBUBR1. *Cancer Res* **60**:1531-5.
231. **Lee, H., A. H. Trainer, L. S. Friedman, F. C. Thistlethwaite, M. J. Evans, B. A. Ponder, and A. R. Venkitaraman.** 1999. Mitotic checkpoint inactivation fosters transformation in cells lacking the breast cancer susceptibility gene, Brca2. *Mol Cell* **4**:1-10.
232. **Marmorstein, L. Y., A. V. Kinev, G. K. Chan, D. A. Bochar, H. Beniya, J. A. Epstein, T. J. Yen, and R. Shiekhattar.** 2001. A human BRCA2 complex containing a structural DNA binding component influences cell cycle progression. *Cell* **104**:247-57.

233. **Daniels, M. J., Y. Wang, M. Lee, and A. R. Venkitaraman.** 2004. Abnormal cytokinesis in cells deficient in the breast cancer susceptibility protein BRCA2. *Science* **306**:876-9.
234. **Lee, M., M. J. Daniels, and A. R. Venkitaraman.** 2004. Phosphorylation of BRCA2 by the Polo-like kinase Plk1 is regulated by DNA damage and mitotic progression. *Oncogene* **23**:865-72.
235. **Lin, H. R., N. S. Ting, J. Qin, and W. H. Lee.** 2003. M phase-specific phosphorylation of BRCA2 by Polo-like kinase 1 correlates with the dissociation of the BRCA2-P/CAF complex. *J Biol Chem* **278**:35979-87.
236. **Monteiro, A. N., A. August, and H. Hanafusa.** 1996. Evidence for a transcriptional activation function of BRCA1 C-terminal region. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**:13595-9.
237. **Humphrey, J. S., A. Salim, M. R. Erdos, F. S. Collins, L. C. Brody, and R. D. Klausner.** 1997. Human BRCA1 inhibits growth in yeast: potential use in diagnostic testing. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**:5820-5.
238. **Aguilera, A.** 2002. The connection between transcription and genomic instability. *Embo J* **21**:195-201.
239. **Gottipati, P., T. N. Cassel, L. Savolainen, and T. Helleday.** 2007. Transcription-associated recombination is dependent on replication in mammalian cells. *Mol Cell Biol.*
240. **Wu, S., Y. Shi, P. Mulligan, F. Gay, J. Landry, H. Liu, J. Lu, H. H. Qi, W. Wang, J. A. Nickoloff, C. Wu, and Y. Shi.** 2007. A YY1-INO80 complex regulates genomic stability through homologous recombination-based repair. *Nat Struct Mol Biol.*
241. **Anderson, S. F., B. P. Schlegel, T. Nakajima, E. S. Wolpin, and J. D. Parvin.** 1998. BRCA1 protein is linked to the RNA polymerase II holoenzyme complex via RNA helicase A. *Nat Genet* **19**:254-6.
242. **Pao, G. M., R. Janknecht, H. Ruffner, T. Hunter, and I. M. Verma.** 2000. CBP/p300 interact with and function as transcriptional coactivators of BRCA1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**:1020-5.
243. **Scully, R., S. F. Anderson, D. M. Chao, W. Wei, L. Ye, R. A. Young, D. M. Livingston, and J. D. Parvin.** 1997. BRCA1 is a component of the RNA polymerase II holoenzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**:5605-10.

244. **Starita, L. M., A. A. Horwitz, M. C. Keogh, C. Ishioka, J. D. Parvin, and N. Chiba.** 2005. BRCA1/BARD1 ubiquitinate phosphorylated RNA polymerase II. *J Biol Chem* **280**:24498-505.
245. **Horwitz, A. A., B. Affar el, G. F. Heine, Y. Shi, and J. D. Parvin.** 2007. A mechanism for transcriptional repression dependent on the BRCA1 E3 ubiquitin ligase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**:6614-9.
246. **Krum, S. A., G. A. Miranda, C. Lin, and T. F. Lane.** 2003. BRCA1 associates with processive RNA polymerase II. *J Biol Chem* **278**:52012-20.
247. **Ouchi, T., S. W. Lee, M. Ouchi, S. A. Aaronson, and C. M. Horvath.** 2000. Collaboration of signal transducer and activator of transcription 1 (STAT1) and BRCA1 in differential regulation of IFN-gamma target genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**:5208-13.
248. **Ouchi, T., A. N. Monteiro, A. August, S. A. Aaronson, and H. Hanafusa.** 1998. BRCA1 regulates p53-dependent gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**:2302-6.
249. **Zhang, H., K. Somasundaram, Y. Peng, H. Tian, D. Bi, B. L. Weber, and W. S. El-Deiry.** 1998. BRCA1 physically associates with p53 and stimulates its transcriptional activity. *Oncogene* **16**:1713-21.
250. **MacLachlan, T. K., R. Takimoto, and W. S. El-Deiry.** 2002. BRCA1 directs a selective p53-dependent transcriptional response towards growth arrest and DNA repair targets. *Mol Cell Biol* **22**:4280-92.
251. **Somasundaram, K., T. K. MacLachlan, T. F. Burns, M. Sgagias, K. H. Cowan, B. L. Weber, and W. S. el-Deiry.** 1999. BRCA1 signals ARF-dependent stabilization and coactivation of p53. *Oncogene* **18**:6605-14.
252. **Fabbro, M., S. Schuechner, W. W. Au, and B. R. Henderson.** 2004. BARD1 regulates BRCA1 apoptotic function by a mechanism involving nuclear retention. *Exp Cell Res* **298**:661-73.
253. **MacLachlan, T. K., B. C. Dash, D. T. Dicker, and W. S. El-Deiry.** 2000. Repression of BRCA1 through a feedback loop involving p53. *J Biol Chem* **275**:31869-75.
254. **Arizti, P., L. Fang, I. Park, Y. Yin, E. Solomon, T. Ouchi, S. A. Aaronson, and S. W. Lee.** 2000. Tumor suppressor p53 is required to modulate BRCA1 expression. *Mol Cell Biol* **20**:7450-9.
255. **Yu, X., L. C. Wu, A. M. Bowcock, A. Aronheim, and R. Baer.** 1998. The C-terminal (BRCT) domains of BRCA1 interact in vivo with CtIP, a protein

- implicated in the CtBP pathway of transcriptional repression. *J Biol Chem* **273**:25388-92.
256. **Harkin, D. P., J. M. Bean, D. Miklos, Y. H. Song, V. B. Truong, C. Englert, F. C. Christians, L. W. Ellisen, S. Maheswaran, J. D. Oliner, and D. A. Haber.** 1999. Induction of GADD45 and JNK/SAPK-dependent apoptosis following inducible expression of BRCA1. *Cell* **97**:575-86.
 257. **Yun, J., and W. H. Lee.** 2003. Degradation of transcription repressor ZBRK1 through the ubiquitin-proteasome pathway relieves repression of Gadd45a upon DNA damage. *Mol Cell Biol* **23**:7305-14.
 258. **Wang, Q., H. Zhang, K. Kajino, and M. I. Greene.** 1998. BRCA1 binds c-Myc and inhibits its transcriptional and transforming activity in cells. *Oncogene* **17**:1939-48.
 259. **Li, H., T. H. Lee, and H. Avraham.** 2002. A novel tricomplex of BRCA1, Nmi, and c-Myc inhibits c-Myc-induced human telomerase reverse transcriptase gene (hTERT) promoter activity in breast cancer. *J Biol Chem* **277**:20965-73.
 260. **Kleiman, F. E., and J. L. Manley.** 2001. The BARD1-CstF-50 interaction links mRNA 3' end formation to DNA damage and tumor suppression. *Cell* **104**:743-53.
 261. **Kim, H. S., H. Li, M. Cevher, A. Parmelee, D. Fonseca, F. E. Kleiman, and S. B. Lee.** 2006. DNA damage-induced BARD1 phosphorylation is critical for the inhibition of messenger RNA processing by BRCA1/BARD1 complex. *Cancer Res* **66**:4561-5.
 262. **Venkitaraman, A. R.** 2001. Functions of BRCA1 and BRCA2 in the biological response to DNA damage. *J Cell Sci* **114**:3591-8.
 263. **Milner, J., B. Ponder, L. Hughes-Davies, M. Seltmann, and T. Kouzarides.** 1997. Transcriptional activation functions in BRCA2. *Nature* **386**:772-3.
 264. **Fuks, F., J. Milner, and T. Kouzarides.** 1998. BRCA2 associates with acetyltransferase activity when bound to P/CAF. *Oncogene* **17**:2531-4.
 265. **Yang, X. J., V. V. Ogryzko, J. Nishikawa, B. H. Howard, and Y. Nakatani.** 1996. A p300/CBP-associated factor that competes with the adenoviral oncoprotein E1A. *Nature* **382**:319-24.
 266. **Siddique, H., J. P. Zou, V. N. Rao, and E. S. Reddy.** 1998. The BRCA2 is a histone acetyltransferase. *Oncogene* **16**:2283-5.

267. **Milner, J., F. Fuks, L. Hughes-Davies, and T. Kouzarides.** 2000. The BRCA2 activation domain associates with and is phosphorylated by a cellular protein kinase. *Oncogene* **19**:4441-5.
268. **Ree, A. H., A. Bratland, R. V. Nome, T. Stokke, and O. Fodstad.** 2003. Repression of mRNA for the PLK cell cycle gene after DNA damage requires BRCA1. *Oncogene* **22**:8952-5.
269. **Hughes-Davies, L., D. Huntsman, M. Ruas, F. Fuks, J. Bye, S. F. Chin, J. Milner, L. A. Brown, F. Hsu, B. Gilks, T. Nielsen, M. Schulzer, S. Chia, J. Ragaz, A. Cahn, L. Linger, H. Ozdag, E. Cattaneo, E. S. Jordanova, E. Schuurin, D. S. Yu, A. Venkitaraman, B. Ponder, A. Doherty, S. Aparicio, D. Bentley, C. Theillet, C. P. Ponting, C. Caldas, and T. Kouzarides.** 2003. EMSY Links the BRCA2 Pathway to Sporadic Breast and Ovarian Cancer. *Cell* **115**:523-35.
270. **Marmorstein, L. Y., T. Ouchi, and S. A. Aaronson.** 1998. The BRCA2 gene product functionally interacts with p53 and RAD51. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**:13869-74.
271. **Nordling, M., P. Karlsson, J. Wahlstrom, Y. Engwall, A. Wallgren, and T. Martinsson.** 1998. A large deletion disrupts the exon 3 transcription activation domain of the BRCA2 gene in a breast/ovarian cancer family. *Cancer Res* **58**:1372-5.
272. **Yarden, R. I., and L. C. Brody.** 1999. BRCA1 interacts with components of the histone deacetylase complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**:4983-8.
273. **Cantor, S. B., D. W. Bell, S. Ganesan, E. M. Kass, R. Drapkin, S. Grossman, D. C. Wahrer, D. C. Sgroi, W. S. Lane, D. A. Haber, and D. M. Livingston.** 2001. BACH1, a novel helicase-like protein, interacts directly with BRCA1 and contributes to its DNA repair function. *Cell* **105**:149-60.
274. **Bochar, D. A., L. Wang, H. Beniya, A. Kinev, Y. Xue, W. S. Lane, W. Wang, F. Kashanchi, and R. Shiekhattar.** 2000. BRCA1 is associated with a human SWI/SNF-related complex: linking chromatin remodeling to breast cancer. *Cell* **102**:257-65.
275. **Yamane, K., E. Katayama, and T. Tsuruo.** 2000. The BRCT regions of tumor suppressor BRCA1 and of XRCC1 show DNA end binding activity with a multimerizing feature. *Biochem Biophys Res Commun* **279**:678-84.
276. **Ye, Q., Y. F. Hu, H. Zhong, A. C. Nye, A. S. Belmont, and R. Li.** 2001. BRCA1-induced large-scale chromatin unfolding and allele-specific effects of cancer-predisposing mutations. *J Cell Biol* **155**:911-21.

277. **Oishi, H., H. Kitagawa, O. Wada, S. Takezawa, L. Tora, M. Kouzu-Fujita, I. Takada, T. Yano, J. Yanagisawa, and S. Kato.** 2006. An hGCN5/TRRAP histone acetyltransferase complex co-activates BRCA1 transactivation function through histone modification. *J Biol Chem* **281**:20-6.
278. **Xu, J., S. Fan, and E. M. Rosen.** 2005. Regulation of the estrogen-inducible gene expression profile by the breast cancer susceptibility gene BRCA1. *Endocrinology* **146**:2031-47.
279. **Zheng, L., L. A. Annab, C. A. Afshari, W. H. Lee, and T. G. Boyer.** 2001. BRCA1 mediates ligand-independent transcriptional repression of the estrogen receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**:9587-92.
280. **van Brabant, A. J., R. Stan, and N. A. Ellis.** 2000. DNA helicases, genomic instability, and human genetic disease. *Annu Rev Genomics Hum Genet* **1**:409-59.
281. **Adimoolam, S., M. Sirisawad, J. Chen, P. Thiemann, J. M. Ford, and J. J. Buggy.** 2007. HDAC inhibitor PCI-24781 decreases RAD51 expression and inhibits homologous recombination. *Proc Natl Acad Sci U S A*.
282. **Rao, V. N., N. Shao, M. Ahmad, and E. S. Reddy.** 1996. Antisense RNA to the putative tumor suppressor gene BRCA1 transforms mouse fibroblasts. *Oncogene* **12**:523-8.
283. **Fan, S., R. Yuan, Y. X. Ma, Q. Meng, I. D. Goldberg, and E. M. Rosen.** 2001. Mutant BRCA1 genes antagonize phenotype of wild-type BRCA1. *Oncogene* **20**:8215-35.
284. **Yan, Y., J. P. Haas, M. Kim, M. K. Sgagias, and K. H. Cowan.** 2002. BRCA1-induced apoptosis involves inactivation of ERK1/2 activities. *J Biol Chem* **277**:33422-30.
285. **Hoeller, D., C. M. Hecker, and I. Dikic.** 2006. Ubiquitin and ubiquitin-like proteins in cancer pathogenesis. *Nat Rev Cancer* **6**:776-88.
286. **Starita, L. M., and J. D. Parvin.** 2006. Substrates of the BRCA1-dependent ubiquitin ligase. *Cancer Biol Ther* **5**:137-41.
287. **Murakawa, Y., E. Sonoda, L. J. Barber, W. Zeng, K. Yokomori, H. Kimura, A. Niimi, A. Lehmann, G. Y. Zhao, H. Hochegger, S. J. Boulton, and S. Takeda.** 2007. Inhibitors of the proteasome suppress homologous DNA recombination in mammalian cells. *Cancer Res* **67**:8536-43.
288. **Hashizume, R., M. Fukuda, I. Maeda, H. Nishikawa, D. Oyake, Y. Yabuki, H. Ogata, and T. Ohta.** 2001. The RING heterodimer BRCA1-BARD1 is a ubiquitin ligase inactivated by a breast cancer-derived mutation. *J Biol Chem* **276**:14537-40.

289. **Ruffner, H., C. A. Joazeiro, D. Hemmati, T. Hunter, and I. M. Verma.** 2001. Cancer-predisposing mutations within the RING domain of BRCA1: loss of ubiquitin protein ligase activity and protection from radiation hypersensitivity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**:5134-9.
290. **Jensen, D. E., M. Proctor, S. T. Marquis, H. P. Gardner, S. I. Ha, L. A. Chodosh, A. M. Ishov, N. Tommerup, H. Vissing, Y. Sekido, J. Minna, A. Borodovsky, D. C. Schultz, K. D. Wilkinson, G. G. Maul, N. Barlev, S. L. Berger, G. C. Prendergast, and F. J. Rauscher, 3rd.** 1998. BAP1: a novel ubiquitin hydrolase which binds to the BRCA1 RING finger and enhances BRCA1-mediated cell growth suppression. *Oncogene* **16**:1097-112.
291. **Brzovic, P. S., A. Lissounov, D. E. Christensen, D. W. Hoyt, and R. E. Klevit.** 2006. A UbcH5/ubiquitin noncovalent complex is required for processive BRCA1-directed ubiquitination. *Mol Cell* **21**:873-80.
292. **Christensen, D. E., P. S. Brzovic, and R. E. Klevit.** 2007. E2-BRCA1 RING interactions dictate synthesis of mono- or specific polyubiquitin chain linkages. *Nat Struct Mol Biol* **14**:941-8.
293. **Polanowska, J., J. S. Martin, T. Garcia-Muse, M. I. Petalcorin, and S. J. Boulton.** 2006. A conserved pathway to activate BRCA1-dependent ubiquitylation at DNA damage sites. *Embo J* **25**:2178-88.
294. **Morris, J. R., and E. Solomon.** 2004. BRCA1 : BARD1 induces the formation of conjugated ubiquitin structures, dependent on K6 of ubiquitin, in cells during DNA replication and repair. *Hum Mol Genet* **13**:807-17.
295. **Mallery, D. L., C. J. Vandenberg, and K. Hiom.** 2002. Activation of the E3 ligase function of the BRCA1/BARD1 complex by polyubiquitin chains. *Embo J* **21**:6755-62.
296. **Brzovic, P. S., J. R. Keefe, H. Nishikawa, K. Miyamoto, D. Fox, 3rd, M. Fukuda, T. Ohta, and R. Klevit.** 2003. Binding and recognition in the assembly of an active BRCA1/BARD1 ubiquitin-ligase complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**:5646-51.
297. **Simons, A. M., A. A. Horwitz, L. M. Starita, K. Griffin, R. S. Williams, J. N. Glover, and J. D. Parvin.** 2006. BRCA1 DNA-binding activity is stimulated by BARD1. *Cancer Res* **66**:2012-8.
298. **Lee, K. B., D. Wang, S. J. Lippard, and P. A. Sharp.** 2002. Transcription-coupled and DNA damage-dependent ubiquitination of RNA polymerase II in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**:4239-44.

299. **Kleiman, F. E., F. Wu-Baer, D. Fonseca, S. Kaneko, R. Baer, and J. L. Manley.** 2005. BRCA1/BARD1 inhibition of mRNA 3' processing involves targeted degradation of RNA polymerase II. *Genes Dev* **19**:1227-37.
300. **Jacquemont, C., and T. Taniguchi.** 2007. Proteasome function is required for DNA damage response and fanconi anemia pathway activation. *Cancer Res* **67**:7395-405.
301. **Bennett, B. T., and K. L. Knight.** 2005. Cellular localization of human Rad51C and regulation of ubiquitin-mediated proteolysis of Rad51. *J Cell Biochem* **96**:1095-109.
302. **Chen, J. J., D. Silver, S. Cantor, D. M. Livingston, and R. Scully.** 1999. BRCA1, BRCA2, and Rad51 operate in a common DNA damage response pathway. *Cancer Res* **59**:1752s-1756s.
303. **Arnold, K., M. K. Kim, K. Frerk, L. Edler, L. Savelyeva, P. Schmezer, and R. Wiedemeyer.** 2006. Lower level of BRCA2 protein in heterozygous mutation carriers is correlated with an increase in DNA double strand breaks and an impaired DSB repair. *Cancer Lett.*
304. **Warren, M., C. J. Lord, J. Masabanda, D. Griffin, and A. Ashworth.** 2003. Phenotypic effects of heterozygosity for a BRCA2 mutation. *Hum Mol Genet* **12**:2645-56.
305. **Savelyeva, L., A. Claas, I. Matzner, P. Schlag, W. Hofmann, S. Scherneck, B. Weber, and M. Schwab.** 2001. Constitutional genomic instability with inversions, duplications, and amplifications in 9p23-24 in BRCA2 mutation carriers. *Cancer Res* **61**:5179-85.
306. **Kim, M. K., S. Zitzmann, F. Westermann, K. Arnold, S. Brouwers, M. Schwab, and L. Savelyeva.** 2004. Increased rates of spontaneous sister chromatid exchange in lymphocytes of BRCA2 \pm carriers of familial breast cancer clusters. *Cancer Lett* **210**:85-94.
307. **Bennett, L. M., K. A. McAllister, J. Malphurs, T. Ward, N. K. Collins, J. C. Seely, L. C. Gowen, B. H. Koller, B. J. Davis, and R. W. Wiseman.** 2000. Mice heterozygous for a Brca1 or Brca2 mutation display distinct mammary gland and ovarian phenotypes in response to diethylstilbestrol. *Cancer Res* **60**:3461-9.
308. **Gaffney, D. K., R. M. Brohet, C. M. Lewis, J. A. Holden, S. S. Buys, S. L. Neuhausen, L. Steele, V. Avizonis, J. R. Stewart, and L. A. Cannon-Albright.** 1998. Response to radiation therapy and prognosis in breast cancer patients with BRCA1 and BRCA2 mutations. *Radiother Oncol* **47**:129-36.

309. **Leong, T., J. Whitty, M. Keilar, S. Mifsud, J. Ramsay, G. Birrell, D. Venter, M. Southey, and M. McKay.** 2000. Mutation analysis of BRCA1 and BRCA2 cancer predisposition genes in radiation hypersensitive cancer patients. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **48**:959-65.
310. **Pierce, L. J., M. Strawderman, S. A. Narod, I. Oliviotto, A. Eisen, L. Dawson, D. Gaffney, L. J. Solin, A. Nixon, J. Garber, C. Berg, C. Isaacs, R. Heimann, O. I. Olopade, B. Haffty, and B. L. Weber.** 2000. Effect of radiotherapy after breast-conserving treatment in women with breast cancer and germline BRCA1/2 mutations. *J Clin Oncol* **18**:3360-9.
311. **Baeyens, A., H. Thierens, K. Claes, B. Poppe, L. Messiaen, L. De Ridder, and A. Vral.** 2002. Chromosomal radiosensitivity in breast cancer patients with a known or putative genetic predisposition. *Br J Cancer* **87**:1379-85.
312. **Baria, K., C. Warren, S. A. Roberts, C. M. West, D. G. Evans, J. M. Varley, and D. Scott.** 2001. Correspondence re: A. Rothfuss et al., Induced micronucleus frequencies in peripheral blood lymphocytes as a screening test for carriers of a BRCA1 mutation in breast cancer families. *Cancer Res.*, 60: 390-394, 2000. *Cancer Res* **61**:5948-9.
313. **Buchholz, T. A., X. Wu, A. Hussain, S. L. Tucker, G. B. Mills, B. Haffty, S. Bergh, M. Story, F. B. Geara, and W. A. Brock.** 2002. Evidence of haplotype insufficiency in human cells containing a germline mutation in BRCA1 or BRCA2. *Int J Cancer* **97**:557-61.
314. **Rothfuss, A., P. Schutz, S. Bochum, T. Volm, E. Eberhardt, R. Kreienberg, W. Vogel, and G. Speit.** 2000. Induced micronucleus frequencies in peripheral lymphocytes as a screening test for carriers of a BRCA1 mutation in breast cancer families. *Cancer Res* **60**:390-4.
315. **Speit, G., K. Trenz, P. Schutz, R. Bendix, and T. Dork.** 2000. Mutagen sensitivity of human lymphoblastoid cells with a BRCA1 mutation in comparison to ataxia telangiectasia heterozygote cells. *Cytogenet Cell Genet* **91**:261-6.
316. **Speit, G., and K. Trenz.** 2004. Chromosomal mutagen sensitivity associated with mutations in BRCA genes. *Cytogenet Genome Res* **104**:325-32.
317. **Trenz, K., A. Rothfuss, P. Schutz, and G. Speit.** 2002. Mutagen sensitivity of peripheral blood from women carrying a BRCA1 or BRCA2 mutation. *Mutat Res* **500**:89-96.
318. **Trenz, K., J. Landgraf, and G. Speit.** 2003. Mutagen sensitivity of human lymphoblastoid cells with a BRCA1 mutation. *Breast Cancer Res Treat* **78**:69-79.

319. **Trenz, K., S. Lugowski, U. Jahrsdorfer, S. Jainta, W. Vogel, and G. Speit.** 2003. Enhanced sensitivity of peripheral blood lymphocytes from women carrying a BRCA1 mutation towards the mutagenic effects of various cytostatics. *Mutat Res* **544**:279-88.
320. **Nieuwenhuis, B., A. J. Van Assen-Bolt, M. A. Van Waarde-Verhagen, R. H. Sijmons, A. H. Van der Hout, T. Bauch, C. Streffer, and H. H. Kampinga.** 2002. BRCA1 and BRCA2 heterozygosity and repair of X-ray-induced DNA damage. *Int J Radiat Biol* **78**:285-95.
321. **Baeyens, A., H. Thierens, K. Claes, B. Poppe, L. de Ridder, and A. Vral.** 2004. Chromosomal radiosensitivity in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. *Int J Radiat Biol* **80**:745-56.
322. **Merajver, S. D., T. M. Pham, R. F. Caduff, M. Chen, E. L. Poy, K. A. Cooney, B. L. Weber, F. S. Collins, C. Johnston, and T. S. Frank.** 1995. Somatic mutations in the BRCA1 gene in sporadic ovarian tumours. *Nat Genet* **9**:439-43.
323. **Janatova, M., M. Zikan, P. Dunder, B. Matous, and P. Pohlreich.** 2005. Novel somatic mutations in the BRCA1 gene in sporadic breast tumors. *Hum Mutat* **25**:319.
324. **Futreal, P. A., Q. Liu, D. Shattuck-Eidens, C. Cochran, K. Harshman, S. Tavtigian, L. M. Bennett, A. Haugen-Strano, J. Swensen, Y. Miki, and et al.** 1994. BRCA1 mutations in primary breast and ovarian carcinomas. *Science* **266**:120-2.
325. **Rice, J. C., H. Ozcelik, P. Maxeiner, I. Andrulis, and B. W. Futscher.** 2000. Methylation of the BRCA1 promoter is associated with decreased BRCA1 mRNA levels in clinical breast cancer specimens. *Carcinogenesis* **21**:1761-5.
326. **Turner, N. C., J. S. Reis-Filho, A. M. Russell, R. J. Springall, K. Ryder, D. Steele, K. Savage, C. E. Gillett, F. C. Schmitt, A. Ashworth, and A. N. Tutt.** 2007. BRCA1 dysfunction in sporadic basal-like breast cancer. *Oncogene* **26**:2126-32.
327. **Holt, J. T., M. E. Thompson, C. Szabo, C. Robinson-Benion, C. L. Arteaga, M. C. King, and R. A. Jensen.** 1996. Growth retardation and tumour inhibition by BRCA1. *Nat Genet* **12**:298-302.
328. **Furuta, S., X. Jiang, B. Gu, E. Cheng, P. L. Chen, and W. H. Lee.** 2005. Depletion of BRCA1 impairs differentiation but enhances proliferation of mammary epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**:9176-81.
329. **Zhou, C., P. Huang, and J. Liu.** 2005. The carboxyl-terminal of BRCA1 is required for subnuclear assembly of RAD51 after treatment with cisplatin but not

- ionizing radiation in human breast and ovarian cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* **336**:952-60.
330. **Thompson, M. E., R. A. Jensen, P. S. Obermiller, D. L. Page, and J. T. Holt.** 1995. Decreased expression of BRCA1 accelerates growth and is often present during sporadic breast cancer progression. *Nat Genet* **9**:444-50.
 331. **Lafarge, S., V. Sylvain, M. Ferrara, and Y. J. Bignon.** 2001. Inhibition of BRCA1 leads to increased chemoresistance to microtubule-interfering agents, an effect that involves the JNK pathway. *Oncogene* **20**:6597-606.
 332. **Husain, A., G. He, E. S. Venkatraman, and D. R. Spriggs.** 1998. BRCA1 up-regulation is associated with repair-mediated resistance to cis-diamminedichloroplatinum(II). *Cancer Res* **58**:1120-3.
 333. **Wu, H., Y. Chen, J. Liang, B. Shi, G. Wu, Y. Zhang, D. Wang, R. Li, X. Yi, H. Zhang, L. Sun, and Y. Shang.** 2005. Hypomethylation-linked activation of PAX2 mediates tamoxifen-stimulated endometrial carcinogenesis. *Nature* **438**:981-7.
 334. **Brown, M. A., H. Nicolai, K. Howe, T. Katagiri, N. Lalani el, K. J. Simpson, N. W. Manning, A. Deans, P. Chen, K. K. Khanna, M. R. Wati, B. L. Griffiths, C. F. Xu, G. W. Stamp, and E. Solomon.** 2002. Expression of a truncated Brca1 protein delays lactational mammary development in transgenic mice. *Transgenic Res* **11**:467-78.
 335. **Sylvain, V., S. Lafarge, and Y. J. Bignon.** 2002. Dominant-negative activity of a Brca1 truncation mutant: effects on proliferation, tumorigenicity in vivo, and chemosensitivity in a mouse ovarian cancer cell line. *Int J Oncol* **20**:845-53.
 336. **Larson, J. S., J. L. Tonkinson, and M. T. Lai.** 1997. A BRCA1 mutant alters G2-M cell cycle control in human mammary epithelial cells. *Cancer Res* **57**:3351-5.
 337. **Zhou, C., J. L. Smith, and J. Liu.** 2003. Role of BRCA1 in cellular resistance to paclitaxel and ionizing radiation in an ovarian cancer cell line carrying a defective BRCA1. *Oncogene* **22**:2396-404.
 338. **Thangaraju, M., S. H. Kaufmann, and F. J. Couch.** 2000. BRCA1 facilitates stress-induced apoptosis in breast and ovarian cancer cell lines. *J Biol Chem* **275**:33487-96.
 339. **Hohenstein, P., M. F. Kielman, C. Breukel, L. M. Bennett, R. Wiseman, P. Krimpenfort, C. Cornelisse, G. J. van Ommen, P. Devilee, and R. Fodde.** 2001. A targeted mouse Brca1 mutation removing the last BRCT repeat results in apoptosis and embryonic lethality at the headfold stage. *Oncogene* **20**:2544-50.

340. **Santarosa, M., and A. Ashworth.** 2004. Haploinsufficiency for tumour suppressor genes: when you don't need to go all the way. *Biochim Biophys Acta* **1654**:105-22.
341. **Cressman, V. L., D. C. Backlund, E. M. Hicks, L. C. Gowen, V. Godfrey, and B. H. Koller.** 1999. Mammary tumor formation in p53- and BRCA1-deficient mice. *Cell Growth Differ* **10**:1-10.
342. **Friedman, L. S., F. C. Thistlethwaite, K. J. Patel, V. P. Yu, H. Lee, A. R. Venkitaraman, K. J. Abel, M. B. Carlton, S. M. Hunter, W. H. Colledge, M. J. Evans, and B. A. Ponder.** 1998. Thymic lymphomas in mice with a truncating mutation in Brca2. *Cancer Res* **58**:1338-43.
343. **Xu, X., K. U. Wagner, D. Larson, Z. Weaver, C. Li, T. Ried, L. Hennighausen, A. Wynshaw-Boris, and C. X. Deng.** 1999. Conditional mutation of Brca1 in mammary epithelial cells results in blunted ductal morphogenesis and tumour formation. *Nat Genet* **22**:37-43.
344. **Sharan, S. K., and A. Bradley.** 1997. Murine Brca2: sequence, map position, and expression pattern. *Genomics* **40**:234-41.
345. **Sarkisian, C. J., S. R. Master, L. J. Huber, S. I. Ha, and L. A. Chodosh.** 2001. Analysis of murine Brca2 reveals conservation of protein-protein interactions but differences in nuclear localization signals. *J Biol Chem* **276**:37640-8.
346. **Goss, P. E.** 2003. Breast cancer prevention--clinical trials strategies involving aromatase inhibitors. *J Steroid Biochem Mol Biol* **86**:487-93.
347. **Narod, S. A., J. S. Brunet, P. Ghadirian, M. Robson, K. Heimdal, S. L. Neuhausen, D. Stoppa-Lyonnet, C. Lerman, B. Pasini, P. de los Rios, B. Weber, and H. Lynch.** 2000. Tamoxifen and risk of contralateral breast cancer in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: a case-control study. Hereditary Breast Cancer Clinical Study Group. *Lancet* **356**:1876-81.
348. **Gunson, D. E., R. E. Steele, and R. Y. Chau.** 1995. Prevention of spontaneous tumours in female rats by fadrozole hydrochloride, an aromatase inhibitor. *Br J Cancer* **72**:72-5.
349. **Fisher, B., J. P. Costantino, D. L. Wickerham, C. K. Redmond, M. Kavanah, W. M. Cronin, V. Vogel, A. Robidoux, N. Dimitrov, J. Atkins, M. Daly, S. Wieand, E. Tan-Chiu, L. Ford, and N. Wolmark.** 1998. Tamoxifen for prevention of breast cancer: report of the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project P-1 Study. *J Natl Cancer Inst* **90**:1371-88.
350. **Eisen, A., J. Lubinski, J. Klijn, P. Moller, H. T. Lynch, K. Offit, B. Weber, T. Rebbeck, S. L. Neuhausen, P. Ghadirian, W. D. Foulkes, R. Gershoni-Baruch, E. Friedman, G. Rennert, T. Wagner, C. Isaacs, C. Kim-Sing, P. Ainsworth, P.**

- Sun, and S. A. Narod.** 2005. Breast cancer risk following bilateral oophorectomy in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: an international case-control study. *J Clin Oncol* **23**:7491-6.
351. **Rebbeck, T. R., H. T. Lynch, S. L. Neuhausen, S. A. Narod, L. Van't Veer, J. E. Garber, G. Evans, C. Isaacs, M. B. Daly, E. Matloff, O. I. Olopade, and B. L. Weber.** 2002. Prophylactic oophorectomy in carriers of BRCA1 or BRCA2 mutations. *N Engl J Med* **346**:1616-22.
352. **Jernstrom, H., C. Lerman, P. Ghadirian, H. T. Lynch, B. Weber, J. Garber, M. Daly, O. I. Olopade, W. D. Foulkes, E. Warner, J. S. Brunet, and S. A. Narod.** 1999. Pregnancy and risk of early breast cancer in carriers of BRCA1 and BRCA2. *Lancet* **354**:1846-50.
353. **Beral, V., E. Banks, G. Reeves, and P. Appleby.** 1999. Use of HRT and the subsequent risk of cancer. *J Epidemiol Biostat* **4**:191-210; discussion 210-5.
354. 1997. Pathology of familial breast cancer: differences between breast cancers in carriers of BRCA1 or BRCA2 mutations and sporadic cases. Breast Cancer Linkage Consortium. *Lancet* **349**:1505-10.
355. **Fan, S., J. Wang, R. Yuan, Y. Ma, Q. Meng, M. R. Erdos, R. G. Pestell, F. Yuan, K. J. Auborn, I. D. Goldberg, and E. M. Rosen.** 1999. BRCA1 inhibition of estrogen receptor signaling in transfected cells. *Science* **284**:1354-6.
356. **Fan, S., Y. X. Ma, C. Wang, R. Q. Yuan, Q. Meng, J. A. Wang, M. Erdos, I. D. Goldberg, P. Webb, P. J. Kushner, R. G. Pestell, and E. M. Rosen.** 2001. Role of direct interaction in BRCA1 inhibition of estrogen receptor activity. *Oncogene* **20**:77-87.
357. **Annab, L. A., R. E. Hawkins, G. Solomon, J. C. Barrett, and C. A. Afshari.** 2000. Increased cell survival by inhibition of BRCA1 using an antisense approach in an estrogen responsive ovarian carcinoma cell line. *Breast Cancer Res* **2**:139-48.
358. **Li, W., C. Xiao, B. K. Vonderhaar, and C. X. Deng.** 2007. A role of estrogen/ERalpha signaling in BRCA1-associated tissue-specific tumor formation. *Oncogene* **26**:7204-12.
359. **Eakin, C. M., M. J. Maccoss, G. L. Finney, and R. E. Klevit.** 2007. Estrogen receptor alpha is a putative substrate for the BRCA1 ubiquitin ligase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**:5794-9.
360. **Heine, G. F., and J. D. Parvin.** 2007. BRCA1 control of steroid receptor ubiquitination. *Sci STKE* **2007**:pe34.

361. **Pujol, P., S. G. Hilsenbeck, G. C. Chamness, and R. M. Elledge.** 1994. Rising levels of estrogen receptor in breast cancer over 2 decades. *Cancer* **74**:1601-6.
362. **Powles, T. J.** 2002. Breast cancer prevention. *Oncologist* **7**:60-4.
363. **Loman, N., O. Johannsson, P. O. Bendahl, A. Borg, M. Ferno, and H. Olsson.** 1998. Steroid receptors in hereditary breast carcinomas associated with BRCA1 or BRCA2 mutations or unknown susceptibility genes. *Cancer* **83**:310-9.
364. **Mote, P. A., J. A. Leary, K. A. Avery, K. Sandelin, G. Chenevix-Trench, J. A. Kirk, and C. L. Clarke.** 2004. Germ-line mutations in BRCA1 or BRCA2 in the normal breast are associated with altered expression of estrogen-responsive proteins and the predominance of progesterone receptor A. *Genes Chromosomes Cancer* **39**:236-48.
365. **Miller, K.** 2003. Estrogen and DNA damage: the silent source of breast cancer? *J Natl Cancer Inst* **95**:100-2.
366. **Revankar, C. M., H. D. Mitchell, A. S. Field, R. Burai, C. Corona, C. Ramesh, L. A. Sklar, J. B. Arterburn, and E. R. Prossnitz.** 2007. Synthetic estrogen derivatives demonstrate the functionality of intracellular GPR30. *ACS Chem Biol* **2**:536-44.
367. **Pietras, R. J., and C. M. Szego.** 1984. Specific internalization of estrogen and binding to nuclear matrix in isolated uterine cells. *Biochem Biophys Res Commun* **123**:84-91.
368. **Liehr, J. G.** 2000. Is estradiol a genotoxic mutagenic carcinogen? *Endocr Rev* **21**:40-54.
369. **Lavigne, J. A., J. E. Goodman, T. Fonong, S. Odwin, P. He, D. W. Roberts, and J. D. Yager.** 2001. The effects of catechol-O-methyltransferase inhibition on estrogen metabolite and oxidative DNA damage levels in estradiol-treated MCF-7 cells. *Cancer Res* **61**:7488-94.
370. **Roy, D., and Y. J. Abul-Hajj.** 1997. Estrogen-nucleic acid adducts: guanine is major site for interaction between 3,4-estrone quinone and COIII gene. *Carcinogenesis* **18**:1247-9.
371. **Yue, W., R. J. Santen, J. P. Wang, Y. Li, M. F. Verderame, W. P. Bocchinfuso, K. S. Korach, P. Devanesan, R. Todorovic, E. G. Rogan, and E. L. Cavalieri.** 2003. Genotoxic metabolites of estradiol in breast: potential mechanism of estradiol induced carcinogenesis. *J Steroid Biochem Mol Biol* **86**:477-86.

372. **Cavaliere, E., K. Frenkel, J. G. Liehr, E. Rogan, and D. Roy.** 2000. Estrogens as endogenous genotoxic agents--DNA adducts and mutations. *J Natl Cancer Inst Monogr*:75-93.
373. **Yager, J. D., and N. E. Davidson.** 2006. Estrogen carcinogenesis in breast cancer. *N Engl J Med* **354**:270-82.
374. **Roy, D., and R. D. Thomas.** 1994. Catalysis of the oxidation and reduction reactions of steroid and stilbene estrogens by nuclear enzymes. *Arch Biochem Biophys* **315**:310-6.
375. **Roy, D., Q. Cai, Q. Felty, and S. Narayan.** 2007. Estrogen-induced generation of reactive oxygen and nitrogen species, gene damage, and estrogen-dependent cancers. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev* **10**:235-57.
376. **Ting, N. S., and W. H. Lee.** 2004. The DNA double-strand break response pathway: becoming more BRCAish than ever. *DNA Repair (Amst)* **3**:935-44.
377. **Kong, L. Y., P. Szanislo, T. Albrecht, and J. G. Liehr.** 2000. Frequency and molecular analysis of hprt mutations induced by estradiol in Chinese hamster V79 cells. *Int J Oncol* **17**:1141-9.
378. **Chakravarti, D., P. C. Mailander, K. M. Li, S. Higginbotham, H. L. Zhang, M. L. Gross, J. L. Meza, E. L. Cavaliere, and E. G. Rogan.** 2001. Evidence that a burst of DNA depurination in SENCAR mouse skin induces error-prone repair and forms mutations in the H-ras gene. *Oncogene* **20**:7945-53.
379. **Samuni, A. M., E. Y. Chuang, M. C. Krishna, W. Stein, W. DeGraff, A. Russo, and J. B. Mitchell.** 2003. Semiquinone radical intermediate in catecholic estrogen-mediated cytotoxicity and mutagenesis: chemoprevention strategies with antioxidants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**:5390-5.
380. **Fernandez, S. V., I. H. Russo, and J. Russo.** 2006. Estradiol and its metabolites 4-hydroxyestradiol and 2-hydroxyestradiol induce mutations in human breast epithelial cells. *Int J Cancer* **118**:1862-8.
381. **Russo, J., Y. F. Hu, Q. Tahin, D. Mihaila, C. Slater, M. H. Lareef, and I. H. Russo.** 2001. Carcinogenicity of estrogens in human breast epithelial cells. *Apmis* **109**:39-52.
382. **Russo, J., M. H. Lareef, Q. Tahin, Y. F. Hu, C. Slater, X. Ao, and I. H. Russo.** 2002. 17Beta-estradiol is carcinogenic in human breast epithelial cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* **80**:149-62.
383. **Djelic, N., and D. Djelic.** 2002. Enhanced sister-chromatid exchange rate in human lymphocytes exposed to 17beta estradiol in vitro. *Arch Med Res* **33**:148-51.

384. **Thibodeau, P. A., N. Bissonnette, S. K. Bedard, D. Hunting, and B. Paquette.** 1998. Induction by estrogens of methotrexate resistance in MCF-7 breast cancer cells. *Carcinogenesis* **19**:1545-52.
385. **Korah, R. M., and M. Z. Humayun.** 1993. Mutagenic and recombinagenic effects of diethylstilbestrol quinone. *Mutat Res* **289**:205-14.
386. **Tsutsui, T., Y. Tamura, E. Yagi, and J. C. Barrett.** 2000. Involvement of genotoxic effects in the initiation of estrogen-induced cellular transformation: studies using Syrian hamster embryo cells treated with 17beta-estradiol and eight of its metabolites. *Int J Cancer* **86**:8-14.
387. **Newbold, R. R., and J. G. Liehr.** 2000. Induction of uterine adenocarcinoma in CD-1 mice by catechol estrogens. *Cancer Res* **60**:235-7.
388. **Turan, V. K., R. I. Sanchez, J. J. Li, S. A. Li, K. R. Reuhl, P. E. Thomas, A. H. Conney, M. A. Gallo, F. C. Kauffman, and S. Mesia-Vela.** 2004. The effects of steroidal estrogens in ACI rat mammary carcinogenesis: 17beta-estradiol, 2-hydroxyestradiol, 4-hydroxyestradiol, 16alpha-hydroxyestradiol, and 4-hydroxyestrone. *J Endocrinol* **183**:91-9.
389. **Simpson, E. R., C. Clyne, G. Rubin, W. C. Boon, K. Robertson, K. Britt, C. Speed, and M. Jones.** 2002. Aromatase--a brief overview. *Annu Rev Physiol* **64**:93-127.
390. **Hu, Y., S. Ghosh, A. Amleh, W. Yue, Y. Lu, A. Katz, and R. Li.** 2005. Modulation of aromatase expression by BRCA1: a possible link to tissue-specific tumor suppression. *Oncogene* **24**:8343-8.
391. **Ghosh, S., Y. Lu, A. Katz, Y. Hu, and R. Li.** 2007. Tumor suppressor BRCA1 inhibits a breast cancer-associated promoter of the aromatase gene (CYP19) in human adipose stromal cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **292**:E246-52.
392. **Lu, M., D. Chen, Z. Lin, S. Reierstad, A. M. Trauernicht, T. G. Boyer, and S. E. Bulun.** 2006. BRCA1 negatively regulates the cancer-associated aromatase promoters I.3 and II in breast adipose fibroblasts and malignant epithelial cells. *J Clin Endocrinol Metab* **91**:4514-9.
393. **Hakem, R., J. L. de la Pompa, C. Sirard, R. Mo, M. Woo, A. Hakem, A. Wakeham, J. Potter, A. Reitmair, F. Billia, E. Firpo, C. C. Hui, J. Roberts, J. Rossant, and T. W. Mak.** 1996. The tumor suppressor gene *Brcal* is required for embryonic cellular proliferation in the mouse. *Cell* **85**:1009-23.
394. **Schuyer, M., and E. M. Berns.** 1999. Is TP53 dysfunction required for BRCA1-associated carcinogenesis? *Mol Cell Endocrinol* **155**:143-52.

395. **Ramus, S. J., L. G. Bobrow, P. D. Pharoah, D. S. Finnigan, A. Fishman, M. Altaras, P. A. Harrington, S. A. Gayther, B. A. Ponder, and L. S. Friedman.** 1999. Increased frequency of TP53 mutations in BRCA1 and BRCA2 ovarian tumours. *Genes Chromosomes Cancer* **25**:91-6.
396. **Crook, T., L. A. Brooks, S. Crossland, P. Osin, K. T. Barker, J. Waller, E. Philp, P. D. Smith, I. Yulug, J. Peto, G. Parker, M. J. Allday, M. R. Crompton, and B. A. Gusterson.** 1998. p53 mutation with frequent novel condons but not a mutator phenotype in BRCA1- and BRCA2-associated breast tumours. *Oncogene* **17**:1681-9.
397. **Crook, T., S. Crossland, M. R. Crompton, P. Osin, and B. A. Gusterson.** 1997. p53 mutations in BRCA1-associated familial breast cancer. *Lancet* **350**:638-9.
398. **Phillips, K. A., K. Nichol, H. Ozcelik, J. Knight, S. J. Done, P. J. Goodwin, and I. L. Andrulis.** 1999. Frequency of p53 mutations in breast carcinomas from Ashkenazi Jewish carriers of BRCA1 mutations. *J Natl Cancer Inst* **91**:469-73.
399. **Tseng, S. L., I. C. Yu, C. T. Yue, S. F. Chang, T. M. Chang, C. W. Wu, and C. Y. Shen.** 1997. Allelic loss at BRCA1, BRCA2, and adjacent loci in relation to TP53 abnormality in breast cancer. *Genes Chromosomes Cancer* **20**:377-82.
400. **Kachhap, S. K., S. P. Vetale, P. Dange, and S. N. Ghosh.** 2001. Reduced expression of the BRCA1 gene and increased chromosomal instability in MCF-7 cell line. *Cell Biol Int* **25**:547-51.
401. **Favy, D. A., P. Rio, J. C. Maurizis, C. Hizel, Y. J. Bignon, and D. J. Bernard-Gallon.** 1999. Prolactin-dependent up-regulation of BRCA1 expression in human breast cancer cell lines. *Biochem Biophys Res Commun* **258**:284-91.
402. **Hundal, B. S., V. S. Dhillon, and I. S. Sidhu.** 1997. Genotoxic potential of estrogens. *Mutat Res* **389**:173-81.
403. **van Landeghem, A. A., J. Poortman, M. Nabuurs, and J. H. Thijssen.** 1985. Endogenous concentration and subcellular distribution of estrogens in normal and malignant human breast tissue. *Cancer Res* **45**:2900-6.
404. **Jefcoate, C. R., J. G. Liehr, R. J. Santen, T. R. Sutter, J. D. Yager, W. Yue, S. J. Santner, R. Tekmal, L. Demers, R. Pauley, F. Naftolin, G. Mor, and L. Berstein.** 2000. Tissue-specific synthesis and oxidative metabolism of estrogens. *J Natl Cancer Inst Monogr*:95-112.
405. **Eszterhas, S. K., E. E. Bouhassira, D. I. Martin, and S. Fiering.** 2002. 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**:469-79.

406. **Villemure, J. F., N. Savard, and A. Belmaaza.** 2001. 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**:963-74.
407. **Bertrand, P., Y. Saintigny, and B. S. Lopez.** 2004. p53's double life: transactivation-independent repression of homologous recombination. *Trends Genet* **20**:235-43.
408. **Dominguez-Bendala, J., H. Priddle, A. Clarke, and J. McWhir.** 2003. 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.
409. **Willers, H., E. E. McCarthy, P. Hubbe, J. Dahm-Daphi, and S. N. Powell.** 2001. Homologous recombination in extrachromosomal plasmid substrates is not suppressed by p53. *Carcinogenesis* **22**:1757-63.
410. **Bunz, F., C. Fauth, M. R. Speicher, A. Dutriaux, J. M. Sedivy, K. W. Kinzler, B. Vogelstein, and C. Lengauer.** 2002. Targeted inactivation of p53 in human cells does not result in aneuploidy. *Cancer Res* **62**:1129-33.
411. **Sengupta, S., S. P. Linke, R. Pedoux, Q. Yang, J. Farnsworth, S. H. Garfield, K. Valerie, J. W. Shay, N. A. Ellis, B. Wasylyk, and C. C. Harris.** 2003. BLM helicase-dependent transport of p53 to sites of stalled DNA replication forks modulates homologous recombination. *Embo J* **22**:1210-22.
412. **Gersten, K. M., and C. J. Kemp.** 1997. Normal meiotic recombination in p53-deficient mice. *Nat Genet* **17**:378-9.
413. **Tomlinson, G. E., T. T. Chen, V. A. Stastny, A. K. Virmani, M. A. Spillman, V. Tonk, J. L. Blum, N. R. Schneider, Wistuba, II, J. W. Shay, J. D. Minna, and A. F. Gazdar.** 1998. Characterization of a breast cancer cell line derived from a germ-line BRCA1 mutation carrier. *Cancer Res* **58**:3237-42.
414. **Henderson, B. R.** 2005. Regulation of BRCA1, BRCA2 and BARD1 intracellular trafficking. *Bioessays* **27**:884-93.
415. **Rodriguez, J. A., S. Schuchner, W. W. Au, M. Fabbro, and B. R. Henderson.** 2004. Nuclear-cytoplasmic shuttling of BARD1 contributes to its proapoptotic activity and is regulated by dimerization with BRCA1. *Oncogene* **23**:1809-20.

416. **Yuan, S. S., S. Y. Lee, G. Chen, M. Song, G. E. Tomlinson, and E. Y. Lee.** 1999. BRCA2 is required for ionizing radiation-induced assembly of Rad51 complex in vivo. *Cancer Res* **59**:3547-51.
417. **Sancar, A., L. A. Lindsey-Boltz, K. Unsal-Kacmaz, and S. Linn.** 2004. Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annu Rev Biochem* **73**:39-85.
418. **Goggins, M., R. H. Hruban, and S. E. Kern.** 2000. BRCA2 is inactivated late in the development of pancreatic intraepithelial neoplasia: evidence and implications. *Am J Pathol* **156**:1767-71.
419. **Cousineau, I., C. Abaji, and A. Belmaaza.** 2005. BRCA1 regulates RAD51 function in response to DNA damage and suppresses spontaneous sister chromatid replication slippage: implications for sister chromatid cohesion, genome stability, and carcinogenesis. *Cancer Res* **65**:11384-91.
420. **Cousineau, I., and A. Belmaaza.** 2007. BRCA1 haploinsufficiency, but not heterozygosity for a BRCA1-truncating mutation, deregulates homologous recombination. *Cell Cycle* **6**:962-71.
421. **Abaji, C., I. Cousineau, and A. Belmaaza.** 2005. BRCA2 regulates homologous recombination in response to DNA damage: implications for genome stability and carcinogenesis. *Cancer Res* **65**:4117-25.
422. **Meyn, M. S.** 1997. Chromosome instability syndromes: lessons for carcinogenesis. *Curr Top Microbiol Immunol* **221**:71-148.
423. **Marple, T., T. M. Kim, and P. Hasty.** 2006. Embryonic stem cells deficient for Brca2 or Blm exhibit divergent genotoxic profiles that support opposing activities during homologous recombination. *Mutat Res* **602**:110-20.
424. **Onoda, F., M. Seki, A. Miyajima, and T. Enomoto.** 2000. Elevation of sister chromatid exchange in *Saccharomyces cerevisiae* sgs1 disruptants and the relevance of the disruptants as a system to evaluate mutations in Bloom's syndrome gene. *Mutat Res* **459**:203-9.
425. **Wu, L., and I. D. Hickson.** 2003. The Bloom's syndrome helicase suppresses crossing over during homologous recombination. *Nature* **426**:870-4.
426. **Adams, M. D., M. McVey, and J. J. Sekelsky.** 2003. *Drosophila* BLM in double-strand break repair by synthesis-dependent strand annealing. *Science* **299**:265-7.
427. **Venkitaraman, A. R.** 2004. Tracing the network connecting BRCA and Fanconi anaemia proteins. *Nat Rev Cancer* **4**:266-76.

428. **Cox, M. M., M. F. Goodman, K. N. Kreuzer, D. J. Sherratt, S. J. Sandler, and K. J. Marians.** 2000. The importance of repairing stalled replication forks. *Nature* **404**:37-41.
429. **Byun, T. S., M. Pacek, M. C. Yee, J. C. Walter, and K. A. Cimprich.** 2005. Functional uncoupling of MCM helicase and DNA polymerase activities activates the ATR-dependent checkpoint. *Genes Dev* **19**:1040-52.
430. **Kai, M., M. N. Boddy, P. Russell, and T. S. Wang.** 2005. Replication checkpoint kinase Cds1 regulates Mus81 to preserve genome integrity during replication stress. *Genes Dev* **19**:919-32.
431. **Boddy, M. N., P. Shanahan, W. H. McDonald, A. Lopez-Girona, E. Noguchi, I. J. Yates, and P. Russell.** 2003. Replication checkpoint kinase Cds1 regulates recombinational repair protein Rad60. *Mol Cell Biol* **23**:5939-46.
432. **Branzei, D., and M. Foiani.** 2005. The DNA damage response during DNA replication. *Curr Opin Cell Biol* **17**:568-75.
433. **Branzei, D., and M. Foiani.** 2007. Interplay of replication checkpoints and repair proteins at stalled replication forks. *DNA Repair (Amst)* **6**:994-1003.
434. **Lopes, M., C. Cotta-Ramusino, A. Pellicoli, G. Liberi, P. Plevani, M. Muzi-Falconi, C. S. Newlon, and M. Foiani.** 2001. The DNA replication checkpoint response stabilizes stalled replication forks. *Nature* **412**:557-61.
435. **Lisby, M., J. H. Barlow, R. C. Burgess, and R. Rothstein.** 2004. Choreography of the DNA damage response: spatiotemporal relationships among checkpoint and repair proteins. *Cell* **118**:699-713.
436. **Smith, M. L., I. T. Chen, Q. Zhan, P. M. O'Connor, and A. J. Fornace, Jr.** 1995. Involvement of the p53 tumor suppressor in repair of u.v.-type DNA damage. *Oncogene* **10**:1053-9.
437. **Rubbi, C. P., and J. Milner.** 2003. p53 is a chromatin accessibility factor for nucleotide excision repair of DNA damage. *Embo J* **22**:975-86.
438. **Le Page, F., V. Randrianarison, D. Marot, J. Cabannes, M. Perricaudet, J. Feunteun, and A. Sarasin.** 2000. BRCA1 and BRCA2 are necessary for the transcription-coupled repair of the oxidative 8-oxoguanine lesion in human cells. *Cancer Res* **60**:5548-52.
439. **Gowen, L. C., A. V. Avrutskaya, A. M. Latour, B. H. Koller, and S. A. Leadon.** 1998. BRCA1 required for transcription-coupled repair of oxidative DNA damage. *Science* **281**:1009-12.

440. **Hartman, A. R., and J. M. Ford.** 2002. BRCA1 induces DNA damage recognition factors and enhances nucleotide excision repair. *Nat Genet* **32**:180-4.
441. **Navaraj, A., T. Mori, and W. S. El-Deiry.** 2005. Cooperation between BRCA1 and p53 in repair of cyclobutane pyrimidine dimers. *Cancer Biol Ther* **4**:1409-14.
442. **He, Z., L. A. Henricksen, M. S. Wold, and C. J. Ingles.** 1995. RPA involvement in the damage-recognition and incision steps of nucleotide excision repair. *Nature* **374**:566-9.
443. **Bogliolo, M., R. M. Taylor, K. W. Caldecott, and G. Frosina.** 2000. Reduced ligation during DNA base excision repair supported by BRCA2 mutant cells. *Oncogene* **19**:5781-7.
444. **Sgagias, M. K., K. U. Wagner, B. Hamik, S. Stoeger, R. Spieker, L. J. Huber, L. A. Chodosh, and K. H. Cowan.** 2004. Brcal-deficient murine mammary epithelial cells have increased sensitivity to CDDP and MMS. *Cell Cycle* **3**:1451-6.
445. **Godthelp, B. C., P. P. van Buul, N. G. Jaspers, E. Elghalbzouri-Maghrani, A. van Duijn-Goedhart, F. Arwert, H. Joenje, and M. Z. Zdzienicka.** 2006. Cellular characterization of cells from the Fanconi anemia complementation group, FA-D1/BRCA2. *Mutat Res* **601**:191-201.
446. **Wang, Q., H. Zhang, S. Guerrette, J. Chen, A. Mazurek, T. Wilson, A. Slupianek, T. Skorski, R. Fishel, and M. I. Greene.** 2001. Adenosine nucleotide modulates the physical interaction between hMSH2 and BRCA1. *Oncogene* **20**:4640-9.
447. **Lou, Z., K. Minter-Dykhouse, and J. Chen.** 2005. BRCA1 participates in DNA decatenation. *Nat Struct Mol Biol* **12**:589-93.
448. **Deming, P. B., C. A. Cistulli, H. Zhao, P. R. Graves, H. Piwnica-Worms, R. S. Paules, C. S. Downes, and W. K. Kaufmann.** 2001. The human decatenation checkpoint. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**:12044-9.
449. **Jensen, L. H., M. Dejligbjerg, L. T. Hansen, M. Grauslund, P. B. Jensen, and M. Sehested.** 2004. Characterisation of cytotoxicity and DNA damage induced by the topoisomerase II-directed bisdioxopiperazine anti-cancer agent ICRF-187 (dexrazoxane) in yeast and mammalian cells. *BMC Pharmacol* **4**:31.
450. **Gimenez-Abian, J. F., D. J. Clarke, J. Devlin, M. I. Gimenez-Abian, C. De la Torre, R. T. Johnson, A. M. Mullinger, and C. S. Downes.** 2000. Premitotic chromosome individualization in mammalian cells depends on topoisomerase II activity. *Chromosoma* **109**:235-44.

451. **Damelin, M., and T. H. Bestor.** 2007. The decatenation checkpoint. *Br J Cancer* **96**:201-5.
452. **Damelin, M., and T. H. Bestor.** 2006. Decatenation checkpoint deficiency destabilizes the stem cell genome. *Cell Cycle* **5**:345-6.
453. **Helt, C. E., W. A. Cliby, P. C. Keng, R. A. Bambara, and M. A. O'Reilly.** 2005. Ataxia telangiectasia mutated (ATM) and ATM and Rad3-related protein exhibit selective target specificities in response to different forms of DNA damage. *J Biol Chem* **280**:1186-92.
454. **Baskaran, R., L. D. Wood, L. L. Whitaker, C. E. Canman, S. E. Morgan, Y. Xu, C. Barlow, D. Baltimore, A. Wynshaw-Boris, M. B. Kastan, and J. Y. Wang.** 1997. Ataxia telangiectasia mutant protein activates c-Abl tyrosine kinase in response to ionizing radiation. *Nature* **387**:516-9.
455. **Chen, G., S. S. Yuan, W. Liu, Y. Xu, K. Trujillo, B. Song, F. Cong, S. P. Goff, Y. Wu, R. Arlinghaus, D. Baltimore, P. J. Gasser, M. S. Park, P. Sung, and E. Y. Lee.** 1999. Radiation-induced assembly of Rad51 and Rad52 recombination complex requires ATM and c-Abl. *J Biol Chem* **274**:12748-52.
456. **Olson, E., C. J. Nievera, V. Klimovich, E. Fanning, and X. Wu.** 2006. RPA2 is a direct downstream target for ATR to regulate the S-phase checkpoint. *J Biol Chem* **281**:39517-33.
457. **Liu, J. S., S. R. Kuo, and T. Melendy.** 2006. Phosphorylation of replication protein A by S-phase checkpoint kinases. *DNA Repair (Amst)* **5**:369-80.
458. **Olson, E., C. J. Nievera, E. Liu, A. Y. Lee, L. Chen, and X. Wu.** 2007. The Mre11 complex mediates the S-phase checkpoint through an interaction with RPA. *Mol Cell Biol.*
459. **Brosh, R. M., Jr., J. L. Li, M. K. Kenny, J. K. Karow, M. P. Cooper, R. P. Kureekattil, I. D. Hickson, and V. A. Bohr.** 2000. Replication protein A physically interacts with the Bloom's syndrome protein and stimulates its helicase activity. *J Biol Chem* **275**:23500-8.
460. **Wang, Y., C. D. Putnam, M. F. Kane, W. Zhang, L. Edelmann, R. Russell, D. V. Carrion, L. Chin, R. Kucherlapati, R. D. Kolodner, and W. Edelmann.** 2005. Mutation in Rpa1 results in defective DNA double-strand break repair, chromosomal instability and cancer in mice. *Nat Genet* **37**:750-5.
461. **Caldecott, K. W.** 2003. Protein-protein interactions during mammalian DNA single-strand break repair. *Biochem Soc Trans* **31**:247-51.

462. **Farah, J. A., G. Cromie, L. Davis, W. W. Steiner, and G. R. Smith.** 2005. Activation of an alternative, *rec12 (spo11)*-independent pathway of fission yeast meiotic recombination in the absence of a DNA flap endonuclease. *Genetics* **171**:1499-511.
463. **Spiro, C., and C. T. McMurray.** 2003. Nuclease-deficient FEN-1 blocks Rad51/BRCA1-mediated repair and causes trinucleotide repeat instability. *Mol Cell Biol* **23**:6063-74.
464. **Paques, F., and J. E. Haber.** 1997. Two pathways for removal of nonhomologous DNA ends during double-strand break repair in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **17**:6765-71.
465. **Belmaaza, A., E. Milot, J. F. Villemure, and P. Chartrand.** 1994. Interference of DNA sequence divergence with precise recombinational DNA repair in mammalian cells. *Embo J* **13**:5355-60.
466. **Villemure, J. F., A. Belmaaza, and P. Chartrand.** 1997. The processing of DNA ends at double-strand breaks during homologous recombination: different roles for the two ends. *Mol Gen Genet* **256**:533-8.
467. **Brenneman, M. A., B. M. Wagener, C. A. Miller, C. Allen, and J. A. Nickoloff.** 2002. XRCC3 controls the fidelity of homologous recombination: roles for XRCC3 in late stages of recombination. *Mol Cell* **10**:387-95.
468. **Prince, P. R., M. J. Emond, and R. J. Monnat, Jr.** 2001. Loss of Werner syndrome protein function promotes aberrant mitotic recombination. *Genes Dev* **15**:933-8.
469. **Kikuchi, K., Y. Taniguchi, A. Hatanaka, E. Sonoda, H. Hohegger, N. Adachi, Y. Matsuzaki, H. Koyama, D. C. van Gent, M. Jasin, and S. Takeda.** 2005. Fen-1 facilitates homologous recombination by removing divergent sequences at DNA break ends. *Mol Cell Biol* **25**:6948-55.
470. **Kitagawa, R., and M. B. Kastan.** 2005. The ATM-dependent DNA damage signaling pathway. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **70**:99-109.
471. **Sumara, I., E. Vorlaufer, P. T. Stukenberg, O. Kelm, N. Redemann, E. A. Nigg, and J. M. Peters.** 2002. The dissociation of cohesin from chromosomes in prophase is regulated by Polo-like kinase. *Mol Cell* **9**:515-25.
472. **Hodges, C. A., E. Revenkova, R. Jessberger, T. J. Hassold, and P. A. Hunt.** 2005. SMC1beta-deficient female mice provide evidence that cohesins are a missing link in age-related nondisjunction. *Nat Genet* **37**:1351-5.

473. **Mann, M. B., C. A. Hodges, E. Barnes, H. Vogel, T. J. Hassold, and G. Luo.** 2005. Defective sister-chromatid cohesion, aneuploidy and cancer predisposition in a mouse model of type II Rothmund-Thomson syndrome. *Hum Mol Genet* **14**:813-25.
474. **Inoue, A., T. Li, S. K. Roby, M. B. Valentine, M. Inoue, K. Boyd, V. J. Kidd, and J. M. Lahti.** 2007. Loss of ChlR1 helicase in mouse causes lethality due to the accumulation of aneuploid cells generated by cohesion defects and placental malformation. *Cell Cycle* **6**:1646-54.
475. **Grigorova, M., J. M. Staines, H. Ozdag, C. Caldas, and P. A. Edwards.** 2004. Possible causes of chromosome instability: comparison of chromosomal abnormalities in cancer cell lines with mutations in BRCA1, BRCA2, CHK2 and BUB1. *Cytogenet Genome Res* **104**:333-40.
476. **Weaver, Z., C. Montagna, X. Xu, T. Howard, M. Gadina, S. G. Brodie, C. X. Deng, and T. Ried.** 2002. Mammary tumors in mice conditionally mutant for *Brcal* exhibit gross genomic instability and centrosome amplification yet display a recurring distribution of genomic imbalances that is similar to human breast cancer. *Oncogene* **21**:5097-107.
477. **Deng, C. X.** 2001. Tumorigenesis as a consequence of genetic instability in *Brcal* mutant mice. *Mutat Res* **477**:183-9.
478. **Xu, X., Z. Weaver, S. P. Linke, C. Li, J. Gotay, X. W. Wang, C. C. Harris, T. Ried, and C. X. Deng.** 1999. Centrosome amplification and a defective G2-M cell cycle checkpoint induce genetic instability in BRCA1 exon 11 isoform-deficient cells. *Mol Cell* **3**:389-95.
479. **Torres-Rosell, J., F. Machin, S. Farmer, A. Jarmuz, T. Eydmann, J. Z. Dalgaard, and L. Aragon.** 2005. SMC5 and SMC6 genes are required for the segregation of repetitive chromosome regions. *Nat Cell Biol* **7**:412-9.
480. **Kobayashi, T., and A. R. Ganley.** 2005. Recombination regulation by transcription-induced cohesin dissociation in rDNA repeats. *Science* **309**:1581-4.
481. **Mazoyer, S.** 2005. Genomic rearrangements in the BRCA1 and BRCA2 genes. *Hum Mutat* **25**:415-22.
482. **Fero, M. L., E. Randel, K. E. Gurley, J. M. Roberts, and C. J. Kemp.** 1998. The murine gene p27Kip1 is haplo-insufficient for tumour suppression. *Nature* **396**:177-80.
483. **Venkatachalam, S., Y. P. Shi, S. N. Jones, H. Vogel, A. Bradley, D. Pinkel, and L. A. Donehower.** 1998. Retention of wild-type p53 in tumors from p53

- heterozygous mice: reduction of p53 dosage can promote cancer formation. *Embo J* **17**:4657-67.
484. **Rodriguez, J. A., W. W. Au, and B. R. Henderson.** 2004. Cytoplasmic mislocalization of BRCA1 caused by cancer-associated mutations in the BRCT domain. *Exp Cell Res* **293**:14-21.
485. **Au, W. W., and B. R. Henderson.** 2005. The BRCA1 RING and BRCT domains cooperate in targeting BRCA1 to ionizing radiation-induced nuclear foci. *J Biol Chem* **280**:6993-7001.
486. **Fabbro, M., J. A. Rodriguez, R. Baer, and B. R. Henderson.** 2002. BARD1 induces BRCA1 intranuclear foci formation by increasing RING-dependent BRCA1 nuclear import and inhibiting BRCA1 nuclear export. *J Biol Chem* **277**:21315-24.
487. **Boulton, S. J., J. S. Martin, J. Polanowska, D. E. Hill, A. Gartner, and M. Vidal.** 2004. BRCA1/BARD1 orthologs required for DNA repair in *Caenorhabditis elegans*. *Curr Biol* **14**:33-9.
488. **Simpson, K. J., M. R. Wati, A. J. Deans, G. J. Lindeman, and M. A. Brown.** 2004. MMTV-trBrcal mice display strain-dependent abnormalities in vaginal development. *Int J Dev Biol* **48**:675-8.
489. **French, J. D., J. Dunn, C. E. Smart, N. Manning, and M. A. Brown.** 2006. Disruption of BRCA1 function results in telomere lengthening and increased anaphase bridge formation in immortalized cell lines. *Genes Chromosomes Cancer* **45**:277-89.
490. **Irminger-Finger, I., J. V. Soriano, G. Vaudan, R. Montesano, and A. P. Sappino.** 1998. In vitro repression of Brcal-associated RING domain gene, Bard1, induces phenotypic changes in mammary epithelial cells. *J Cell Biol* **143**:1329-39.
491. **Irminger-Finger, I., and C. E. Jefford.** 2006. Is there more to BARD1 than BRCA1? *Nat Rev Cancer* **6**:382-91.
492. **Corde, S., J. Balosso, H. Elleaume, M. Renier, A. Joubert, M. C. Biston, J. F. Adam, A. M. Charvet, T. Brochard, J. F. Le Bas, F. Esteve, and N. Foray.** 2003. Synchrotron photoactivation of cisplatin elicits an extra number of DNA breaks that stimulate RAD51-mediated repair pathways. *Cancer Res* **63**:3221-7.
493. **Yun, J., Q. Zhong, J. Y. Kwak, and W. H. Lee.** 2005. Hypersensitivity of Brcal-deficient MEF to the DNA interstrand crosslinking agent mitomycin C is associated with defect in homologous recombination repair and aberrant S-phase arrest. *Oncogene* **24**:4009-16.

494. **Lambert, S., A. Watson, D. M. Sheedy, B. Martin, and A. M. Carr.** 2005. Gross chromosomal rearrangements and elevated recombination at an inducible site-specific replication fork barrier. *Cell* **121**:689-702.
495. **Vrieling, H.** 2001. Mitotic maneuvers in the light. *Nat Genet* **28**:101-2.
496. **Puget, N., S. Gad, L. Perrin-Vidoz, O. M. Sinilnikova, D. Stoppa-Lyonnet, G. M. Lenoir, and S. Mazoyer.** 2002. Distinct BRCA1 rearrangements involving the BRCA1 pseudogene suggest the existence of a recombination hot spot. *Am J Hum Genet* **70**:858-65.
497. **Clarke, C. L., J. Sandle, A. A. Jones, A. Sofronis, N. R. Patani, and S. R. Lakhani.** 2006. Mapping loss of heterozygosity in normal human breast cells from BRCA1/2 carriers. *Br J Cancer* **95**:515-9.
498. **Maggiolini, M., D. Bonofiglio, V. Pezzi, A. Carpino, S. Marsico, V. Rago, A. Vivacqua, D. Picard, and S. Ando.** 2002. Aromatase overexpression enhances the stimulatory effects of adrenal androgens on MCF7 breast cancer cells. *Mol Cell Endocrinol* **193**:13-8.
499. **Marks, J. R., G. Huper, J. P. Vaughn, P. L. Davis, J. Norris, D. P. McDonnell, R. W. Wiseman, P. A. Futreal, and J. D. Iglehart.** 1997. BRCA1 expression is not directly responsive to estrogen. *Oncogene* **14**:115-21.
500. **Monteiro, A. N.** 2003. BRCA1: the enigma of tissue-specific tumor development. *Trends Genet* **19**:312-5.
501. **Holt, D., M. Dreimanis, M. Pfeiffer, F. Firgaira, A. Morley, and D. Turner.** 1999. Interindividual variation in mitotic recombination. *Am J Hum Genet* **65**:1423-7.
502. **Wijnhoven, S. W., H. J. Kool, L. H. Mullenders, R. Slater, A. A. van Zeeland, and H. Vrieling.** 2001. DMBA-induced toxic and mutagenic responses vary dramatically between NER-deficient Xpa, Xpc and Csb mice. *Carcinogenesis* **22**:1099-106.
503. **Proietti De Santis, L., C. L. Garcia, A. S. Balajee, G. T. Brea Calvo, L. Bassi, and F. Palitti.** 2001. Transcription coupled repair deficiency results in increased chromosomal aberrations and apoptotic death in the UV61 cell line, the Chinese hamster homologue of Cockayne's syndrome B. *Mutat Res* **485**:121-32.
504. **Ord, M. J., A. Herbert, and A. R. Mattocks.** 1985. The ability of bifunctional and monofunctional pyrrole compounds to induce sister-chromatid exchange (SCE) in human lymphocytes and mutations in *Salmonella typhimurium*. *Mutat Res* **149**:485-93.

505. **Connell, J. R., and A. S. Medcalf.** 1984. The induction of SCE with relation to specific base methylation of DNA in Chinese hamster cells by N-methyl-N-nitrosourea and dimethylsulfate. *Basic Life Sci* **29 Pt A**:343-52.
506. **Noruzinia, M., I. Coupier, and P. Pujol.** 2005. Is BRCA1/BRCA2-related breast carcinogenesis estrogen dependent? *Cancer*.
507. **Morrison, C., E. Sonoda, N. Takao, A. Shinohara, K. Yamamoto, and S. Takeda.** 2000. The controlling role of ATM in homologous recombinational repair of DNA damage. *Embo J* **19**:463-71.
508. **Bishop, A. J., C. Barlow, A. J. Wynshaw-Boris, and R. H. Schiestl.** 2000. Atm deficiency causes an increased frequency of intrachromosomal homologous recombination in mice. *Cancer Res* **60**:395-9.
509. **Yuan, Z. M., Y. Huang, T. Ishiko, S. Kharbanda, R. Weichselbaum, and D. Kufe.** 1997. Regulation of DNA damage-induced apoptosis by the c-Abl tyrosine kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**:1437-40.
510. **Brown, E. J., and D. Baltimore.** 2000. ATR disruption leads to chromosomal fragmentation and early embryonic lethality. *Genes Dev* **14**:397-402.
511. **Smith, T. M., M. K. Lee, C. I. Szabo, N. Jerome, M. McEuen, M. Taylor, L. Hood, and M. C. King.** 1996. Complete genomic sequence and analysis of 117 kb of human DNA containing the gene BRCA1. *Genome Res* **6**:1029-49.
512. **King, M. C., S. Wieand, K. Hale, M. Lee, T. Walsh, K. Owens, J. Tait, L. Ford, B. K. Dunn, J. Costantino, L. Wickerham, N. Wolmark, and B. Fisher.** 2001. Tamoxifen and breast cancer incidence among women with inherited mutations in BRCA1 and BRCA2: National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project (NSABP-P1) Breast Cancer Prevention Trial. *Jama* **286**:2251-6.
513. **Yang, L., R. Hwang, Y. Chiang, E. M. Gordon, W. F. Anderson, and D. Parekh.** 1998. Mechanisms for ganciclovir resistance in gastrointestinal tumor cells transduced with a retroviral vector containing the herpes simplex virus thymidine kinase gene. *Clin Cancer Res* **4**:731-41.
514. **Cabanes, A., M. Wang, S. Olivo, S. DeAssis, J. A. Gustafsson, G. Khan, and L. Hilakivi-Clarke.** 2004. Prepubertal estradiol and genistein exposures up-regulate BRCA1 mRNA and reduce mammary tumorigenesis. *Carcinogenesis* **25**:741-8.
515. **Metcalf, K., H. T. Lynch, P. Ghadirian, N. Tung, I. Olivotto, E. Warner, O. I. Olopade, A. Eisen, B. Weber, J. McLennan, P. Sun, W. D. Foulkes, and S. A. Narod.** 2004. Contralateral breast cancer in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. *J Clin Oncol* **22**:2328-35.

516. **Russo, J., S. V. Fernandez, P. A. Russo, R. Fernbaugh, F. S. Sheriff, H. M. Lareef, J. Garber, and I. H. Russo.** 2006. 17-Beta-estradiol induces transformation and tumorigenesis in human breast epithelial cells. *Faseb J* **20**:1622-34.
517. **Taylor, R. M., A. Thistlethwaite, and K. W. Caldecott.** 2002. Central role for the XRCC1 BRCT I domain in mammalian DNA single-strand break repair. *Mol Cell Biol* **22**:2556-63.
518. **Jeggo, P., and M. Lobrich.** 2006. Radiation-induced DNA damage responses. *Radiat Prot Dosimetry* **122**:124-7.
519. **Fan, S., Q. Meng, K. Auborn, T. Carter, and E. M. Rosen.** 2006. BRCA1 and BRCA2 as molecular targets for phytochemicals indole-3-carbinol and genistein in breast and prostate cancer cells. *Br J Cancer* **94**:407-26.
520. **Combs, G. F., Jr., and W. P. Gray.** 1998. Chemopreventive agents: selenium. *Pharmacol Ther* **79**:179-92.
521. **Kavanagh, K. T., L. J. Hafer, D. W. Kim, K. K. Mann, D. H. Sherr, A. E. Rogers, and G. E. Sonenshein.** 2001. Green tea extracts decrease carcinogen-induced mammary tumor burden in rats and rate of breast cancer cell proliferation in culture. *J Cell Biochem* **82**:387-98.
522. **Nakachi, K., S. Matsuyama, S. Miyake, M. Suganuma, and K. Imai.** 2000. Preventive effects of drinking green tea on cancer and cardiovascular disease: epidemiological evidence for multiple targeting prevention. *Biofactors* **13**:49-54.
523. **Meng, Q., F. Yuan, I. D. Goldberg, E. M. Rosen, K. Auborn, and S. Fan.** 2000. Indole-3-carbinol is a negative regulator of estrogen receptor-alpha signaling in human tumor cells. *J Nutr* **130**:2927-31.
524. **Auborn, K. J., S. Fan, E. M. Rosen, L. Goodwin, A. Chandraskaren, D. E. Williams, D. Chen, and T. H. Carter.** 2003. Indole-3-carbinol is a negative regulator of estrogen. *J Nutr* **133**:2470S-2475S.
525. **Boutros, R., V. Lobjois, and B. Ducommun.** 2007. CDC25 phosphatases in cancer cells: key players? Good targets? *Nat Rev Cancer* **7**:495-507.
526. **Kawabe, T.** 2004. G₂ checkpoint abrogators as anticancer drugs. *Mol Cancer Ther* **3**:513-519

Chapitre 9. Annexe I

**MSH2-deficient human cells exhibit a defect in the accurate termination of
homology-directed repair of DNA double-strand breaks**

Josée-France Villemure, Christine Abaji, Isabelle Cousineau, and Abdellah Belmaaza

Centre de recherche, Centre hospitalier de l'Université de Montréal, Hôpital Notre-
Dame et Institut du cancer de Montréal, Montréal, Québec, Canada

Running title: Abberant DSB repair associated with MSH2 deficiency

Key words. MSH2, homologous recombination, gene conversion, mismatch
repair, double-strand breaks

Article publié dans:

Cancer Research, vol. 63 : 3334-3339, 2003

MSH2-deficient Human Cells Exhibit a Defect in the Accurate Termination of Homology-directed Repair of DNA Double-Strand Breaks¹

Josée-France Villemure, Christine Abaji, Isabelle Cousineau, and Abdellah Belmaaza²

Department of Biochemistry, Université de Montréal, Succ. Centre-Ville, Montréal, Québec, Canada H3C 3J7 [J.-F. V.], and Department of Biochemistry [C. A.], Molecular Biology Program [I. C.], and Department of Microbiology and Immunology [A. B.], Université de Montréal, Centre de Recherche du CHUM, Hôpital Notre-Dame, Institut du Cancer de Montréal, Montréal, Québec, Canada H2L 4M1.

ABSTRACT

Mutations in the mismatch repair (MMR) genes *hMSH2* and *hMLH1* have been associated with hereditary nonpolyposis colorectal cancer. Tumor cell lines that are deficient in MMR exhibit a high mutation rate, a defect in the response to certain types of DNA damage and in transcription-coupled repair, as well as an increase in the rate of gene amplification. We show here that *hMSH2*-deficient tumor cell lines lost most of their ability to accurately repair plasmid DNA double-strand breaks (DSBs) by homologous recombination, compared with MMR-proficient or *hMLH1*-deficient tumor cell lines. In all of these cell lines, DSB repair occurred almost exclusively by nonreciprocal homologous recombination: gene conversion (GC). However, there were two types of GC products: precise and rearranged. The rearranged products contained deletions or insertions of sequences and represented GC intermediates trapped at various stages and shunted to nonhomologous end joining. In MMR-proficient or *MLH1*-deficient cells, >50% of GC products were of the precise type, whereas in two *MSH2*-deficient backgrounds, this proportion decreased to 8%, whereas that of rearranged GC products increased by 2-fold. These results seem to predict a novel way by which *MSH2*-deficiency could promote mutation: deletion or insertion mutations associated with DSB repair, which may also contribute to cancer predisposition.

INTRODUCTION

MMR³ is a highly conserved repair system that corrects mismatches arising during DNA replication and safeguards genomic integrity (1–5). Defective MMR is strongly associated with HNPCC, an autosomal dominant inherited disease characterized by early onset colon tumors, as well as cancers of the endometrium, stomach, upper urinary tract, small intestine, and ovary (6, 7). MMR consists of at least seven proteins, including four bacterial MutL homologues, *hMLH1*, *hMLH3*, *hPMS1*, *hPMS2*, and three MutS homologues, *hMSH2*, *hMSH3*, and *hMSH6*. Defects in *hMSH2* and *hMLH1* appear to be the cause of most HNPCCs (8).

MMR proteins function as heterodimeric complexes. *hMSH2* can form a heterodimer with either *hMSH3* or *hMSH6*. *hMSH2* is a uniformly essential component of all of the heterodimers, whereas *hMSH3* and *hMSH6* modify substrate specificity. *hMSH2*-*hMSH6* heterodimer recognizes single bp mismatches and small IDLs, whereas *hMSH2*-*hMSH3* heterodimer recognizes an overlapping set

of small IDLs as well as larger IDLs, containing up to 12 nucleotides (9, 10). The relatively low number of *hMSH6* and *hMSH3* mutations in HNPCC kindreds has been attributed to their imparted redundancy in substrate specificity. *hMLH1* can form a heterodimer with *hPMS2*, *hPMS1*, or *hMLH3* (11). The three types of *hMutL* complexes are presumably functionally redundant. *hMutS* plays a central role in initiating mispair recognition and binding, and *hMutL* acts as a molecular matchmaker between *hMutS* and downstream proteins to complete the repair process (1–5). Therefore, both *hMSH2* and *hMLH1* are critically important to MMR activity, as reflected by their predominant alteration in HNPCC patients, as well as in most sporadic tumors with microsatellite instability.

The majority of cells deficient in MMR exhibit a mutator phenotype characterized by a 100-1000-fold increment in the rate of spontaneous mutation at microsatellites and coding sequences (12–15). However, studies on mice with MMR gene knockout indicate that mutations of MMR genes other than *hMSH2* and *hMLH1* may induce a mutator phenotype but not necessarily an increase in colon tumors, implying that a mutator phenotype alone may not be sufficient for intestinal tumor formation (16). In addition to editing replication, MMR proteins have also been implicated in the editing of recombination between divergent sequences, in transcription-coupled repair of DNA damage, and are also thought to function as lesion sensors for certain types of DNA damage that kill by triggering apoptosis (1, 3–5, 17). Moreover, MMR proteins inhibit gene amplifications (18, 19) and have been associated with the fidelity of DNA DSB repair, although the underlying mechanisms remain unknown (19–23).

DNA DSBs are common lesions that occur in all of the cells, and DSB repair is a fundamental mechanism of genome protection. There are two major DSB repair pathways in mammalian cells: homologous recombination and NHEJ (24). Defects in either pathway have been linked with genome instability and cancer (25–27). In mammalian cells, DSB repair by homologous recombination occurs almost exclusively by GC: a nonreciprocal transfer of genetic information from an intact homologous duplex to a broken duplex (28–30). In this pathway (31), DSBs are first processed to yield 3'-ended single-strand tails (Fig. 1a) that invade a homologous donor duplex (Fig. 1b). DNA synthesis is then primed from the 3' end of the invading strand, which results in the copying of donor information (Fig. 1c). DSB repair may be completed through displacement of the newly synthesized strand from the donor template and its annealing with the 3' noninvading single-stranded end to elicit GC only (Refs. 32–36; Fig. 1d). DSB repair by GC occurs with fidelity and reflects the capacity of cells to precisely restore the damaged DNA with no loss or gain of nucleotide sequences (Fig. 1d). NHEJ differs from GC in that there is no requirement for extensive homology between DSB ends, and is potentially error-prone, as nucleotide insertions and deletions are tolerated at the rejoining sites. GC and NHEJ compete with one another (37), but very little is known about how eukaryotic cells elect one or the other (38). Under certain circumstances, eukaryotic cells can couple GC and NHEJ to seal DSBs and ensure their genome stability (Fig. 1e; Refs. 30, 32–34, 39–45). In these cases, GC intermediates are interrupted at various stages and shunted to NHEJ, being characterized by deletions, insertions, or duplications of DNA sequences at

Received 10/16/02; accepted 4/8/03.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

¹ Supported by the National Cancer Institute of Canada for the Terry Fox Run, and in part by the Canadian Breast Cancer Research Initiative (to A. B.). A. B. is a scholar of the Cancer Research Society/Medical Research Council of Canada, and of the Fonds de la recherche en santé du Québec (FRSQ). J.-F. V. and C. A. were the recipients of Candereil fellowships.

² To 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 Séve, Y-5634, Montréal, Québec, Canada H2L 4M1. Phone: (514) 890-8000, extension 28946; Fax: (514) 412-7591; E-mail: [redacted]

³ The abbreviations used are: MMR, mismatch repair; HNPCC, hereditary nonpolyposis colorectal cancer; DSB, double-strand break; IDL, insertion/deletion loop; CMV, cytomegalovirus; GC, gene conversion; PGC, precise gene conversion; NHEJ, nonhomologous end joining; L1, long interspersed nuclear element; L1Md, long interspersed nuclear element of the mouse *Musculus domesticus*.

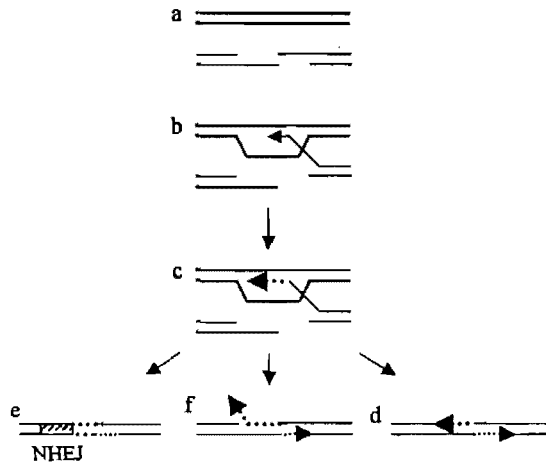


Fig. 1. The one-sided invasion model proposed for DSB repair (32, 33). In this model, only 1 3' single-strand at a DSB (a) invades an intact homologous duplex (b) and primes new DNA synthesis to stabilize the intermediate (c). Resolution of such an intermediate can occur by unwinding of the newly synthesized strand, which can engage with the noninvading strand in annealing, leading to a PGC product (d), or in NHEJ, resulting in a rearranged product (e). When the newly synthesized strand is longer than the noninvading single-strand, NHEJ would lead to insertion/duplication at the joining site, whereas strand annealing would generate an intermediate with a protruding 3' tail (f). Such an intermediate can be resolved to a PGC product (d) or to a rearranged GC product (e) in the absence of stabilizing factors (see text).

NHEJ junctions (30, 32–34, 39–46). Such rearranged GC products can be as frequent as PGC products (32–34, 39–41).

Here, we report that the proportions of precise and rearranged GC products vary according to the MMR status of the cells. In MMR-proficient or MLH1-deficient cells, >50% of GC products were of the precise type as has been reported with several distinct MMR proficient backgrounds (30, 32–34, 39–45), whereas in two MSH2-deficient cell lines, this proportion decreased to 8%, whereas that of rearranged products increased by 2-fold. These results suggest a defect in the accurate termination of GC in MSH2-deficient cells and seem to predict a novel way by which MSH2-deficiency could promote mutation: deletion or insertion mutations associated with DSB repair.

MATERIALS AND METHODS

Cell Lines and Culture. The tumor cell lines used in these experiments originated from the American Type Culture Collection (Rockville, MD). They were: the MMR-proficient human colorectal carcinoma cell line SW480 (47), the hMLH1-deficient colorectal carcinoma cell line HCT116 (47), the hMSH2-deficient colorectal carcinoma cell line LoVo (48), and the hMSH2-deficient uterine tumor cell line SK-UT-1 (49) grown in Leibovitz's L15, McCoy's, Ham's F12, and MEM media, respectively. All of the media were supplemented with 10% fetal bovine serum (20% for LoVo cells), and gentamicin (50 µg/ml). Except for SW480 cells, which were cultured without CO₂, all of the other cells were cultured at 37°C in a humidified 5% CO₂ incubator.

Plasmid Construct and Cell Transfections. The recombination reporter plasmid pST100, shown in Fig. 2, was linearized with I-SceI restriction enzyme (Fig. 2) and introduced with the plasmid pGKpuro into cells by electroporation as described previously (44). The electroporated cells were divided in two separate cultures. Forty-eight h later, puromycin (Sigma, St. Louis, MO) containing medium was added to one third of the transfected cells, and G418 (Geneticin; Life Technologies, Inc., Grand Island, NY) containing medium was added to the remaining two thirds. The media were changed two to three times per week, and the surviving colonies were counted, picked, and expanded in their corresponding medium for additional analysis.

PCR Analysis of DSB Repair Products. Genomic DNA from individual G418^R colonies (recombinants) was extracted and digested with the restriction enzyme *NaeI* that cut once in pST100 at the *neo3'* cassette. Colonies with

single integration events were determined by Southern blot hybridization, using the *Hyg* gene as a probe. More than 80% of G418^R colonies analyzed contained single pST100 recombinant molecules. For analysis of the recombinants (Fig. 2), the following primer pairs were used in PCR: (a) *Neo952* (5'-ccacgacggggcttcttgcgcag-3') and *neo1300* (5'-gtcacgacgagatcctgcgctc-3') amplify the 1.4 kb fragment, or 1.4 and 2.4 kb fragments, between the realigned *neo* cassettes; (b) *Neo800* (5'-gaatgacctccaccaag-3') and *hyg4419* (5'-gctgtgtagaagtactgcgcg-3') amplify the 2.1 kb fragment between the transferred *neo5'* cassette and the *Hyg* gene; (c) *Neo1300* and *hyg4419* amplify the 3.6 kb fragment between the *neo3'* cassette and the *Hyg* gene; (d) *Neo800* and pUC469 (5'-tgaccatgattacgccaagct-3') amplify the 1.7 kb fragment between the *neo5'* cassette and pUC sequences; and (e) *Neo1300* and pUC469 amplify the 3.2 kb fragment between the inverted *neo3'* cassette and pUC sequences

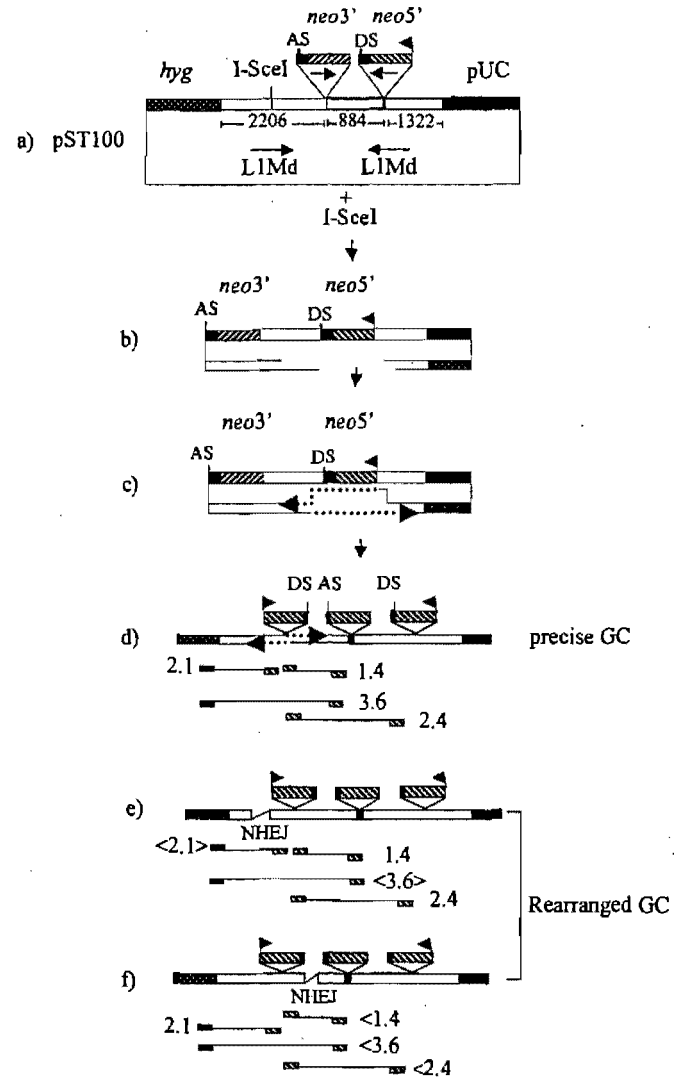


Fig. 2. Schematic representation of the reporter plasmid pST100 and some expected GC products. The arrows in pST100 (a) indicate the 5' to 3' orientation of LIMd sequences used as the intron, and the *neo* gene truncated cassettes (*neo3'* and *neo5'*). The *neo3'* cassette, which contains the 3' end of the *Neo* gene coding sequences and an acceptor splice site (AS), is between the two inverted LIMd copies. The *neo5'* cassette, which contains the HSV-TK gene promoter (arrow), the 5' coding region of *Neo* gene, and a donor splice site (DS), is within 1 LIMd copy. Cutting at the I-SceI site generates two DSB ends that are perfectly homologous to the 884 and 1322 bp segments flanking the *neo5'* cassette (a and b). Either end can invade and initiate DSB repair (32, 34, 39). After strand invasion, priming of DNA synthesis, release of the newly synthesized strand by unwinding and its annealing with the noninvading strand (c), a PGC product would result (d). GC intermediates shunted to NHEJ contain NHEJ junctions on either side of the transferred *neo5'* cassette (e and f), depending on which end is used for initiation and which end is used for termination (32, 34, 39). NHEJ junctions are expected to exhibit deletions and/or insertions of DNA sequences and, thus, their corresponding PCR fragments would be smaller or bigger than those corresponding to PGC products (d-f).

(Fig. 2). PCR amplifications were conducted with the Expand High Fidelity PCR System kit (Roche Diagnostic, Indianapolis, IN) in a thermal cycler for 30 cycles. The PCR products were analyzed by restriction enzymes, Southern blot hybridization, and DNA sequencing as described previously (44).

Complementation Experiments. Complete *hMLH1* and *hMSH2* cDNAs used to correct the MMR deficiency of HCT116, LoVo, and SK-UT-1 cells, respectively, were generous gifts from Drs. Nick Nicolaides (Magainin Institute of Molecular Medicine, Plymouth Meeting, PA) and Richard Kolodner (Ludwig Institute for Cancer Research, La Jolla, CA), respectively. These cDNAs were subcloned in pCEP-4 under control of the CMV promoter. The plasmid pCEP-4 (Invitrogen, Carlsbad, CA) replicates autonomously in human cells and contains the *Hyg* gene. After transfection with pCEP-cDNA constructs, 20 *HYG^R* clones were picked for each cell line, and their protein extracts were subjected to Western blot analysis, using antibodies against *hMSH2* (Ab-3) and *hMLH1* (Ab-2) at 2 μ g/ml, and affinity-purified rabbit antiserum against these antibodies at a dilution of 1:1000 (Oncogene, Boston, MA). SW480 cells express *hMSH2* and *hMLH1*, and nontransfected LoVo and SK-UT-1 cells express only *hMLH1*, whereas nontransfected HCT116 cells express *hMSH2* but not *hMLH1* (data not shown). However, except for 3 clones expressing *MLH1* at a barely detectable level, none of the 60 *HYG^R* clones analyzed was expressing *hMSH2* or *hMLH1*. Because the *Hyg* gene is upstream of the CMV promoter and both are transcribed in the same orientation, we thought that the lack of cDNA expression might be because of transcriptional interference: epigenetic silencing of the CMV promoter by transcriptional activity of the upstream *Hyg* gene (50). Therefore, we inverted the orientation of the *Hyg* gene relative to the CMV promoter. We analyzed 20 new *HYG^R* clones from each cell line, but again none of these was expressing the transfected cDNA. While conducting these studies, it was reported that the expression of *MSH2* and *MLH1* cDNAs is toxic to LoVo and HCT116 cells (51). This would explain why, in our hands, only *HYG^R* clones that did not express *hMSH2* or *hMLH1* grew in culture.

RESULTS

Rationale of the Experiment. The intron-based inverted repeat recombination assay system used in this study was described previously (44). Briefly, recombination between two inverted introns, L1 (LIMd) sequences, will realign two flanking inverted neomycin-resistance (*Neo*) gene truncated cassettes (*neo5'* and *neo3'*; Fig. 2). This produces a spliceable *Neo* gene that confers resistance to G418 drug. The use of intron allows the detection of both precise and rearranged products (Ref. 44; Figs. 1 and 2).

A DSB was introduced in one copy of the intron LIMd at the I-SceI restriction site in the reporter plasmid pST100 (Fig. 2). The linear plasmid pST100 was introduced with circular pGKpuro into the following human cancer cell lines: MMR-proficient SW480, *hMSH2*-deficient LoVo and SK-UT-1, and *hMLH1*-deficient HCT116. These cell lines have been widely used to study the effects of MMR on mutation rates, DNA damage tolerance, microsatellite instability, and genome rearrangements (1, 3-5, 18, 19). The plasmid pGKpuro contains the puromycin gene that confers puromycin (PURO) drug resistance to cells; its inclusion was a convenient way for assessing transfection efficiencies and for normalizing recombination frequency data obtained in different experiments. It allowed the comparison of

Table 1 The efficiency of DSB repair in MMR-proficient and -deficient human cells

Cell lines	Experiments ^a	G418 ^R colonies	PURO ^R colonies	Frequency of recombination
SW480 (MMR ⁺)	4			
pST100/SceI		46	530	8.68%
HCT116 (<i>mlh1</i> ⁻)	6			
pST100/SceI		75	5413	1.38%
SK-UT-1 (<i>msb2</i> ⁻)	4			
pST100/SceI		74	7380	1.00%
LoVo (<i>msb2</i> ⁻)	3			
pST100/SceI		112	2395	4.6%

^a Each experiment represents >5 transfections.

Table 2 Outcome of DSB repair in MMR-proficient and -deficient cell lines

Cell lines	G418 ^R /PCR ^a	GC	Precise GC ^b	GC-NHEJ ^c
LTK (MMR ⁺)	41	39	21/39 (54%)	18/39 (46%)
SW480 (MMR ⁺)	33	32	18/32 (56%)	14/32 (44%)
HCT116 (<i>mlh1</i> ⁻)	46	43	25/43 (58%)	18/43 (42%)
SK-UT-1 (<i>msb2</i> ⁻)	27	26	02/26 (8%)	24/26 (92%)
LoVo (<i>msb2</i> ⁻)	34	33	03/33 (9%)	30/33 (91%)

^a G418^R/PCR: G418^R colonies analyzed by PCR.

^b Precise GC is decreased by 7-fold in MSH2-deficient SK-UT-1 and LoVo cells compared with MSH2-proficient LTK⁻, SW480, and HCT116 cells ($P < 0.001$, χ^2).

^c GC-NHEJ: GC associated with NHEJ increased by 2-fold in MSH2-deficient SK-UT-1 and LoVo cells compared with MSH2-proficient cells ($P < 0.001$, χ^2).

normalized recombination frequencies (44, 52, 53), expressed here as the number of stable G418^R colonies divided by the number of PURO^R colonies. Recombinant molecules of pST100, which do not replicate autonomously, must integrate randomly by nonhomologous recombination into the genome of transfected cells to generate stable G418^R colonies. Analysis of the recombinants was done by PCR on genomic DNA of stable G418^R colonies that had integrated single copy recombinant molecules as determined by Southern blot hybridization, using the *Hyg* gene as a probe (see "Materials and Methods").

Homologous Recombination Frequencies. MMR-proficient cells recombined transfected DNA more efficiently than MMR-deficient cells (Table 1). The frequency of homologous recombination (homologous:nonhomologous ratio) with MMR-proficient SW480 cells was 8-fold higher than with either *MLH1*-deficient HCT116 or *MSH2*-deficient SK-UT-1 cells, and 2-fold higher than with *MSH2*-deficient LoVo cells.

PCR Analysis of G418^R Colonies. DSB repair by GC will transfer, presumably through DNA synthesis (Fig. 1), the *neo5'* cassette from the intact LIMd copy to the broken LIMd copy (Fig. 2). GC can occur within one pST100 molecule (Fig. 2) or between two pST100 molecules (data not shown). Such events can be characterized by PCR using different sets of primer pairs on genomic DNA of G418^R colonies. A GC event would generate PCR fragments of 1.4 kb between the two realigned *neo3'* and *neo5'* cassettes, 2.1 kb between the transferred *neo5'* cassette and the *Hyg* gene, 3.6 kb between the *neo3'* cassette and the *Hyg* gene, and 2.4 kb between the two *neo5'* cassettes when the original *neo5'* cassette is maintained after integration of the recombinant molecule (Fig. 2).

DSB Repair Occurs Almost Exclusively by GC. PCR analysis of G418^R colonies with MMR-proficient SW480, *MLH1*-deficient HCT116, *MSH2*-deficient LoVo, or SK-UT-1 cells revealed that DSB repair products were almost exclusively GC events (Table 2). Analysis of G418^R colonies in previous studies on the MMR-proficient mouse LTK⁻ cell line (44) gave similar results (Table 2). Representatives of these recombinants can be seen in Fig. 3.

Two Types of GC Products. With MMR-proficient SW480 and LTK⁻ cells, and *MLH1*-deficient HCT116 cells, >50% of GC products were precise, whereas in *MSH2*-deficient LoVo and SK-UT-1 cells, only 8% were of the precise type (Table 2). Representatives of the precise type are shown in Fig. 3A (a and b), and their corresponding full-length PCR fragments (1.4 and 2.4 kb, 2.1 kb, 1.7 kb, 3.6 kb, and 1.4 kb) appear in Fig. 3B (Lanes 2-6, respectively). Restriction enzyme analysis of 1.4-kb PCR fragments from 40 distinct recombinants disclosed similar patterns, and sequencing of 3 revealed no small deletions, insertions, or substitutions of nucleotides compared with the parental LIMd sequence (data not presented). The remaining GC products were rearranged, because they generate PCR fragments that are smaller or bigger than those generated with precise products (Fig. 3A, panels c-e; Fig. 3B, Lanes 7-14). Restriction enzyme analysis of these fragments showed deletions and insertions of variable sizes, and DNA se-

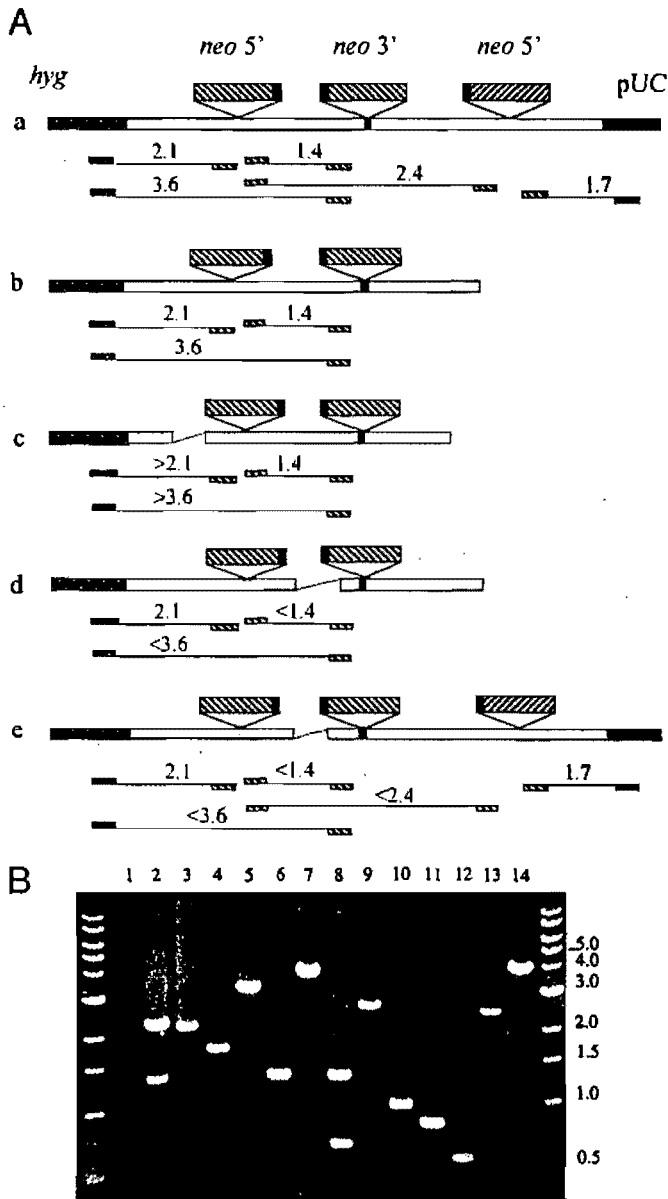


Fig. 3. *A*, schematic representation of recombinant molecules analyzed by PCR. PGC (*a* and *b*) and rearranged GC with deletions (*c-e*) or duplications (*c*) generate PCR fragments smaller or bigger than the expected full length. *B*, PCR analyses of DSB repair products. PCR bands diagnostic of PGC products: 1.4 kb and 2.4 kb (Lane 2), 2.1 kb (Lane 3), 1.7 kb (Lane 4), 3.6 kb (Lane 5), and 1.4 kb (Lane 6). PCR bands diagnostic of rearranged GC products (see *c-e* in Fig. 2): *c*, >3.6 kb (Lanes 7 and 14) and >2.1 kb (Lane 13); *d*, <3.6 kb (Lane 9) and <1.4 kb (Lanes 10-12); *e*, <1.4 and 2.4 kb (Lane 8). Negative control for PCR: pST100 mixed with genomic DNA of nontransfected cells (Lane 1).

quencing of 5 reduced-size PCR fragments smaller than 1.4 kb (Fig. 3*B*, Lanes 10-12) revealed NHEJ flanked on both sides by pST100 L1 sequences (Fig. 3*A*, panels *d* and *e*), whereas sequencing of three bigger size PCR fragments, between the transferred *neo5'* cassette and the *Hyg* gene, evinced NHEJ with insertions and duplications of L1 sequences (Fig. 3*A*, panel *c*; Fig. 3*B*, Lanes 7, 13, and 14). The NHEJ junctions between the transferred *neo5'* cassette and the *Hyg* gene incurred both deletions and insertions (Fig. 3*A*, panel *c*), whereas those between the two realigned *neo3'* and *neo5'* cassettes all presented deletions (Fig. 3*A*, panels *d* and *e*). Insertions that would lengthen the intron were not detected; they probably interfere with intron splicing (44).

DISCUSSION

The decreased frequency of homologous recombination (homologous:nonhomologous ratios) observed with MMR-deficient cells relative to wild-type cells could be attributable either to reduced homologous recombination efficiency or to increased nonhomologous integration efficiency. Although our results cannot discriminate between these two possibilities because of unsuccessful complementation of MSH2- or MLH1-deficient cells (see "Materials and Methods"), recent studies have indicated the heightened efficiency of nonhomologous integration of linearized plasmid or retroviral DNAs in hMSH2- and hMLH1-deficient cells (19). However, our frequency data show no correlation between the efficiency of nonhomologous integration and the proportions of precise and rearranged GC products (Tables 1 and 2). The ratio of homologous:nonhomologous recombination obtained with MMR-proficient cells was 8-fold higher than with MLH1-deficient HCT116 cells, and yet both cell lines gave similar proportions of precise and rearranged products. The ratio observed with MSH2-deficient SK-UT-1 cells was similar to that obtained with HCT116 cells, yet both cell lines presented different proportions of precise and rearranged products. Similarly, the ratio with LoVo cells was 4-fold higher than with SK-UT-1 cells, but these two cell lines gave similar proportions of precise and rearranged products.

The NHEJ joints in the rearranged GC products analyzed were flanked on both sides by pST100 sequences, indicating that such joints occurred before nonhomologous integration of the recombinants in the chromosomes of host cells. Such rearranged GC products occur in all of the organisms studied (30, 33, 34, 39-45, 54) and are best explained with the one-sided invasion model proposed for DSB repair (Fig. 1), in which only one DSB end invades the homologous template and primes DNA synthesis, whereas the other end terminates DSB repair either by annealing or by NHEJ (32-34, 39). In this model, the length and nature of the sequences acquired by the recipient broken molecule are only dependent on the extent of DNA polymerization. In this way, if DNA synthesis extends beyond the homologous region shared by the two participant duplexes and continues into flanking nonhomologous sequences, NHEJ of the released, newly synthesized strand and the noninvading end would generate a recipient molecule with insertions/duplications (30, 32-34, 39-46). However, if DNA synthesis does not extend across the shared homologous region, NHEJ would generate a recipient molecule with deletions. Unlike insertions/duplications, deletion events would be detected only under nonselective conditions (32-34, 39, 54).

In MMR-proficient cells, the proportion of GC associated with NHEJ events can reach but never exceed that of PGC events, even when no constraints are imposed on such events (32, 34, 39-42, 44). However, in 2 MSH2-deficient cells, the proportion of PGC products decreased by 7-fold, and that of rearranged products increased by 2-fold, compared with MMR-proficient or MLH1-deficient cells (Table 2). These results suggest a defect in the accurate termination of GC in MSH2-deficient cells. Although the exact molecular mechanism underlying such a defect remains to be elucidated, two possibilities can be entertained. First, because NHEJ became highly efficient in MMR-deficient cells (19), this process would out-compete homologous recombination (strand annealing) in terminating DSB repair (Fig. 1). However, the fact that NHEJ increased in both MSH2- and MLH1-deficient cells (19), and that inaccurate termination of DSB repair decreased only in MSH2-deficient cells argues against this possibility. Second, increased NHEJ events may be a consequence of the formation of unstable GC intermediates; e.g., the annealed region between the newly synthesized strand and the noninvading end could be very short (Fig. 1*d*) and/or contain protruding 3' single-strand tails

(Fig. 1f). The latter would be expected to form when the released, newly synthesized strand is longer than the noninvading end. In yeast, removal of such protruding 3' nonhomologous tails from GC intermediates involves the participation of the nucleotide excision repair endonuclease RAD1-RAD10 and the heterodimer MSH2-MSH3, but not MSH6, MLH1, or PMS1 proteins (55). It has been postulated that the MSH2-MSH3 complex stabilizes GC intermediates by binding to unpaired 3' nonhomologous single strands at the ends of the annealed region, and this allows RAD1/RAD10 to locate and cleave such unpaired strands (55). Mutations in *XPF/ERCC1*, the mammalian homologue of *RAD1/RAD10*, also lead to an increased proportion of homologous recombination associated with NHEJ when nonhomologous termini are present at DSBs (56). Taking these studies into consideration, it is easy to imagine that unstable GC intermediates would unwind and be shunted to NHEJ, which could explain the shift from precise to rearranged GC products.

The results reported show a defect in the accurate termination of DSB repair by GC, and an increase in the coupling of GC and NHEJ in MSH2-deficient cells. This seems to predict an additional way by which MSH2 deficiency could contribute to the accumulation of genomic rearrangements and, thus, to cancer predisposition.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Drs. Nick Nicolaidis (Magainin Institute of Molecular Medicine, Plymouth Meeting, PA) and Richard Kolodner (Ludwig Institute for Cancer Research, San Diego, CA) for providing the cDNA of hMLH1 and hMSH2, respectively. We also thank Shona Teixeira, Fatima Zouanat, Nathalie Marçal, Zeinab Daher, and Caroline Lejeune for their technical assistance, and Ovid Da Silva for editing this text.

REFERENCES

- Modrich, P., and Lahue, R. Mismatch repair in replication fidelity, genetic recombination, and cancer biology. *Annu. Rev. Biochem.*, **65**: 101-133, 1996.
- Umar, A., and Kunkel, T. A. DNA-replication fidelity, mismatch repair and genome instability in cancer cells. *Eur. J. Biochem.*, **238**: 297-307, 1996.
- Buermeyer, A. B., Deschenes, S. M., Baker, S. M., and Liskay, R. M. Mammalian DNA mismatch repair. *Annu. Rev. Genet.*, **33**: 533-564, 1999.
- Kolodner, R. D., and Marsischky, G. T. Eukaryotic DNA mismatch repair. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **9**: 89-96, 1999.
- Harfe, B. D., and Jinks-Robertson, S. DNA mismatch repair and genetic instability. *Annu. Rev. Genet.*, **34**: 359-399, 2000.
- de la Chapelle, A., and Peltomaki, P. Genetics of hereditary colon cancer. *Annu. Rev. Genet.*, **29**: 329-348, 1995.
- Kinzler, K. W., and Vogelstein, B. Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell*, **87**: 159-170, 1996.
- Peltomaki, P. Deficient DNA mismatch repair: a common etiologic factor for colon cancer. *Hum. Mol. Genet.*, **10**: 735-740, 2001.
- Acharya, S., Wilson, T., Gradia, S., Kane, M. F., Guerrette, S., Marsischky, G. T., Kolodner, R., and Fishel, R. hMSH2 forms specific mismatch-binding complexes with hMSH3 and hMSH6. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**: 13629-13634, 1996.
- Marsischky, G. T., Filosi, N., Kane, M. F., and Kolodner, R. Redundancy of *Saccharomyces cerevisiae* MSH3 and MSH6 in MSH2-dependent mismatch repair. *Genes Dev.*, **10**: 407-420, 1996.
- Kondo, E., Horii, A., and Fukushige, S. The interacting domains of three MutL heterodimers in man: hMLH1 interacts with 36 homologous amino acid residues within hMLH3, hPMS1 and hPMS2. *Nucleic Acids Res.*, **29**: 1695-1702, 2001.
- Kat, A., Thilly, W. G., Fang, W. H., Longley, M. J., Li, G. M., and Modrich, P. An alkylation-tolerant, mutator human cell line is deficient in strand-specific mismatch repair. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**: 6424-6428, 1993.
- Bhattacharyya, N. P., Skandalis, A., Ganesh, A., Groden, J., and Meuth, M. Mutator phenotypes in human colorectal carcinoma cell lines. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**: 6319-6323, 1994.
- Shibata, D., Peinado, M. A., Ionov, Y., Malkhosyan, S., and Perucho, M. Genomic instability in repeated sequences is an early somatic event in colorectal tumorigenesis that persists after transformation. *Nat. Genet.*, **6**: 273-281, 1994.
- Eshleman, J. R., Lang, E. Z., Bowerfind, G. K., Parsons, R., Vogelstein, B., Willson, J. K., Veigl, M. L., Sedwick, W. D., and Markowitz, S. D. Increased mutation rate at the hprt locus accompanies microsatellite instability in colon cancer. *Oncogene*, **10**: 33-37, 1995.
- Prolla, T. A., Baker, S. M., Harris, A. C., Tsao, J. L., Yao, X., Bronner, C. E., Zheng, B., Gordon, M., Reneker, J., Arheim, N., Shibata, D., Bradley, A., and Liskay, R. M. Tumour susceptibility and spontaneous mutation in mice deficient in Mlh1. Pms1 and Pms2 DNA mismatch repair. *Nat. Genet.*, **18**: 276-279, 1998.
- Li, G. M. The role of mismatch repair in DNA damage-induced apoptosis. *Oncol. Res.*, **11**: 393-400, 1999.
- Chen, S., Bigner, S. H., and Modrich, P. High rate of CAD gene amplification in human cells deficient in MLH1 or MSH6. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**: 13802-13807, 2001.
- Lin, C. T., Lyu, Y. L., Xiao, H., Lin, W. H., and Whang-Peng, J. Suppression of gene amplification and chromosomal DNA integration by the DNA mismatch repair system. *Nucleic Acids Res.*, **29**: 3304-3310, 2001.
- de Wind, N., Dekker, M., Berns, A., Radman, M., and te Riele, H. Inactivation of the mouse Msh2 gene results in mismatch repair deficiency, methylation tolerance, hyperrecombination, and predisposition to cancer. *Cell*, **82**: 321-330, 1995.
- de Wind, N., Dekker, M., Claij, N., Jansen, L., van Klink, Y., Radman, M., Riggins, G., van der Valk, M., van't Wout, K., and te Riele, H. HNPCC-like cancer predisposition in mice through simultaneous loss of Msh3 and Msh6 mismatch-repair protein functions. *Nat. Genet.*, **23**: 359-362, 1999.
- Abuin, A., Zhang, H., and Bradley, A. Genetic analysis of mouse embryonic stem cells bearing Msh3 and Msh2 single and compound mutations. *Mol. Cell. Biol.*, **20**: 149-157, 2000.
- Elliott, B., and Jasin, M. Repair of double-strand breaks by homologous recombination in mismatch repair-defective mammalian cells. *Mol. Cell. Biol.*, **21**: 2671-2682, 2001.
- Jeggo, P. A. DNA breakage and repair. *Adv. Genet.*, **38**: 185-218, 1998.
- Khanna, K. K., and Jackson, S. P. DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. *Nat. Genet.*, **27**: 247-254, 2001.
- Pierce, A. J., Stark, J. M., Araujo, F. D., Moynahan, M. E., Berwick, M., and Jasin, M. Double-strand breaks and tumorigenesis. *Trends Cell Biol.*, **11**: S52-S59, 2001.
- Venkitaraman, A. R. Cancer susceptibility and the functions of BRCA1 and BRCA2. *Cell*, **108**: 171-182, 2002.
- Richard, M., Belmaaza, A., Gusew, N., Wallenburg, J. C., and Chartrand, P. Integration of a vector containing a repetitive LINE-1 element in the human genome. *Mol. Cell. Biol.*, **14**: 6689-6695, 1994.
- Taghian, D. G., and Nickoloff, J. A. Chromosomal double-strand breaks induce gene conversion at high frequency in mammalian cells. *Mol. Cell. Biol.*, **17**: 6386-6393, 1997.
- Johnson, R. D., and Jasin, M. Sister chromatid gene conversion is a prominent double-strand break repair pathway in mammalian cells. *EMBO J.*, **19**: 3398-3407, 2000.
- Osman, F., and Subramani, S. Double-strand break-induced recombination in eukaryotes. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.*, **58**: 263-299, 1998.
- Belmaaza, A., Wallenburg, J. C., Brouillette, S., Gusew, N., and Chartrand, P. Genetic exchange between endogenous and exogenous LINE-1 repetitive elements in mouse cells. *Nucleic Acids Res.*, **18**: 6385-6391, 1990.
- Belmaaza, A., and Chartrand, P. One-sided invasion events in homologous recombination at double-strand breaks. *Mutat. Res.*, **314**: 199-208, 1994.
- Villemure, J.-F., Belmaaza, A., and Chartrand, P. The processing of DNA ends at double-strand breaks during homologous recombination: different roles for the two ends. *Mol. Gen. Genet.*, **256**: 533-538, 1997.
- Allers, T., and Lichten, M. Differential timing and control of noncrossover and crossover recombination during meiosis. *Cell*, **106**: 47-57, 2001.
- Hunter, N., and Kleckner, N. The single-end invasion: an asymmetric intermediate at the double-strand break to double-holliday junction transition of meiotic recombination. *Cell*, **106**: 59-70, 2001.
- Liang, F., Han, M., Romanienko, P. J., and Jasin, M. Homology-directed repair is a major double-strand break repair pathway in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**: 5172-5177, 1998.
- Haber, J. E. Partners and pathways repairing a double-strand break. *Trends Genet.*, **16**: 259-264, 2000.
- Belmaaza, A., Milot, E., Villemure, J. F., and Chartrand, P. Interference of DNA sequence divergence with precise recombinational DNA repair in mammalian cells. *EMBO J.*, **13**: 5355-5360, 1994.
- Sakagami, K., Tokinaga, Y., Yoshikura, H., and Kobayashi, I. Homology-associated nonhomologous recombination in mammalian gene targeting. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**: 8527-8531, 1994.
- Puchta, H., Dujon, B., and Hohn, B. Two different but related mechanisms are used in plants for the repair of genomic double-strand breaks by homologous recombination. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**: 5055-5060, 1996.
- Rubin, E., and Levy, A. A. Abortive gap repair: underlying mechanism for Ds element formation. *Mol. Cell. Biol.*, **17**: 6294-6302, 1997.
- Richardson, C., Moynahan, M. E., and Jasin, M. Double-strand break repair by interchromosomal recombination: suppression of chromosomal translocations. *Genes Dev.*, **12**: 3831-3842, 1998.
- 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.
- Tremblay, A., Jasin, M., and Chartrand, P. A double-strand break in a chromosomal LINE element can be repaired by gene conversion with various endogenous LINE elements in mouse cells. *Mol. Cell. Biol.*, **20**: 54-60, 2000.
- Richardson, C., and Jasin, M. Coupled homologous and nonhomologous repair of a double-strand break preserves genomic integrity in mammalian cells. *Mol. Cell. Biol.*, **20**: 9068-9075, 2000.

47. Parsons, R., Li, G. M., Longley, M. J., Fang, W. H., Papadopoulos, N., Jen, J., de la Chapelle, A., Kinzler, K. W., Vogelstein, B., and Modrich, P. Hypermutability and mismatch repair deficiency in RER+ tumor cells. *Cell*, *75*: 1227-1236, 1993.
48. Umar, A., Boyer, J. C., Thomas, D. C., Nguyen, D. C., Risinger, J. I., Boyd, J., Ionov, Y., Perucho, M., and Kunkel, T. A. Defective mismatch repair in extracts of colorectal and endometrial cancer cell lines exhibiting microsatellite instability. *J. Biol. Chem.*, *269*: 14367-14370, 1994.
49. Risinger, J. I., Umar, A., Boyer, J. C., Evans, A. C., Berchuck, A., Kunkel, T. A., and Barrett, J. C. Microsatellite instability in gynecological sarcomas and in hMSH2 mutant uterine sarcoma cell lines defective in mismatch repair activity. *Cancer Res.*, *55*: 5664-5669, 1995.
50. Villemure, J-F., Savard, N., and Belmaaza, A. Promoter suppression in cultured mammalian cells can be blocked by the chicken β -globin chromatin insulator 5'HS4 and matrix/scaffold attachment regions. *J. Mol. Biol.*, *312*: 963-974, 2001.
51. Zhang, H., Richards, B., Wilson, T., Lloyd, M., Cranston, A., Thorburn, A., Fishel, R., and Meuth, M. Apoptosis induced by overexpression of hMSH2 or hMLH1. *Cancer Res.*, *59*: 3021-3027, 1999.
52. Saparbaev, M., Prakash, L., and Prakash, S. Requirement of mismatch repair genes MSH2 and MSH3 in the RAD1-RAD10 pathway of mitotic recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, *142*: 727-736, 1996.
53. Adair, G. M., Scheerer, J. B., Brotheman, A., McConville, S., Wilson, J. H., and Nairn, R. S. Targeted recombination at the Chinese hamster APRT locus using insertion versus replacement vectors. *Somat. Cell Mol. Genet.*, *24*: 91-105, 1998.
54. Orr-Weaver, T. L., and Szostak, J. W. Yeast recombination: the association between double-strand gap repair and crossing-over. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, *80*: 4417-4421, 1983.
55. Sugawara, N., Paques, F., Colaiacovo, M., and Haber, J. E. Role of *Saccharomyces cerevisiae* Msh2 and Msh3 repair proteins in double-strand break-induced recombination. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, *94*: 9214-9219, 1997.
56. Adair, G. M., Rolig, R. L., Moore-Faver, D., Zabelshansky, M., Wilson, J. H., and Nairn, R. S. Role of ERCCI in removal of long non-homologous tails during targeted homologous recombination. *EMBO J.*, *19*: 5552-5561, 2000.

Chapitre 9. Annexe II

**Disruption of p53 by viral oncoprotein HPV16-E6 does not deregulate
chromosomal homologous recombination in a transcriptional interference-free
assay system**

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

Centre de recherche, Centre hospitalier de l'Université de Montréal, Hôpital Notre-
Dame et Institut du cancer de Montréal, Montréal, Québec, Canada

Running title: Lack of p53-directed suppression of recombination

Key words. Transcriptional interference, promoter suppression, RAD51,
homologous recombination, p53

Article publié dans:

Cell Cycle, vol. 4(6) : 831-837, 2005

Report

Disruption of p53 by the Viral Oncoprotein HPV16-E6 Does Not Deregulate Chromosomal Homologous Recombination in a Transcriptional Interference-Free Assay System

Jean-François Lemelin¹

Christine Abaji²

Isabelle Cousineau¹

Abdellah Belmaaza^{3,*}

¹Molecular Biology Program; ²Department of Biochemistry; ³Departments of Microbiology and Medicine; Université de Montréal; Montréal, Quebec, Canada

*Correspondence to: Abdellah Belmaaza; CHUM-Hôpital Notre-Dame, Institut du cancer de Montréal; 1560, rue Sherbrooke est; Pavillon J.A. de Séve; Y-5634 Montréal, Québec, Canada H2L 4M1; Tel.: 514.890.8000x28946; Fax: 514.412.7591; Email: [REDACTED]

Received 03/25/05; Accepted 04/08/05

Previously published online as a *Cell Cycle* E-publication:
<http://www.landesbioscience.com/journals/cc/abstract.php?id=1725>

KEY WORDS

transcriptional interference, promoter suppression, RAD51, homologous recombination, p53

ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to thank Dr. Simon Powell for providing the pCMV*neo*-E6 and pCMV*neo* expression vectors, and we are grateful to Dr. Christoph Lengauer for critical reading of the manuscript and helpful comments. We also thank Mr Ovid da Silva, Research Support Office, Research Centre, CHUM, for his editorial revision of this manuscript.

This work is supported by the Canadian Breast Cancer Research Initiative to A.B. A.B. is a scholar of the Fonds de la recherche en santé du Québec. 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.

ABSTRACT

In addition to its well established role in the maintenance of genome integrity by regulating transcription of genes involved in cell cycle arrest and programmed cell death, the tumour suppressor p53 has also been shown to inhibit spontaneous chromosomal homologous recombination (HR) between adjacent transcription units, raising the possibility that p53 may prevent chromosomal rearrangements by suppressing HR between repetitive DNA elements (ectopic HR). Consistent with its role in the maintenance of genome integrity is that p53 does not suppress HR between homologous chromosomes (allelic HR) or identical sister chromatids, raising the question of how p53 discriminates between ectopic and allelic HR events. Here, we report that disruption of human p53 by the viral oncoprotein HPV16-E6 does not result in increased rates of chromosomal HR between adjacent DNA repeats in a transcriptional interference-free assay system in which a HR reporter gene can escape transcription repression. These results argue against a direct role for p53 in the regulation of HR mechanisms, imply that HR assay systems may be important determinants of the outcome, and suggest that p53 may suppress ectopic HR through its known ability to repress transcription and alter chromatin structure.

ABBREVIATIONS

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; HygR, 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; *PuroR*, puromycin-resistant; *PuroS*, puromycin-sensitive; SSA, single-strand annealing; TSA, trichostatin A; wt, wild-type

INTRODUCTION

Homologous recombination (HR), the exchange of genetic information between pairs of homologous chromosomes (allelic HR), or between perfectly aligned identical sister chromatids, is important for chromosome disjunction and repair of DNA double-strand breaks (DSBs). 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.^{1,2} On the other hand, non-allelic (ectopic) HR events in multigene families or dispersed repeat sequence families can have drastic consequences for genome stability.³ HR can be either reciprocal (crossover) or non-reciprocal (gene conversion), and requires the DNA strand exchange protein RAD51, the equivalent of bacterial RecA.⁴

Crossover 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 between heterologous chromosomes.^{3,5,6} 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).⁷ Gene conversion, which involves the unidirectional transfer of information from one gene to another, can act as a natural gene therapy process, leading to the correction of deleterious mutations,^{8,9} but can also propagate such mutations, culminating in loss of heterozygosity, genetic diseases and cancer.¹⁰⁻¹⁵ Given the genome-destabilizing effects of ectopic HR, it is important that such events occur at low rates relative to allelic HR or sister chromatids exchange (SCE).

Unlike allelic HR,¹ ectopic HR in mammals can be difficult to measure, as it is a relatively uncommon event, with no simple method to detect rearrangements. However, insights into its molecular mechanisms can be gained with assay systems designed to measure HR events between defined extents of homologous DNA sequences.¹⁶ Briefly, the assay system currently used employs two mutated copies 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 (reviewed in ref. 17). 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. The spontaneous hyper-recombination phenotype of p53-deficient cells has also been reported in cells with mutations in ATM, *Ataxia telangiectasia mutated*,¹⁸ the protein kinase, which in response to DNA damage, such as DSBs, activates p53, which, in turn, transactivates downstream target genes to allow growth arrest at specific points in the cell cycle.¹⁹ 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.¹⁷ 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 DNA strand exchange activities *in vitro*.^{20,21,22} 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 HR rates, leading to oncogene activation or tumour-suppressor gene inactivation.

Consistent with its role in the maintenance of genome integrity is the ability of p53 to discriminate between ectopic HR and allelic HR or SCE. 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.²³ Similarly, genetic inactivation of p53 in human somatic cells did not lead to an increased rate of SCE.^{24,25} The protein p53 is regarded as the guardian of the genome on the basis of its capacity to induce cell cycle arrest in response to a number of cellular stresses, mainly DNA damage, presumably to allow time for accurate repair of DNA damage,¹⁹ and one major role of SCE that has emerged in recent years is to accurately repair DSBs and facilitate the progression of stalled replication forks.²⁶ The potential outcomes of inefficient DSB repair include genome instability, tumourigenesis, and cell death.^{2,27-29}

The exact mechanism by which p53 discriminates between ectopic HR and allelic HR or SCE is unclear. However, the lack of p53's effect on allelic HR or SCE together with the demonstration that neither RAD51-dependent nor RAD51-independent HR involving extra-chromosomal DNA was affected by the p53 status of the cell^{24,30-32} indicate that p53 does not block DNA strand exchange reactions in cells, and that regulation of ectopic HR by p53 may be restricted to the highly-ordered chromatin structure.³²

The ability of p53 to alter chromatin structure and repress transcription,³³ together with the well established link between transcription repression and decreased efficiency of intra-chromosomal HR (reviewed in ref. 7), prompted us to investigate whether p53 would

also inhibit HR in the absence of mechanisms that repress reporter genes. Studies with a variety of organisms show that two transcriptionally active genes linked in *cis* can repress one another by a phenomenon termed "transcriptional interference" or "promoter suppression" (reviewed in refs. 34 and 35). Interference/suppression occurs at the transcriptional level, is *cis*-acting, epigenetic, heritable, and can be associated with alteration of chromatin structure.^{34,35}

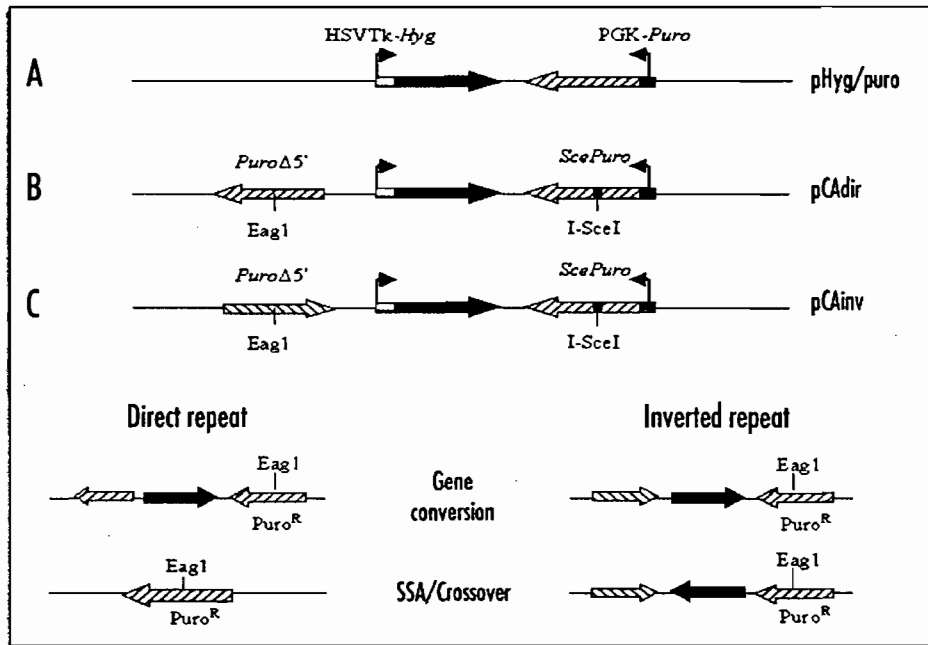
In the present study, we employed a chromosomal assay system in which a HR reporter gene can escape interference/suppression. Recently, we found that in this assay system, the breast cancer susceptibility BRCA2 protein, which interacts with p53 and RAD51,³⁶ suppresses spontaneous HR but promotes HR following chromosomal DSBs.³⁷ We report here that, in this assay system, disruption of p53 by the human papilloma virus oncoprotein HPV16-E6 in two distinct human cell lines containing either direct or inverted repeats did not result in increased rates of spontaneous HR.

MATERIALS AND METHODS

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 23 bp containing *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.

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 x 10⁶ cells were suspended in 0.4 cm electroporation cuvettes with 800 µl MEM or McCoy's medium containing 5 µg 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 µg/ml hygromycin (Hyg) for MCF-7 and 200 µg/ml for HCT-116. Hyg^R clones were picked, expanded, and analysed by Southern blotting.³⁵ For the expression of HPV16-E6 protein, Hyg^R cells seeded in plates of six wells were transfected at 25% confluency with linearized pCMV-E6 plasmid or pCMV-neomycin (Neo) (kindly provided by Dr. Simon N. Powell,³⁸ 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 µg/ml of G418. Neo^R clones were picked, expanded and subjected to Western blot analysis.

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 µg/ml leupeptin, 1 µg/ml pepstatin A, 1.5 µg/ml aprotinin and 1 mM phenylmethylsulphonyl fluoride. Western blotting was carried out under standard procedures with anti-p53



RESULTS

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 at least two transcriptionally active units: one mutated full-length copy of a HR reporter gene, and one dominant marker gene linked in cis. Maintaining cell clones under selection for expression of the marker gene eliminates cells that repress the marker and reporter genes. 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 (reviewed in refs. 34 and 35). 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 (reviewed in ref. 35). Inserting transcription terminators or chromatin boundaries between two adjacent units, or placing the units in divergent or convergent orientations can decrease interference/suppression.^{35,41} 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.³⁴

Placing transcription units under the control of distinct promoters can decrease suppression between convergent units (Villemure et al., unpublished results). We, therefore, placed the HR reporter puromycin acetyltransferase (*Puro*) gene, which when active encodes resistance to puromycin drug,

Figure 1. 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 two differentially mutated *Puro* genes arranged as direct repeats: *ScePuro*, which is a full length *Puro* gene with insertion of the I-SceI site in place of EagI/BssHII restriction sites, and *Puro*Δ5', a promoterless *Puro* gene. The promoterless *Puro* gene is deemed necessary to limit the number of actively transcribed units to two (see text). (C) pCAinv is identical to pCAdir except that the two 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-SceI site and gain of the EagI/BssHII sites, restoring resistance to *Puro*.

DO-1 and anti-p21 C-19 (Santa Cruz Biotechnologies, Santa Cruz, CA) and enhanced chemiluminescence (Amersham, Baie d'Urfé, Que).

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.³⁹ 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.

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.⁴⁰ The following primer pairs were employed in PCR (Fig. 3): *Hyg*4419 (5'-GCTGTGTAGAAGTACTCGCCG-3') and pUC469 (5'-TGACCATG-ATTACGCCAAGCT-3') amplify the 2,324 bp fragment with both direct and inverted repeats; whereas pUC315 (5'-AAAGGGGGATGTGCTG-CAAGGCGA-3') and pUC469 amplify the 1,836 bp fragment with direct repeats.

under control of the strong cellular housekeeping phosphoglycerate kinase (*PGK*) gene promoter in convergent orientation to the marker hygromycin-drug resistance (*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*, or its recombination reporter derivatives pCAdir or pCAinv, illustrated in Figure 1, is 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.³⁵ 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 either transcription units arranged in a head-to-tail tandem fashion or in a convergent orientation of the same viral promoter; 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.^{34,35}

Wt p53 does not suppress spontaneous chromosomal HR. To test whether p53 would impair HR with this combination of promoters, we compared HR rates between p53-positive pCAdir/pCAinv cell clones and p53-negative derivative cell clones. The recombination reporter pCAdir or pCAinv carries either direct or inverted repeats of two inactive *Puro* genes, separated by the *Hyg* gene (Fig. 1). Whereas the promoterless wild-type *Puro* gene contains a gene inactivating 5' deletion, deleting EagI and BssHII

restriction sites and inserting one I-SceI cleavage site have inactivated the full-length *Puro* gene. An HR event between the two *Puro* cassettes would reconstitute a functional *Puro* gene through loss of I-SceI and gain of wild-type *Eag*I/*Bss*HII sites, restoring resistance to the drug *Puro* in a colony assay.

The p53 protein was artificially disrupted in the recombination reporter MCF-7 or HCT-116 cell clones by expressing the viral oncoprotein HPV16-E6 (Fig. 2). The HPV16-E6 has been consistently used to disrupt p53 in many cell lines including MCF-7 and HCT-116 cells.^{38,42} Induction of DNA damage by a variety of agents is known to activate p53, which, in turn, acts as a transcriptional regulator of several target genes; the main one being the gene encoding the cyclin-dependent kinase inhibitor p21.¹⁹ Western blot analysis of protein extracts from actinomycin D treated cells revealed no induction of p53 or p21 expression in E6-expressing cell clones, compared to parental clones (Fig. 2).

HR rates in MCF-7 and HCT-116 cell clones were measured by fluctuation analysis.³⁹ 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).

Neither gene conversion nor deletion was affected by p53. HR between direct *Puro* repeats can result in two types of products: RAD51-dependent gene conversion, keeping intact the structure of the locus, or deletion, removing one *Puro* gene together with the intervening *Hyg* gene (Fig. 3). Deletion events can result from crossover, a RAD51-dependent HR event, or RAD51-independent sister chromatid replication slippage or SSA events.⁷ Gene conversion and deletion events can be distinguished by the polymerase chain reaction (PCR) with a distinct set of primer pairs (Fig. 3). PCR was performed on genomic DNA from individually expanded *Puro*^R cell clones, and amplification products were digested with I-SceI and *Eag*I to identify HR events (*Eag*I*/I-SceI) (Fig. 3). PCR analysis of 96 p53-positive MCF-7 *Puro*^R clones revealed 95% (91/96) gene conversion and 5% (5/96) deletion events. This proportion remained the same after p53 disruption, in that 78/80 p53-negative MCF-7 *Puro*^R colonies were gene conversion events. These results indicate that p53 affects neither pathway and support previous studies indicating that in mammalian mitotic cells, HR occurs almost exclusively by gene conversion.^{43,44}

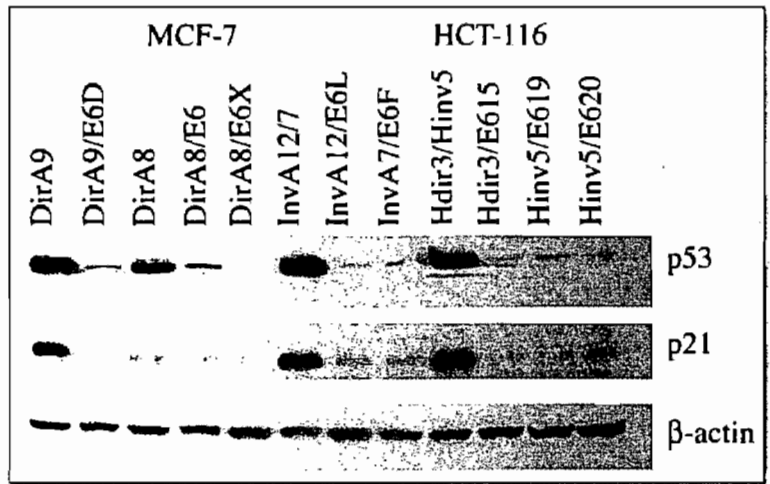


Figure 2. Induction of p53 and p21 response to DNA damage. Western blot analysis of protein extracts isolated from actinomycin D treated p53-positive MCF-7 and HCT-116 parental cell clones and E6-expressing derivative cell clones with antibodies to p53 and p21, respectively. To control equal loading, the Western blots were reprobed with β -actin antibody.

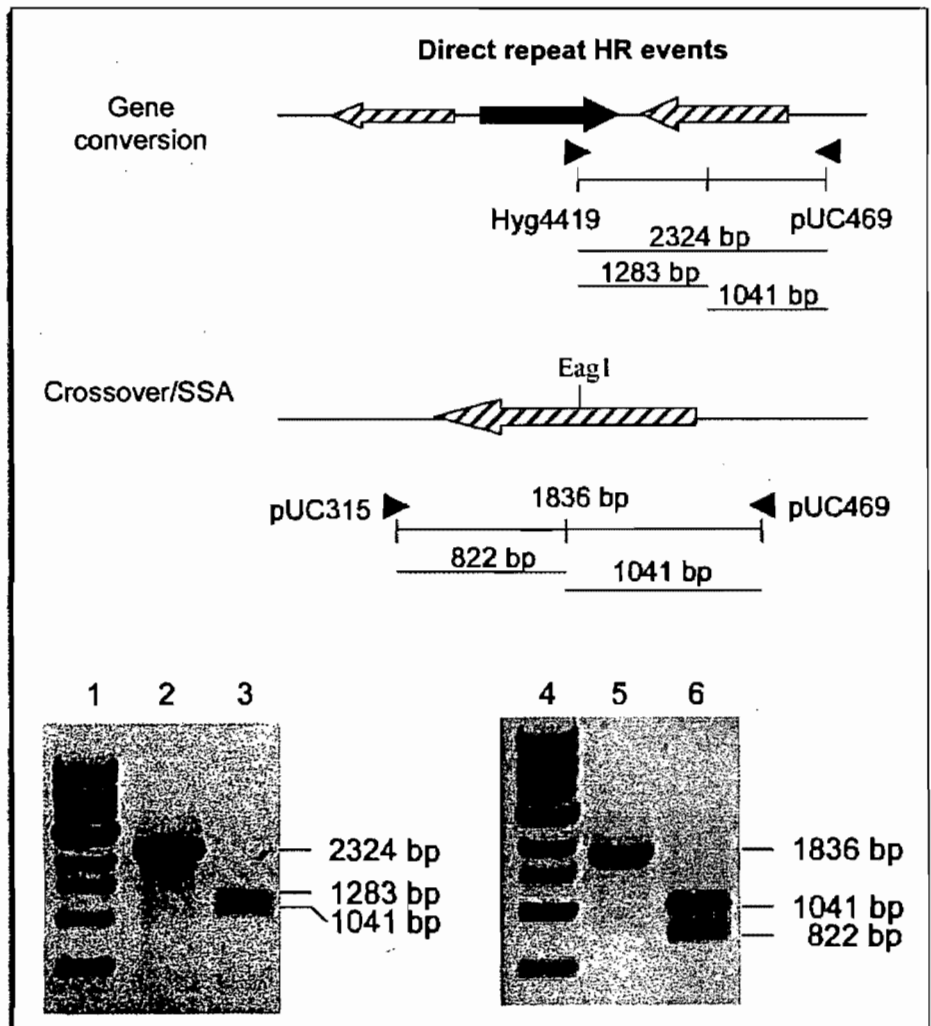


Figure 3. PCR analysis of *Puro*^R genomic DNA. The PCR primer pair Hyg4419/pUC469 amplifies a gene conversion product of 2,324 bp that is resistant to I-SceI digestion but can be cut with *Eag*I into 1,283 bp and 1,041 bp (lanes 2 and 3), whereas the PCR primer pair pUC315 and pUC469 amplifies a crossover/SSA product of 1,836 bp that is resistant to I-SceI but can be cut with *Eag*I into two fragments: 822 bp and 1,041 bp (lanes 5 and 6). 1 kbp DNA ladder (lanes 1 and 4).

Table 1 Effect of p53 on spontaneous intra-chromosomal HR

Cell lines	Response to DNA damage		HR rate (X10 ⁻⁶)
	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 measures HR events/cell/generation

DISCUSSION

The data reported here provide evidence that there are situations where disruption of p53 does not increase the rates of spontaneous chromosomal HR between adjacent DNA repeats. 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.³² Genetic disruption of p53 also did not lead to an increased rate of SCE in HCT-116 cells or in other human cell lines,^{24,25} nor did it affect the frequency of meiotic crossover events in mice.²³ Together, these findings indicate that p53 has no direct role in suppressing HR mechanisms.

The lack of p53's effect on HR in our assay system could not be cell line specific or due to the use of HPV16-E6, as disruption of p53 by HPV16-E6 in MCF-7 cells increased HR frequencies and rates by more than 100-fold.³⁸ The exact reason for this conflict remains to be clearly defined. 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 control of the strong cellular housekeeping *PGK* gene promoter. It has been shown that wt p53 represses a number of cellular and viral gene promoters.³³ Viral promoters include the HSV-*tk* gene promoter, the Simian virus 40 promoter, the polyoma virus promoter, the cytomegalovirus promoter, the Rous sarcoma virus promoter, the hepatitis B virus core promoter, and various retroviruses LTR promoters.⁴⁵⁻⁵³ 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.³³

An indication that p53 may repress promoters through chromatin structure alteration was obtained from studies using trichostatin A (TSA), an HDAC inhibitor. TSA was shown to abolish p53-mediated repression at various promoters.³³ 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.⁵⁴ In addition to histone deacetylation, cellular and viral promoter repression has also been associated with DNA methylation, and DNA methyltransferases appear to interact with HDACs in mammals.^{55,56} There is also a link between p53 inactivation, demethylation, and promoter reactivation.^{33,57,58} Chromatin aspects like methylation and acetylation/deacetylation also affect the efficiency of HR and DSB repair.^{7,59,60} It appeared that the N-terminus, the proline-rich domain, and the C-terminal region of p53 each contribute to p53-mediated promoter repression.³³ Interestingly, mutant forms of p53 that abrogated transcription repression and chromatin remodelling^{33,61} also increased the efficiency of intra-chromosomal HR and DSB repair.^{38,62-64}

Another aspect that may influence the outcome is transcriptional interference or promoter suppression.^{34,35} 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.^{35,65} The protein p53 might be involved in interference/suppression through its ability to both recruit HDAC at promoters and alter chromatin structure. 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.⁶¹ 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.⁶¹ The ability of p53 to bind both the nuclear matrix⁶⁶ and certain types of DNA structures⁶⁷ may also alter chromatin structure. Chromatin structure alteration may, in turn, affect the function of p53 as a transcription regulator or chromatin modifier.^{33,67} 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.⁶⁸

Previous studies demonstrated that p53 deficiency alone not only does not increase HR rates, but also does not lead to gross chromosomal rearrangements.²⁴ Our data indicate that disruption of p53 by HPV16-E6 also does not result in increased rates of ectopic HR. 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 transcription units at chromosomal sites where p53 may act directly or indirectly to remodel chromatin structure.^{61,69} Relaxation of chromatin at such sites following p53 inactivation may provide a more vulnerable target for DNA damage that would induce recombination and genome rearrangements.⁶¹ As a chromatin remodelling-factor, p53 may, therefore, protect against DNA damage.⁶¹ In line with this idea is the observation that in p53-deficient cells, stalled replication forks can be inappropriately processed to DSBs,⁷⁰ as in cells with defects in chromatin assembly factors,⁷¹ or cofactors involved in DNA repair.⁷² Relaxation of chromatin in p53-deficient cells may also evoke reactivation of dormant endogenous retroviruses or retrotransposons, such as LINEs or SINEs, culminating in insertion mutagenesis or silencing of nearby tumour suppressor genes by transcriptional interference or promoter suppression.^{35,73}

In conclusion, the results indicate that disruption of p53 by HPV16-E6 has no effect on chromosomal HR mechanisms. The concept that p53 may regulate ectopic HR through transcription repression and/or chromatin remodelling merits further studies as it is likely to be important in the maintenance of genome integrity and carcinogenesis. Our data also suggest caution when designing recombination assays, since many proteins involved in HR and DNA repair are also involved in transcription and/or chromatin dynamics.

References

- Carrington M, Cullen M. Justified chauvinism: Advances in defining meiotic recombination through sperm typing. *Trends Genet* 2004; 20:196-205.
- Thompson LH, Schild D. Recombinational DNA repair and human disease. *Mutat Res* 2002; 509:49-78.
- Kolomietz E, Meyn MS, Pandita A, Squire JA. The role of Alu repeat clusters as mediators of recurrent chromosomal aberrations in tumors. *Genes Chromosomes Cancer* 2002; 35:97-112.
- West SC. Molecular views of recombination proteins and their control. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003; 4:435-45.
- Bi W, Park SS, Shaw CJ, Withers MA, Patel PI, Lupski JR. 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* 2003; 73:1302-15.
- Tayebi N, Stubblefield BK, Park JK, Orvisky E, Walker JM, LaMarca ME, Sidransky E. Reciprocal and nonreciprocal recombination at the *glucocerebrosidase* gene region: Implications for complexity in Gaucher disease. *Am J Hum Genet* 2003; 72:519-34.
- Prado F, Cortes-Ledesma F, Huertas P, Aguilera A. Mitotic recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet* 2003; 42:185-98.
- Gross M, Hanenberg H, Lobitz S, Friedl R, Herterich S, Dietrich R, Gruhn B, Schindler D, Hoehn H. Reverse mosaicism in *Fanconi anemia*: Natural gene therapy via molecular self-correction. *Cytogenet Genome Res* 2002; 98:126-35.
- Jonkman MF, Scheffer H, Strulp R, Pas HH, Nijenhuis M, Heeres K, Owaribe K, Pulkkinen L, Uitto J. Revertant mosaicism in epidermolysis bullosa caused by mitotic gene conversion. *Cell* 1997; 88:543-51.
- Amor M, Parker KL, Gliberman H, New MI, White PC. Mutation in the *CYP21B* gene (Ile-172—Asn) causes steroid 21-hydroxylase deficiency. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85:16004.
- Boocock GR, Morrison JA, Popovic M, Richards N, Ellis L, Durie PR, Rommens JM. Mutations in SBDS are associated with Shwachman-Diamond syndrome. *Nat Genet* 2003; 33:97-101.
- Cavenee WK, Dryja TP, Phillips RA, Benedict WF, Godbout R, Gallie BL, Murphree AL, Strong LC, White RL. Expression of recessive alleles by chromosomal mechanisms in retinoblastoma. *Nature* 1983; 305:779-84.
- Ezquieta B, Cueva E, Oyarzabal M, Oliver A, Varela JM, 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* 2002; 62:181-8.
- Hauptschein RS, Gaidano G, Rao PH, Scotto L, Edwards YH, Chaganti RS, 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* 2000; 7:261-72.
- Mazzei R, Gambardella A, Conforti FL, Magariello A, Patitucci A, Gabriele AL, Sprovieri T, Labate A, Valentino P, Bono F, et al. Gene conversion events in adult-onset spinal muscular atrophy. *Acta Neurol Scand* 2004; 109:151-4.
- Bollag RJ, Waldman AS, Liskay RM. Homologous recombination in mammalian cells. *Annu Rev Genet* 1989; 23:199-225.
- Bertrand P, Saintigny Y, Lopez BS. p53's double life: Transactivation-independent repression of homologous recombination. *Trends Genet* 2004; 20:235-43.
- Meyn MS. High spontaneous intrachromosomal recombination rates in ataxia-telangiectasia. *Science* 1993; 260:1327-30.
- Levine AJ. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 1997; 88:323-31.
- Janz C, Susse S, Wiesmuller L. p53 and recombination intermediates: Role of tetramerization at DNA junctions in complex formation and exonucleolytic degradation. *Oncogene* 2002; 21:2130-40.
- Sturzbecher HW, Donzelmann B, Henning W, Knippschild U, Buchhop S. p53 is linked directly to homologous recombination processes via RAD51/RecA protein interaction. *EMBO J* 1996; 15:1992-2002.
- Susse S, Janz C, Janus F, Deppert W, Wiesmuller L. Role of heteroduplex joints in the functional interactions between human Rad51 and wild-type p53. *Oncogene* 2000; 19:4500-12.
- Gersten KM, Kemp CJ. Normal meiotic recombination in p53-deficient mice. *Nat Genet* 1997; 17:378-9.
- Bunz F, Fauth C, Speicher MR, Dutriaux A, Sedivy JM, Kinzler KW, Vogelstein B, Lengauer C. Targeted inactivation of p53 in human cells does not result in aneuploidy. *Cancer Res* 2002; 62:1129-33.
- Sengupta S, Linke SP, Pedoux R, Yang Q, Farnsworth J, Garfield SH, Valerie K, Shay JW, Ellis NA, Waslylyk B, Harris CC. BLM helicase-dependent transport of p53 to sites of stalled DNA replication forks modulates homologous recombination. *EMBO J* 2003; 22:1210-22.
- Hirano T. Cell biology: Holding sisters for repair. *Nature* 2005; 433:467-8.
- Khanna KK, Jackson SP. DNA double-strand breaks: Signaling, repair and the cancer connection. *Nat Genet* 2001; 27:247-54.
- van Gent DC, Hoesjmakers JH, Kanaar R. Chromosomal stability and the DNA double-stranded break connection. *Nat Rev Genet* 2001; 2:196-206.
- Venkitaraman AR. Cancer susceptibility and the functions of BRCA1 and BRCA2. *Cell* 2002; 108:171-82.
- Dominguez-Bendala J, Priddle H, Clarke A, 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* 2003; 286:298-307.
- Villemure JF, Belmaaza A. Effects of sequence divergence on the efficiency of extrachromosomal recombination in mismatch repair proficient and deficient mammalian cell lines. *Som Cell Mol Genet* 1999; 25:79-90.
- Willers H, McCarthy EE, Hubbe P, Dahm-Daphi J, Powell SN. Homologous recombination in extrachromosomal plasmid substrates is not suppressed by p53. *Carcinogenesis* 2001; 22:1757-63.
- Ho J, Benchimol S. Transcriptional repression mediated by the p53 tumour suppressor. *Cell Death Differ* 2003; 10:404-8.
- Eszterhas SK, Bouhassira EE, Martin DI, Fiering 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* 2002; 22:469-79.
- Villemure JF, Savard N, 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* 2001; 312:963-74.
- Marmorstein LY, Ouchi T, Aaronson SA. The BRCA2 gene product functionally interacts with p53 and RAD51. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95:13869-74.
- Abaji C, Cousineau I, Belmaaza A. BRCA2 regulates homologous recombination in response to DNA damage: Implications for genome stability and carcinogenesis. *Cancer Res* 2005; In press.
- Mekeel KL, Tang W, Kachnic LA, Luo CM, DeFrank JS, Powell SN. Inactivation of p53 results in high rates of homologous recombination. *Oncogene* 1997; 14:1847-57.
- Capizzi RL, Jameson JW. A table for the estimation of the spontaneous mutation rate of cells in culture. *Mutat Res* 1973; 17:147-8.
- Villemure JF, Abaji C, Cousineau I, Belmaaza A. MSH2-deficient human cells exhibit a defect in the accurate termination of homology-directed repair of DNA double-strand breaks. *Cancer Res* 2003; 63:3334-9.
- Hasegawa K, Nakatsuji N. Insulators prevent transcriptional interference between two promoters in a double gene construct for transgenesis. *FEBS Lett* 2002; 520:47-52.
- Gupta M, Fan S, Zhan Q, Kohn KW, O'Connor PM, Pommier Y. Inactivation of p53 increases the cytotoxicity of camptothecin in human colon HCT116 and breast MCF-7 cancer cells. *Clin Cancer Res* 1997; 3:1653-60.
- Johnson RD, Jasin M. Sister chromatid gene conversion is a prominent double-strand break repair pathway in mammalian cells. *EMBO J* 2000; 19:3398-407.
- Taghian DG, Nickoloff JA. Chromosomal double-strand breaks induce gene conversion at high frequency in mammalian cells. *Mol Cell Biol* 1997; 17:6386-93.
- Das GC, Shivakumar CV, Todd SD. Cell-specific modulation of the papovavirus promoters by tumor-suppressor protein p53 in the absence of large T-antigen. *Oncogene* 1995; 10:449-55.
- Deb D, Lanyi A, Scian M, Keiger J, Brown DR, Le Roith D, Deb SP, Deb S. Differential modulation of cellular and viral promoters by p73 and p53. *Int J Oncol* 2001; 18:401-9.
- Duan L, Ozaki I, Oakes JW, Taylor JP, Khalili K, Pomerantz RJ. The tumor suppressor protein p53 strongly alters human immunodeficiency virus type 1 replication. *J Virol* 1994; 68:4302-13.
- Kang YH, Kang MJ, Paik SG, Park SN, Yoon DY. Repression of HPV E6-activated RSV promoter activity by anti-cancer agents. *Antiviral Res* 2003; 58:65-71.
- Mori N, Kashanchi F, Prager D. Repression of transcription from the human T-cell leukemia virus type I long terminal repeat and cellular gene promoters by wild-type p53. *Blood* 1997; 90:4924-32.
- Subler MA, Martin DW, Deb S. Inhibition of viral and cellular promoters by human wild-type p53. *J Virol* 1992; 66:4757-62.
- Subler MA, Martin DW, Deb S. Activation of the human immunodeficiency virus type 1 long terminal repeat by transforming mutants of human p53. *J Virol* 1994; 68:103-10.
- Subler MA, Martin DW, Deb S. Overlapping domains on the p53 protein regulate its transcriptional activation and repression functions. *Oncogene* 1994b; 9:1351-9.
- Takada S, Kaneniwa N, Tsuchida N, Koike K. Hepatitis B virus X gene expression is activated by X protein but repressed by p53 tumor suppressor gene product in the transient expression system. *Virology* 1996; 216:80-9.
- Murphy M, Ahn J, Walker KK, Hoffman WH, Evans RM, Levine AJ, George DL. Transcriptional repression by wild-type p53 utilizes histone deacetylases, mediated by interaction with mSin3a. *Genes Dev* 1999; 13:2490-501.
- Dobosy JR, Selker EU. Emerging connections between DNA methylation and histone acetylation. *Cell Mol Life Sci* 2001; 58:721-7.

56. Ng HH, Bird A. DNA methylation and chromatin modification. *Curr Opin Genet Dev* 1999; 9:158-63.
57. Jackson-Grusby L, Beard C, Possemato R, Tudor M, Fambrough D, Csankovszki G, Dausman J, Lee P, Wilson C, Lander E, Jaenisch R. Loss of genomic methylation causes p53-dependent apoptosis and epigenetic deregulation. *Nat Genet* 2001; 27:31-39.
58. Nasr AF, Nutini M, Palombo B, Guerra E, Alberti S. Mutations of TP53 induce loss of DNA methylation and amplification of the *TROP1* gene. *Oncogene* 2003; 22:1668-77.
59. Bird AW, Yu DY, Pray-Grant MG, Qiu Q, Harmon KE, Megee PC, Grant PA, Smith MM, Christman MF. Acetylation of histone H4 by Esa1 is required for DNA double-strand break repair. *Nature* 2002; 419:411-5.
60. Maloisel L, Rossignol JL. Suppression of crossing-over by DNA methylation in *Ascombolus*. *Genes Dev* 1998; 12:1381-9.
61. Smith ML, Bortnick RA, Sheikh MS, Fornace Jr AJ. Chromatin relaxation by overexpression of mutant p53, HPV16-E6, or cyclin G transgenes. *Exp Cell Res* 1998; 242:235-243.
62. Akyuz N, Boehden GS, Susse S, Rimek A, Preuss U, Scheidtmann KH, Wiesmuller L. DNA substrate dependence of p53-mediated regulation of double-strand break repair. *Mol Cell Biol* 2002; 22:6306-17.
63. Saintigny Y, Rouillard D, Chaput B, Soussi T, Lopez BS. 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* 1999; 18:3553-63.
64. Willers H, McCarthy EE, Wu B, Wunsch H, Tang W, Taghian DG, Xia F, Powell SN. Dissociation of p53-mediated suppression of homologous recombination from G₁/S cell cycle checkpoint control. *Oncogene* 2000; 19:632-9.
65. Emerman M, Temin HM. Comparison of promoter suppression in avian and murine retrovirus vectors. *Nucleic Acids Res* 1986; 14:9381-96.
66. Okorokov AL, Rubbi CP, Metcalfe S, Milner J. The interaction of p53 with the nuclear matrix is mediated by F-actin and modulated by DNA damage. *Oncogene* 2002; 21:356-67.
67. Kim E, Deppetr W. The complex interactions of p53 with target DNA: We learn as we go. *Biochem Cell Biol* 2003; 81:141-50.
68. Cook JL, Zhang Z, Alam J, Re RN. Effects of chromosomal integration site upon p53 interactions with DNA consensus sequence homologies. *Oncogene* 1999; 18:2373-9.
69. Rubbi CP, Milner J. p53 is a chromatin accessibility factor for nucleotide excision repair of DNA damage. *EMBO J* 2003; 22:975-86.
70. Kumari A, Schultz N, Helleday T. p53 protects from replication-associated DNA double-strand breaks in mammalian cells. *Oncogene* 2004; 23:2324-9.
71. Ye X, Franco AA, Santos H, Nelson DM, Kaufman PD, Adams PD. Defective S phase chromatin assembly causes DNA damage, activation of the S phase checkpoint, and S phase arrest. *Mol Cell* 2003; 11:341-51.
72. Lomonosov M, Anand S, Sangrithi M, Davies R, Venkiramaram AR. Stabilization of stalled DNA replication forks by the BRCA2 breast cancer susceptibility protein. *Genes Dev* 2003; 17:3017-22.
73. Whitelaw E, Marrin DJ. Retrotransposons as epigenetic mediators of phenotypic variation in mammals. *Nat Genet* 2001; 27:361-5.

Chapitre 9. Annexe III

**BRCA2 regulates homologous recombination in response to DNA Damage:
implications for genome stability and carcinogenesis**

Christine Abaji, Isabelle Cousineau, and Abdellah Belmaaza

Centre de recherche, Centre hospitalier de l'Université de Montréal, Hôpital Notre-Dame et Institut du cancer de Montréal, Montréal, Québec, Canada

Running title: BRCA1 regulates homologous recombination

Key words. BRCA1 / BRCA2 / RAD51 / Sister chromatid cohesion / DNA
damage
response / DNA repair

Article publié dans:

Cancer Research, vol. 65(10) : 4117-4125, 2005

BRCA2 Regulates Homologous Recombination in Response to DNA Damage: Implications for Genome Stability and Carcinogenesis

Christine Abaji,¹ Isabelle Cousineau,² and Abdellah Belmaaza³

Departments of ¹Biochemistry, ²Molecular Biology Program, and ³Medicine and Microbiology, Centre de recherche, Centre hospitalier de l'université de Montréal-Hôpital Notre-Dame, Institut du Cancer de Montréal, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada

Abstract

BRCA2 has been implicated in the maintenance of genome stability and RAD51-mediated homologous recombination repair of chromosomal double-strand breaks (DSBs), but its role in these processes is unclear. To gain more insight into its role in homologous recombination, we expressed wild-type BRCA2 in the well-characterized BRCA2-deficient human cell line CAPAN-1 containing, as homologous recombination substrates, either direct or inverted repeats of two inactive marker genes. Whereas direct repeats monitor a mixture of RAD51-dependent and RAD51-independent homologous recombination events, inverted repeats distinguish between these events by reporting RAD51-dependent homologous recombination, gene conversion, and crossover events only. At either repeats, BRCA2 decreases the rate and frequency of spontaneous homologous recombination, but following chromosomal DSBs, BRCA2 increases the frequency of homologous recombination. At direct repeats, BRCA2 suppresses both spontaneous gene conversion and deletions, which can arise either from crossover or RAD51-independent sister chromatid replication slippage (SCRS), but following chromosomal DSBs, BRCA2 highly promotes gene conversion with little effect on deletions. At inverted repeats, spontaneous or DSB-induced crossover events were scarce and BRCA2 does not suppress their formation. From these results, we conclude that (i) BRCA2 regulates RAD51 recombination in response to the type of DNA damage and (ii) BRCA2 suppresses SCRS, suggesting a role for BRCA2 in sister chromatids cohesion and/or alignment. Loss of such control in response to estrogen-induced DNA damage after BRCA2 inactivation may be a key initial event triggering genome instability and carcinogenesis. (Cancer Res 2005; 65(10): 4117-25)

Introduction

Germ line mutations in *BRCA2* predispose humans to breast, ovarian, and other cancers (1). In addition, hypomorphic mutations in *BRCA2* have been found in cells from patients in the FANC-B and FANC-D1 subgroups of Fanconi's anemia, an autosomal-recessive cancer susceptibility syndrome (2). Tumor cells derived from predisposed individuals show loss of heterozygosity (LOH) for the wild-type allele with retention of the mutated inherited allele, indicating that *BRCA2* acts as a tumor suppressor gene. *BRCA2* is ubiquitously expressed and encodes a large nuclear protein

localized to the nucleus of S-phase cells. *BRCA2* has been implicated in processes fundamental to all cells, including chromatin remodelling, regulation of transcription, and RAD51-mediated recombination repair, although its role in these processes remains unclear and the mechanisms underlying tissue specificity of its tumor suppressive property are unknown (3–5).

Mouse and human *BRCA2*-deficient cells accumulate spontaneous chromosome aberrations during cell division in culture, implicating *BRCA2* in the maintenance of genome stability (4). The abnormalities include gross chromosomal rearrangements, chromosome and chromatid breaks as well as triradial and quadriradial chromosomes, markers of defective mitotic recombination that are typical of the human diseases Bloom's syndrome, ataxia telangiectasia, and Fanconi's anemia, mutated in *BLM*, *ATM*, and *FANC* genes, respectively (6). *BRCA2*-deficient cells are hypersensitive to genotoxic agents that have the potential to cause DNA double-strand breaks (DSBs), implicating *BRCA2* in cell cycle signaling and/or DSB repair. However, because cell cycle checkpoints are largely preserved in *BRCA2*-deficient cells in the presence of DNA damage, a role for *BRCA2* in DSB repair was acknowledged (3, 4).

Mammalian mitotic cells can repair DNA DSBs by two major recombination mechanisms, nonhomologous end joining (NHEJ) and homologous recombination (7). In NHEJ, DNA ends are joined with little or no base pairing at the joining site and the end-joining product can suffer insertion or deletion mutations (8). In contrast, DSB repair by homologous recombination requires the presence of an intact DNA duplex with extensive homology to the region flanking the break to serve as a repair template. The preferred template for homologous recombination repair is the sister chromatid (9). A key step in DSB repair by homologous recombination is the invasion of a 3' single-strand DNA (ssDNA) end into the intact template. RAD51 protein carries out this reaction. RAD51 is functional as a polymer, made up of hundreds of monomers that coat ssDNA and form a nucleoprotein filament that catalyzes the strand invasion reaction, which is followed by new DNA synthesis (10). The resulting intermediate can either disassemble (i.e., the newly synthesized strand can be displaced and anneal with the noninvading 3' ssDNA end to elicit noncrossover gene conversion only) or be processed to a Holliday junction intermediate to yield gene conversion with or without crossover (11, 12). Homologous recombination is considered to be error free when it involves sister chromatids (9), but it can also be deleterious when it takes place between repetitive sequences, and in excess, it can promote genome instability and cause diseases (6, 13, 14).

The first evidence linking *BRCA2* to homologous recombination was its direct interaction with RAD51. The interaction is mediated by six of eight internal BRC repeats (BRC1-BRC4, BRC7, and BRC8) that are encoded by *BRCA2* exon 11 and highly conserved between mammals (10). *BRCA2* and RAD51 colocalize to subnuclear foci following DNA damage and during the S and G₂ phases of the

Requests for reprints: Abdellah Belmaaza, Centre de Recherche du Centre hospitalier de l'université de Montréal-Hôpital Notre-Dame, Institut du cancer de Montréal, 1560, rue Sherbrooke est, Pavillon J.A. de Séve, Y-5634, Montréal, Québec, Canada H2L 4M1. Phone: 514-890-8000, ext. 28946; Fax: 514-412-7591; E-mail: [REDACTED]

©2005 American Association for Cancer Research.

cell cycle (3). Structural, cell biological, and biochemical evidence indicates that BRCA2 peptides can inhibit and promote RAD51 function, suggesting that full-length BRCA2 might prevent or assist RAD51 assembly at sites of DNA damage (15).

Direct evidence of a role for BRCA2 in assisting RAD51-mediated chromosomal repair was provided by the demonstration that with a chromosomal DSB in direct repeats, gene conversion was decreased by >100-fold in the BRCA2-deficient human cancer cell line CAPAN-1 and 4- to 6-fold in Brca2-deficient mouse cells compared with wild-type cells (16, 17). The 4-fold decrease in gene conversion was accompanied by a 2- to 3-fold increase in deletion events, suggesting that DSB repair by error-prone mechanisms predominates in BRCA2-deficient cells (17), raising a scenario wherein chromosomal instability provoked by BRCA2 deficiency is the result of incorrect routing of DSB processing down error-prone pathways because error-free processing by homologous recombination is unavailable (4, 17).

However, it remains uncertain whether the shift from gene conversion to deletion at direct repeats is due to error-free or error-prone homologous recombination pathways (17). DSB-induced deletion between direct repeats can result either from RAD51-dependent crossover or RAD51-independent, single-strand annealing (SSA), an error-prone homologous recombination pathway that anneals complementary 3' ssDNA ends, culminating in deletion of one repeat and the intervening sequences (11). The distinction between SSA and crossover becomes important for models of BRCA2 function in homologous recombination and the maintenance of genome stability. Mechanistically, a shift from gene conversion to deletion by SSA would indicate a defect in initiation of RAD51-mediated homologous recombination (18) and thus a role for BRCA2 at this step, whereas a shift from gene conversion to deletion by crossover would indicate a defect in crossover suppression (19) and thus a role for BRCA2 in the processing of Holliday junction intermediates. A parallel can be drawn with RAD51C and XRCC3, 2 RAD51 paralogues, which also interact with RAD51, and are thought to be essential for RAD51-dependent strand invasion but shown implicated instead in the resolution of Holliday junctions and accurate termination of homologous recombination (20, 21). In addition, BRCA2 interacts with BRAF-35, a protein that recognizes Holliday junctions (22), and RAD51 that associates with the DNA helicase BLM, which acts on Holliday junctions to suppress crossover and promote gene conversion (19). Moreover, the chromosomal instability provoked by BLM deficiency resembles that associated with BRCA1/2 deficiency, raising the possibility that a defect in crossover regulation may be the underlying mechanism (19, 23).

Here, we show that DSB repair by the error-prone SSA pathway predominates in BRCA2-deficient human cells and BRCA2 promotes error-free repair of chromosomal DSBs by gene conversion. In addition, we show that BRCA2 also suppresses spontaneous hyper-recombination, including gene conversion, crossover, and deletion events. Together, the data indicate that BRCA2 regulates homologous recombination in response to the type of DNA damage presumably to suppress single-strand break (SSB)-induced spontaneous homologous recombination and promote error-free repair of chromosomal DSBs. We discuss these results in the context of a new model for BRCA2 function in homologous recombination and the maintenance of genome stability.

Materials and Methods

DNA manipulations. The recombination reporter plasmids pCAinv and pCAAdr were constructed by modifying the pUC19 vector. To construct

the vector pUCHyg, the hygromycin (*Hyg*) gene was excised from pCEP-4 vector with *Sall* and *Nru1* enzymes and inserted into the *Xba1* site of pUC19. To generate pUCHygPuro Δ 5' inv and pUCHygPuro Δ 5' dr, the Puro Δ 5' gene was excised from pGK Δ Puro with *BstE1* and *HincII* enzymes and inserted into the Acc65I site of pUCHyg in both orientations. The full-length Puro gene was excised from pGK Δ Puro with *Sall* and inserted into the *Sall* site of pUC19, yielding pUC Δ Puro. The I-SceI 18-bp recognition site was inserted into *Bss*HII-*Eag*I sites of pUC Δ Puro, generating pUC Δ PuroSceI. Finally, the PuroSceI gene was excised from pUC Δ PuroSceI with *Sall* and inserted into the *Sall* site of pUCHygPuro Δ 5' inv and pUCHygPuro Δ 5' dr to yield pCAinv and pCAAdr, respectively. When necessary, the ends were filled in by Klenow polymerase.

Cell lines, culture, and transfections. The cell lines CAPAN-1 and MCF-7 used in these experiments originated from the American Type Culture Collection (Manassas, VA).

To generate the parental CAPAN-1 cell lines I-10, D2, and D26, cells were electroporated at 350 V/960 μ F with 1 to 20 μ g of pCAinv (inverted repeat) or pCAAdr (direct repeat) constructs linearized with *AhdI* restriction enzyme. The electroporated cells were subjected to Hyg selection (85 μ g/mL) 48 hours later, and several Hyg-resistant (Hyg^R) cell clones were picked and amplified individually for PCR and Southern blot analyses to identify intact, single-copy integration events.

The recombination reporter cell lines were transfected with pcDNA3 Δ Neo-based expression vector containing HA-tagged BRCA2 (pcDNA3 β HA/BRCA2; ref. 24) or an empty control vector (pcDNA3 Δ Neo) linearized with *PvuI*, using the Effectene Transfection Reagent kit (Qiagen, Valencia, CA). Forty-eight hours later, the transfected cells were cultured in medium containing G418 (225 μ g/mL). G418^R cell clones were picked and amplified individually for BRCA2 expression analysis by reverse transcription-PCR (RT-PCR) and Western blotting.

Reverse transcription-PCR. mRNA from individual cell clones was extracted with Trizol reagent and transcribed to cDNA using reverse transcriptase and primers (hexamers) of the SuperScript First-Strand Synthesis System RT-PCR kit (Invitrogen, Carlsbad, CA). The primer pairs employed for PCR, brca2Fwt (5'-gggatttttagcacagcaagtg-3') and brca2R6983 (5'-gaatgtgtggcatgactggg-3'), amplify an 829-bp fragment of BRCA2 cDNA only, whereas 18sF (5'-tgaggccatgattaagagg-3') and 18sR (5'-cgctgagccagtcagtgtag-3') amplify a 642-bp fragment of 18s cDNA of rRNA. PCR amplifications were carried out with the Expand High Fidelity PCR System kit (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN) for 30 cycles (25).

Protein manipulations. Protein extracts were prepared by sonicating cell pellets from individual cell clones with lysis buffer [62.5 mmol/L Tris-HCl (pH 6.8), 6 mol/L urea, 10% glycerol, and 2% SDS] containing protease inhibitors (1 mmol/L phenylmethylsulfonyl fluoride, 1.5 μ g/mL aprotinin, 1 μ g/mL leupeptin, and 1 μ g/mL pepstatin). The Bicinchoninic Acid Protein Assay kit (Pierce, Rockford, IL) served to measure protein content; 50 μ g of protein extract were separated on 5% SDS-PAGE, transferred to a nitrocellulose membrane (Amersham, Piscataway, NJ), and probed with anti-BRCA2 antibody (Ab2; Oncogene, Boston, MA), which recognizes a COOH-terminal epitope of wild-type BRCA2, or a monoclonal anti-HA antibody for HA-tagged BRCA2.

Homologous recombination frequency and rate. For spontaneous homologous recombination, 1 to 5 \times 10⁶ cells were subjected to Puro (0.5 μ g/mL) selection 48 hours after plating. The frequency of homologous recombination was assessed by dividing the number of Puro^R colonies by the number of cells plated for selection. Because homologous recombination at direct repeats can delete the *Hyg* gene, cells were maintained for 2 weeks without Hyg before Puro selection. The homologous recombination rate was quantified from 15 sublines (1-100 cells each) of each cell line. When the sublines reached confluence in 100-mm Petri dishes, the cells were trypsinized, counted, and a portion was taken for plating efficiency estimation. The remaining cells were plated under Puro selection, and the resulting Puro^R colonies were used to calculate the frequency of recombination. The recombination rate was calculated from these frequencies by a fluctuation test (26).

For I-SceI experiments, the pBactineSceI and pFRED25 vectors that express the meganuclease I-SceI (7) and green fluorescent protein (GFP),

respectively, were cotransfected into 1 to 4×10^5 cells with the Fugene 6 reagent kit (Boehringer Mannheim). In parallel experiments, the same number of cells were transfected with pFRED25 and pMC1neo, the latter to correct for DNA content, as a control for I-SceI efficiency (spontaneous homologous recombination). Puro selection was done 10 days after transfection. The frequency of I-SceI-induced homologous recombination was assessed by dividing the number of I-SceI Puro^R colonies by the number of GFP-expressing cells.

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 (25). The following primer pairs were employed in PCR, Hyg4419 (5'-gctgtgtagaagtactcgcg-3'), Hyg2829 (5'-aacttctcgacagacgtcggtg-3'), pUC469 (5'-tgaccatgattacgccaact-3'), and pUC315 (5'-aaaggggatgtgctg-caaggcga-3').

Results

Stable expression of wild-type BRCA2 in CAPAN-1 recombination reporter cell lines. The pancreatic adenocarcinoma cell line CAPAN-1 is the only well-characterized human cell line known to be defective in BRCA2 (see references in ref. 5). CAPAN-1 has lost a wild-type BRCA2 allele and carries a 6174delT mutation on the remaining allele. This frame-shift mutation, which is frequent in families with hereditary breast and ovarian cancer (1), leads to a truncation after amino acid 1981 within BRC7. Because the truncation removes the nuclear localization signal, the truncated BRCA2 protein localizes to the cytoplasm but still retains the RAD51 binding motifs and interacts with RAD51. CAPAN-1 has been reported to be defective in chromosomal DSB repair by homologous recombination compared with other human cell lines (16). Complementation of CAPAN-1 cells with wild-type BRCA2 increases homology-directed chromosomal integration of plasmid DNA and enhances radiation resistance (27).

To determine the effect of BRCA2 on chromosomal homologous recombination, we expressed wild-type BRCA2 in CAPAN-1 recombination reporter cell lines. These were transfected with the pcDNA-Neo based expression vector containing HA-tagged wild-type human BRCA2 (pcDNA3βHA/BRCA2; ref. 24) or the empty vector. G418-resistant derivative cell clones were amplified and analyzed for BRCA2 expression at the mRNA and protein levels (Fig. 1A and B). The different BRCA2-expressing derivative lines, listed in Fig. 1 and Table 1, show the highest expression level but lower than in MCF-7 cells that contain two wild-type BRCA2 alleles. However, they show no apparent changes in growth rate or plating efficiency compared with their parents (data not presented; ref. 27).

BRCA2 suppresses spontaneous homologous recombination in CAPAN-1 cells. The recombination reporter CAPAN-1 cell lines carry in their genome either direct or inverted repeats of two inactive Puro resistance genes, separated by the Hyg resistance gene (Fig. 2A). Whereas the promoterless wild-type Puro gene contains a gene inactivating 5' deletion, deleting *EagI* and *BssHIII* restriction sites and inserting one I-SceI cleavage site have inactivated the full-length Puro gene. An homologous recombination event between the two Puro cassettes would reconstitute a functional Puro gene through loss of I-SceI and gain of wild-type *EagI*/*BssHIII* sites, restoring resistance to the drug Puro in a colony assay.

We determined whether spontaneous homologous recombination (i.e., without treatment of CAPAN-1 cells with exogenous DNA damaging agents) is affected by BRCA2. The direct repeat D2 and

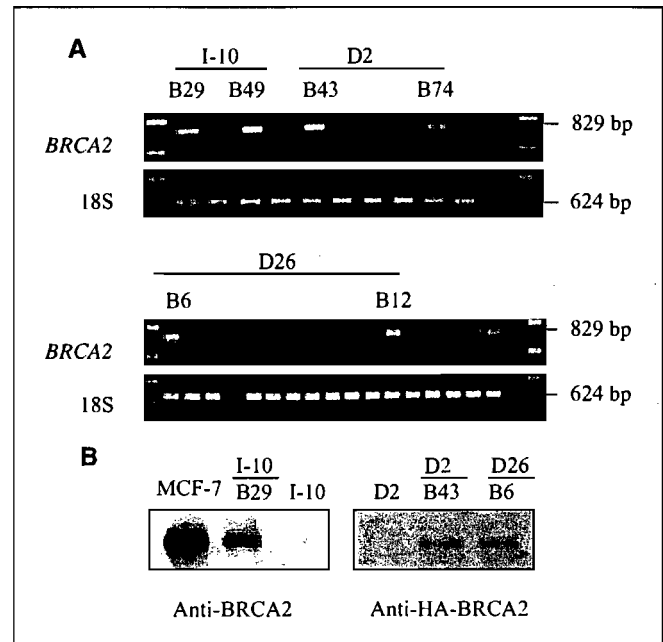


Figure 1. BRCA2 expression in the CAPAN-1 cell lines D2/D26 and I-10. **A**, RT-PCR was carried out with a primer pair that is specific for wild-type BRCA2 mRNA to amplify a 829-bp fragment in the expressing cell lines, whereas a primer pair specific for ribosomal RNA chosen as a control for RT-PCR amplifies a 624-bp fragment in both BRCA2-expressing and nonexpressing cell lines. **B**, Western blot analysis of protein extract using an antibody directed against either the COOH terminus of wild-type HA-BRCA2 or the HA tag.

D26 lines measure a mixture of RAD51-dependent and RAD51-independent homologous recombination events, whereas inverted repeat I-10 cell lines report RAD51-dependent homologous recombination only (refs. 12, 28; Fig. 2A).

Expression of wild-type BRCA2 in direct repeat lines decreases the frequency of homologous recombination by 3- to 5-fold, whereas a similar expression level in inverted repeat lines does so by 22- to 36-fold (Table 1). BRCA2 also diminishes the rate of homologous recombination (events/cell/generation) by up to 3-fold in direct repeat lines, but by 4- to 10-fold in inverted repeat lines (Table 1). These results reveal that CAPAN-1 exhibits a spontaneous hyper-recombination phenotype.

Loss of BRCA2 expression in CAPAN-1 cells restores hyper-recombination. To ascertain that suppression of spontaneous RAD51 recombination is specific to BRCA2 rather than resulting from clonal selection, we repeated the experiments with the inverted repeat line I-10/B49R that no longer expresses BRCA2.

This reverting cell line derives from culturing the inverted repeat line I-10/B49 for several passages in G418-free medium to interrupt selection for BRCA2 expression. The frequency of spontaneous homologous recombination in the reverting line I-10/B49R is similar to the parental line I-10, which was grown in parallel for the same number of passages (Table 1).

BRCA2 inhibits both spontaneous RAD51-dependent and RAD51-independent homologous recombination without affecting the processing of recombination intermediates. In mitotic cells, RAD51-dependent homologous recombination occurs mainly by gene conversion, a nonreciprocal exchange of genetic information, which is rarely associated with crossover, a reciprocal exchange (9). Gene conversion keeps intact the structure of the locus, whereas crossover inverts the intervening Hyg gene between

Table 1. BRCA2 suppresses spontaneous homologous recombination

Cell lines	HR frequency*	Ratio [†]	HR rate [‡]	Ratio
Direct repeat				
D2	$7.1 \pm 3.6 \times 10^{-6}$		1.5×10^{-6}	
D2/B43	$1.3 \pm 0.2 \times 10^{-6}$	5.5	5.6×10^{-7}	2.7
D2/B74	$1.4 \pm 1.0 \times 10^{-6}$	5.1	1.3×10^{-6}	1.2
D26	$6.4 \pm 0.4 \times 10^{-6}$		1.1×10^{-6}	
D26/B6	$2.1 \pm 0.3 \times 10^{-6}$	3.0	7.2×10^{-7}	1.5
D26/B12	$1.4 \pm 0.1 \times 10^{-6}$	4.6	3.4×10^{-7}	3.1
Inverted repeat				
I-10	$2.0 \pm 0.2 \times 10^{-4}$		8.6×10^{-6}	
I-10/B29	$8.8 \pm 4.3 \times 10^{-6}$	22.7	2.1×10^{-6}	4.1
I-10/B49	$5.5 \pm 1.5 \times 10^{-6}$	36.4	8.4×10^{-7}	10.1
I-10	$4.5 \pm 0.3 \times 10^{-5}$			
I-10/B49R	$7.1 \pm 1.3 \times 10^{-5}$	0.63		

Abbreviation: HR, homologous recombination.

*HR frequency represents the mean of three to five experiments and is determined from the number of Puro^R cell clones relative to the total number of viable cells plated 48 h before Puro selection. Parent and BRCA2-expressing G418^R derivative lines were plated in parallel.

[†]Ratio (parent/BRCA2-expressing derivative lines) indicates recombination fold decrease in BRCA2-expressing cells.

[‡]HR rate represents the number of HR events per cell per generation.

inverted repeats and deletes it between direct repeats. However, spontaneous deletions between direct repeats can also result from RAD51-independent, sister chromatid replication slippage (SCRS; Fig. 2A; ref. 28).

To determine which homologous recombination pathway is more affected by BRCA2, we analyzed the structure of recombinants (Puro^R colonies) by PCR (Fig. 2B). In direct repeat parental lines, 26 of 29 (90%) recombination events represent deletions, and the remaining 10% (3 of 29), gene conversion (Table 2). This proportion remained the same in BRCA2-expressing derivative lines (Table 2).

To determine whether spontaneous deletions result from RAD51-dependent crossover or SCRS, we analyzed inverted repeat recombination events. In the inverted repeat parental line I-10, 13 of 14 (93%) recombination events represent gene conversion and the remaining 7% (1 of 14) represents inversion (Table 2). BRCA2-expressing derivative lines yielded similar results in that 93% (14 of 15) seemed to be gene conversion and 7% (1 of 15), inversion (Table 2). In addition, all homologous recombination events in parental lines or BRCA2-expressing derivative lines seemed flanked on both sides by homologous junctions with no apparent rearrangements. These results indicate that BRCA2 does not affect the processing of recombination intermediates towards gene conversion or against crossover, implying that spontaneous deletions between direct repeats result mainly from SCRS (see Discussion).

BRCA2 promotes gene conversion at chromosomal double-strand breaks. Expression of I-Sce1 can increase homologous recombination in wild-type cells by up to 10,000-fold (7). When compared with wild-type human cell lines, CAPAN-1 showed more than a 100-fold decrease in gene conversion following I-Sce1 expression (16). To study the effect of BRCA2 on chromosomal DSB

repair, parental lines and BRCA2-expressing derivatives were transiently cotransfected in parallel with the pBactineSce1 vector, which expresses I-Sce1 (7), and a GFP-expressing vector employed to determine transfection efficiency, which varied from 0.5% to 1.5%. When the I-Sce1 site in the full-length *Puro* gene is cleaved, homologous recombination will repair the DSB to generate Puro^R colonies.

In direct repeat parental lines, I-Sce1 expression increases the frequency of homologous recombination by 200-fold compared with spontaneous homologous recombination (Table 3). PCR analysis of DSB repair products revealed deletion events exclusively (10 of 10; Table 2). Deletion events could not be detected in previous studies with CAPAN-1, as the assay system employed was designed to report gene conversion events only (16). In BRCA2-expressing derivative lines, I-Sce1 expression heightens homologous recombination frequency by up to 600-fold (Table 3), but in contrast to their parent, the increase is equally split between gene conversion and deletion events (Table 2). Because DSB repair involving direct repeats occurs mainly by gene conversion in wild-type cells (9), the partial shift to gene conversion events could reflect partial complementation of CAPAN-1 cells (Fig. 1B).

I-Sce1-induced deletion between direct repeats can result either from crossover or SSA events. At inverted repeats, crossover inverts the intervening sequences, whereas SSA cannot take place because the exposed ssDNA flanking a DSB would be identical and unable to anneal. In the inverted repeat parental line I-10, the frequency of I-Sce1-induced homologous recombination is similar to that of spontaneous homologous recombination, whereas in BRCA2-expressing derivative lines the frequency of I-Sce1-induced homologous recombination increases by 246-fold (Table 3). PCR analysis of DSB repair products indicates that the proportions of I-Sce1-induced error-free gene conversion (93%) and crossover (inversion; 7%) events are similar to those of spontaneous homologous recombination events (Table 2). These results suggest that BRCA2 also does not affect the processing of recombination intermediates at chromosomal DSBs. Thus, deletions between direct repeats must have occurred almost exclusively by SSA. These results indicate that in BRCA2-deficient cells, the error-prone SSA pathway predominates and BRCA2 promotes error-free repair of chromosomal DSBs by gene conversion, providing good confirmation of previous reports (16, 17).

Discussion

We compared homologous recombination before and after transfection of wild-type BRCA2 in the BRCA2-deficient human CAPAN-1 cell line. The results show that CAPAN-1 cells exhibit not only a defect in homology-directed error-free repair of chromosomal DSBs but also a spontaneous hyper-recombination phenotype. The ability of BRCA2 to both suppress spontaneous homologous recombination and promote error-free repair of chromosomal DSBs provides evidence of a dual role for this protein in regulating homologous recombination in response to the type of DNA damage.

CAPAN-1 cells express a truncated form of BRCA2 that retains significant RAD51-binding capacity but is primarily localized to the cytoplasm (29); its exclusion from the nucleus may explain the spontaneous hyper-recombination phenotype. Although in CAPAN-1 cells RAD51 was found in the cytoplasm, presumably sequestered by the truncated BRCA2, an appreciable level of

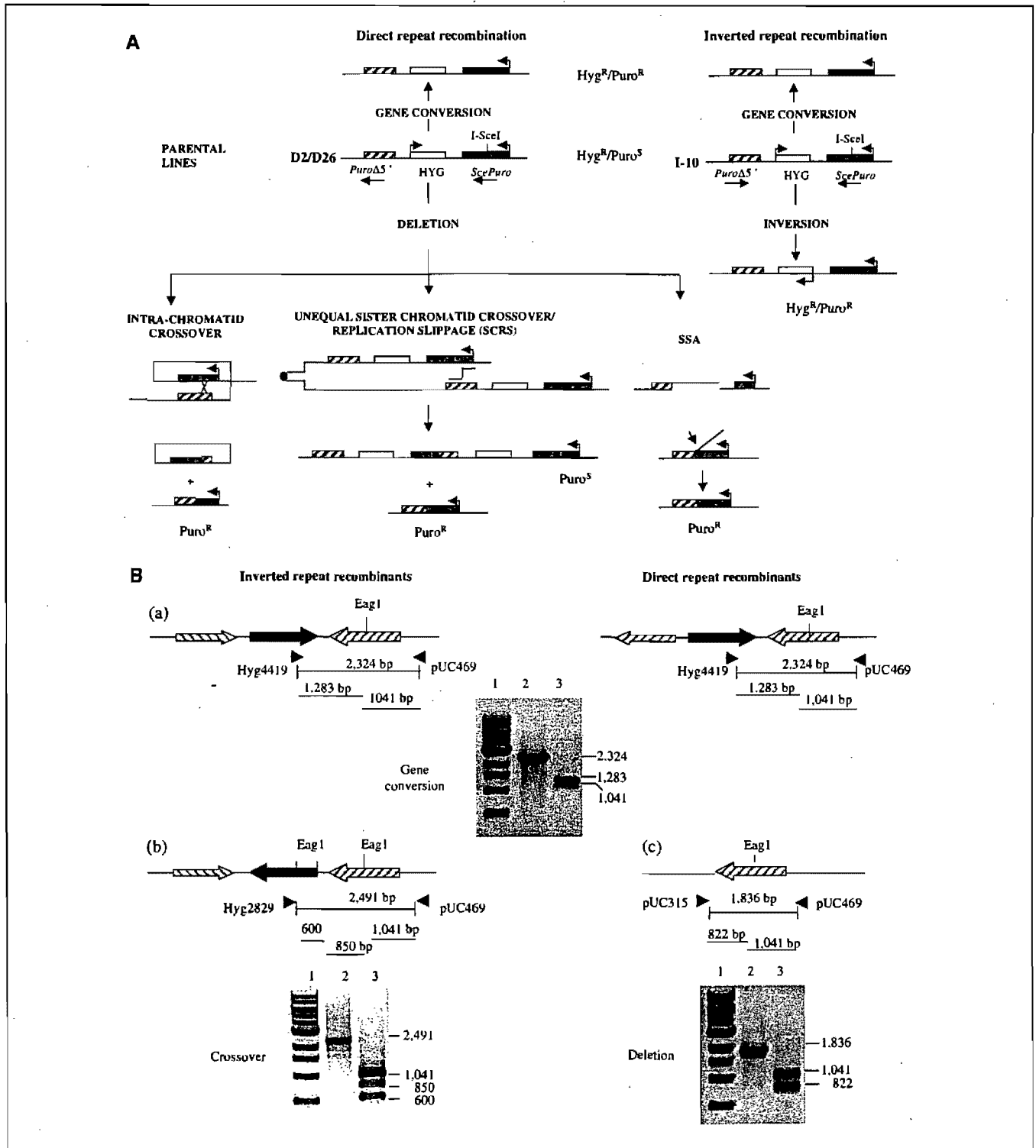


Figure 2. Chromosomal homologous recombination between direct and inverted repeats. **A**, spontaneous or DSB-induced homologous recombination events reconstitute a functional *Puro* gene through loss of the *I-Sce1* site and gain of the *EagI/BssHII* sites, restoring *Puro^R*. Because *I-Sce1* Insertion mutation in *ScεPuro* entails deletion of the *EagI* and *BssHII* sites, only homologous recombination events between the two *Puro* cassettes restore a functional *ScεPuro* gene. Gene conversion restores one functional *Puro* gene without affecting the overall structure of the locus, whereas crossover between inverted repeats inverts the intervening sequences. Deletion can result from different RAD51-dependent intrachromatid or mispaired sister chromatid crossovers, or RAD51-independent SCRS or SSA. **B**, PCR analysis of *Puro^R* recombinants. **a**, inverted and direct repeat gene conversion products: the primer pair Hyg4419/pUC469 amplifies an *I-Sce1*-resistant 2,324-bp fragment (lane 2) that can be cut with *EagI* into 1,283 and 1,041 bp (lane 3). **b**, inverted repeat crossover (inversion): the primer pair Hyg2829 and pUC469 amplifies an inverted, *I-Sce1*-resistant 2,491-bp fragment (lane 2) that can be cut with *EagI* into three fragments: 1,041, 850, and 600 bp (lane 3). **c**, direct repeat deletion (crossover/SSA/SCRS) products: the primer pair pUC315 and pUC469 amplifies an *I-Sce1*-resistant 1,836-bp fragment (lane 2) that can be cut with *EagI* into two fragments: 822 and 1,041 bp. Lane 1, a 1-kbp ladder.

Table 2. Effect of BRCA2 on homologous recombination pathways

Cell lines	Spontaneous HR GC (%)	CO/SCRS (%)	I-SceI HR GC (%)	CO/SSA (%)
Direct repeat				
D2/D26 (<i>BRCA2</i>)	3/29 (10)	26/29 (90)	0/10 (0)	10/10 (100)
D2/D26 (<i>BRCA2</i> [*])	2/20 (10)	18/20 (90)	6/12 (50)	6/12 (50)
Inverted repeat				
I-10 (<i>BRCA2</i>)	13/14 (93)	1/14 (7)	13/14 (93)	1/14 (7)
I-10 (<i>BRCA2</i> [*])	14/15 (93)	1/15 (7)	14/15 (93)	1/15 (7)

Abbreviations: GC, gene conversion; CO, crossover; HR, homologous recombination.

nuclear RAD51 that can carry out spontaneous homologous recombination was found associated with S-phase chromatin and capable of forming nuclear foci during the S phase, presumably at replication fork arrest sites (30).

BRCA2 may regulate RAD51 recombination according to the type of DNA damage response (Fig. 3), a complex cascade of phosphorylation events that ultimately serve to influence or effect DNA repair, cell cycle delay or apoptosis with the overall objective of maintaining genome stability. In mammalian cells, two related protein kinases, ATM and ATR, orchestrate such a response (31). Whereas ATR responds to ssDNA break (SSB)-inducing agents, ATM responds exclusively to DSB-inducing agents. Both SSBs and DSBs may occur spontaneously during the growth of CAPAN-1 cells due to failure to reactivate stalled DNA replication forks (32). The assembly of RAD51 foci following DNA damage depends on RAD51 phosphorylation by C-ABL, which in response to DSBs, is activated by ATM (31). However, RAD51 phosphorylation by C-ABL inhibits its strand exchange activity *in vitro* (33), presumably by disrupting RAD51 nucleoprotein filament formation (34), but activates it

in vivo in response to DNA damage (35). As BRCA2 promotes RAD51-dependent homologous recombination at DSBs, the disparate effect of C-ABL on RAD51 could be reconciled if BRCA2 activates a phosphorylated form of RAD51 or prevents its phosphorylation after such damage (Fig. 3). In this hypothetical model, BRCA2 acts to coordinate DNA damage signaling with repair. However, whether BRCA2 suppresses spontaneous RAD51 recombination via ATR is not known. Whereas evidence of a direct connection between ATR and BRCA2 is still lacking, BRCA2 interacts with BRCA1, which interacts with C-ABL, RAD51, and ATR (3, 36). ATR phosphorylates BRCA1 upon exposure to hydroxyurea, an agent that induces SSBs at replication forks (3), and BRCA1 regulates RAD51 recombination as BRCA2.⁴ Thus, BRCA2 may regulate RAD51 recombination, at least in part, in conjunction with BRCA1.

That BRCA1/2-deficient cells display similar chromosomal abnormalities but distinct DSB repair phenotypes (in BRCA2-deficient cells, homologous recombination is defective, NHEJ is normal, and SSA is highly proficient, whereas all these mechanisms are impaired in BRCA1-deficient cells) suggests that chromosomal instability provoked by *BRCA1/2* deficiency is due instead to an unknown mechanism that remains to be defined (37). Spontaneous hyper-recombination may be such a mechanism, as it is also a defining feature of the human cancer predisposition syndromes ataxia telangiectasia, Bloom's syndrome, and Fanconi's anemia with similar chromosomal abnormalities (see Introduction; ref. 6), although the underlying mechanisms may be different. The phenotype of BRCA1/2-deficient cells seems similar to that of FANCD1- and ATM-deficient cells but distinct from that of BLM-deficient cells. The phenotype of BLM-deficient cells is characterized by a defect in the processing of Holliday junction recombination intermediates (19). BLM-catalyzed Holliday junction dissolution against crossover prevents chromosomal abnormalities as well as high frequency of spontaneous or induced sister chromatid exchanges (SCEs) seen in BLM-deficient cells (6, 19). The BLM homologue in *Drosophila* also seems implicated in the accurate termination of gene conversion (38). Thus, BLM-deficient cells may also accumulate chromosomal rearrangements during DSB repair through the coupling of gene conversion and NHEJ, a phenomenon that occurs with high frequency in cells with defects in the accurate termination of homologous recombination, such as BLM-, WRN-, XRCC3-, and MSH2-deficient cells (13, 20, 25, 38). However, unlike BLM, WRN,

Table 3. Effect of BRCA2 on spontaneous and I-SceI-induced HR

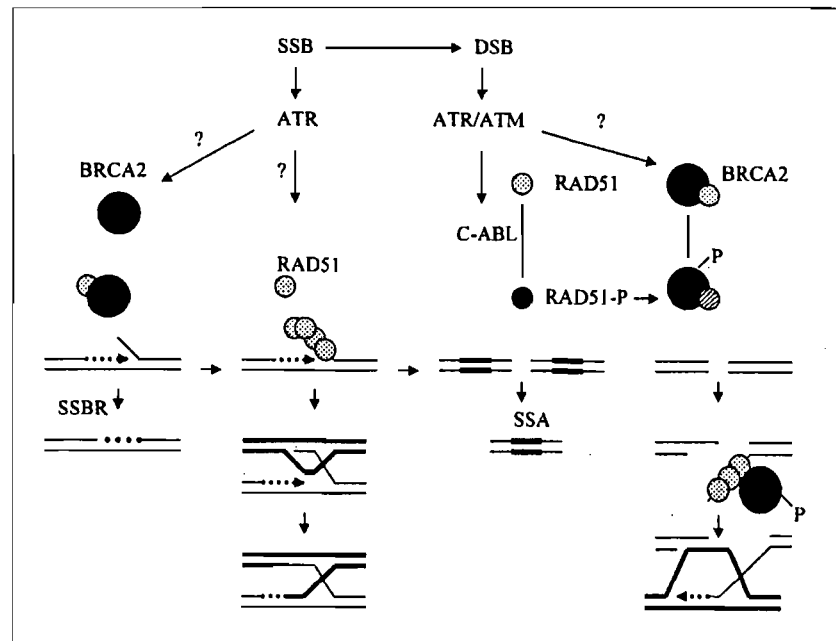
Cell lines	Frequency*		Ratio
	Spontaneous	I-SceI	I-SceI/spontaneous
Direct repeat			
D2	$5.5 \pm 0.6 \times 10^{-6}$	$9.7 \pm 2.8 \times 10^{-4}$	176
D2/B74	$1.1 \pm 0.8 \times 10^{-6}$	$6.4 \pm 3.4 \times 10^{-4}$	582
D26	$3.2 \pm 0.7 \times 10^{-6}$	$3.8 \pm 3.2 \times 10^{-4}$	118
D26/B12	$8.5 \pm 5.9 \times 10^{-7}$	$5.0 \pm 5.4 \times 10^{-4}$	588
Inverted repeat			
I-10 [†]	$5.7 \pm 1.6 \times 10^{-5}$	$4.1 \pm 1.1 \times 10^{-5}$	0.72
I-10/B29	$2.6 \pm 0.1 \times 10^{-6}$	$6.4 \pm 1.2 \times 10^{-4}$	246

*Frequency represents the mean of four experiments. I-SceI frequency was calculated from the number of Puro^R colonies relative to the number of cells expressing GFP. Puro selection was applied 10 d after transfection of cells with I-SceI expressing vector or a control vector for spontaneous HR.

[†]The I-SceI frequency of this cell line was calculated from the number of Puro^R colonies relative to the number of plated cells.

⁴I. Cousineau et al., unpublished data.

Figure 3. A model of BRCA2 in genome stability. In normal cells, BRCA2 sequesters RAD51 to prevent spontaneous homologous recombination at a SSB, thereby promoting SSBR and preventing conversion of a SSB to a DSB. After a DSB, ATM inactivates free RAD51 through C-ABL but activates the BRCA2/RAD51 complex. In BRCA2-deficient cells, RAD51 is active and initiates spontaneous HR at a SSB, thereby decreasing the efficiency of SSBR. Upon a DSB, RAD51 becomes inactive by phosphorylation, leaving the damage unrepaired or shunting it to error-prone repair pathways (see text for further explanation).



RAD51C, MSH2, or XRCC3, our results indicate that BRCA2 does not affect the processing of recombination intermediates towards gene conversion or against crossover, nor is it required for accurate termination of gene conversion. All gene conversion products in CAPAN-1 cells were flanked on both sides by homologous junctions; inaccurate termination of gene conversion is characterized by rearrangements at one homologous junction (25, 39). In addition, unlike BLM-deficient cells, BRCA1/2-, ATM-, and FANCD1-deficient cells exhibit normal or decreased SCEs but increased frequency of spontaneous deletion and gene conversion events (refs. 6, 15 and this study).⁴ Thus, the spontaneous hyper-recombination phenotype of BRCA1/2-, ATM-, and FANCD1-deficient cells seems more consistent with a loss in homologous recombination regulation rather than a defect in the processing of recombination intermediates.

Spontaneous hyper-recombination also has the potential to trigger chromosomal instability in the presence of cell cycle checkpoints. Gene conversion leads to LOH when acting between two heteroalleles, or to gene inactivation when acting between a gene and a pseudogene (13). Gene conversion has been shown to inactivate cell cycle checkpoint genes, such as retinoblastoma *Rb* (40) and *p53* (41, 42), and there is evidence that BRCA1/2 and *p53* mutations can cooperate in tumorigenesis. Thus, spontaneous hyper-gene conversion would be expected to increase the load of such mutational events. This would allow incipient tumor cells with broken chromosomes to bypass the proliferation block, grow, and accumulate further chromosomal rearrangements by error-prone pathways.

BRCA2 also suppresses spontaneous homologous recombination between direct repeats. Although BRCA2-deficient cells are highly proficient in DSB repair by the error-prone SSA pathway, spontaneous deletions in CAPAN-1 cells cannot be induced by DSBs. If DSBs were the inducers, BRCA2 would be expected to alter the proportion of spontaneous and DSB-induced gene conversion and deletion events similarly. However, the results show that whereas BRCA2 does not affect the proportions of spontaneous events, it does increase gene conversion at the expense of dele-

tion at chromosomal DSBs. The majority of spontaneous deletion events also cannot be ascribed to increased crossover events, as such events were scarce at inverted repeats. Thus, most spontaneous deletions can be ascribed to an increase in SCRS, suggesting a role for BRCA2 in sister chromatids cohesion and/or alignment, an idea that has been invoked by others (23).

SCRS or crossover between misaligned sister chromatids would lead to LOH and gene amplification between direct repeats but could also culminate in acentric and dicentric (quadriradial) chromosomes when involving inverted repeats. Such spontaneous homologous recombination events could also generate translocations between heterologous chromosomes. A balanced translocation could culminate in the formation of a quadriradial structure (see illustration in ref. 23), which is presumably unstable and can undergo breakage-fusion cycles; which in DSB repair deficient cells, this would yield a triradial and a broken chromosome. Chromosomal rearrangements could lead to improper regulation of gene expression that could, in turn, result in inactivation of tumor suppressor genes or activation of oncogenes.

BRCA1/2 have been postulated to restart broken replication forks through the error-free process of homologous recombination (3, 4). However, in the absence of DSBs, BRCA1/2 may regulate homologous recombination at stalled replication forks to allow DNA damage repair by other simple error-free mechanisms, including mismatch repair, nucleotide excision repair (NER), base excision repair (BER), or replication fork regression. BRCA1/2-deficient cells exhibit reduced DNA ligase activity during BER and a defect in NER (37, 43). *Brca2* has been shown to stabilize replication forks; in its absence, the forks collapse into DSBs after being stalled at SSBs by hydroxyurea treatment (32). Chromosome and chromatid breaks that arise in cycling BRCA1/2 mutant cells may also result as a consequence of inefficient repair of SSBs. Thus, in addition to DSB repair, a role for BRCA1/2 in SSB repair (SSBR) at replication forks would also prevent fork collapse.

Exactly how BRCA1/2 proteins might influence the repair of SSBs at replication forks is not known. Perhaps, by keeping RAD51 away from DNA damage, BRCA1/2 would facilitate accessibility to

SSBR components. The interaction of BRCA1/2 with one or more of these components may also be important. A SSBR model postulates that continued DNA synthesis at the 3' end of a SSB would displace the 5' terminus as a single-strand flap (44), an efficient substrate for RAD51 (Fig. 3; ref. 45). The flap can be removed by FEN and XRCC1, which in turn may be stimulated by proliferating cell nuclear antigen (PCNA; ref. 44). An association between BRCA1/2 and SSBR proteins is also suggested by the observation that BRCA1/2 foci partially localize with RAD51 foci during the S phase and relocalize to PCNA-containing structures and in response to SSB-inducing agents, such as UV light and hydroxyurea (23). Recognition and/or removal of the flap by FEN, PCNA, and XRCC1 (44) may also implicate BRCA1/2. BRCA2 has the ability to bind different forms of DNA (46), and BRCA1 binds DNA flaps *in vitro* (47). In addition, BRCA1 interacts with MSH2 and BLM that have been implicated in DNA flap removal from recombination intermediates (12, 25, 38).

It is currently thought that BRCA1/2 protect breast and ovarian tissues from estrogen-induced DNA damage, but a molecular basis has been lacking. As estrogen metabolites adduct DNA, cause SSBs, and induce genome instability (48), BRCA1/2 may protect against estrogen-induced spontaneous hyper-recombination. Given that cells from *BRCA1/2* mutation carriers seem more radiosensitive (haploinsufficient) than cells from wild-type individuals (49), estrogen-induced hyper-recombination may rearrange or delete the remaining wild-type *BRCA1/2* allele in heterozygotes

for *BRCA1/2* mutations or in wild-type individuals with decreased BRCA1/2 expression (50). Estrogen-induced hyper-recombination may, therefore, underlie tissue specificity of the tumor suppressive properties of BRCA1/2, and the increased risk of breast and ovarian cancers.

In summary, our results provide the first genetic evidence that BRCA2 regulates RAD51 recombination according to the type of DNA damage. As BRCA2 is required for RAD51-dependent homologous recombination activation following chromosomal DSBs, selected RAD51 peptides or compounds that interfere with BRCA2 function may thus present new reagents to sensitize BRCA2-expressing tumor cells to the lethal effect of therapeutic DSB-inducing agents.

Acknowledgments

Received 8/25/2004; revised 2/9/2005; accepted 3/7/2005.

Grant support: Canadian Breast Cancer Research Initiative and Montreal Breast Cancer Foundation (A. Belmaaza); Fonds de la recherche en santé du Québec scholarship (A. Belmaaza); Canderel fellowship (C. Abaji); and Faculté des études supérieures, Université de Montréal fellowship (I. Cousineau).

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

We thank Drs. David Livingston (Dana-Farber Cancer Institute and The Harvard Medical School, Boston, MA) and Maria Jasin (Molecular Biology Program, Memorial Sloan-Kettering, New York, NY) for generously providing us with pcDNA3βHA/BRCA2 and pβactinScel plasmids, respectively; Fatima Zouanat and Bouchra Labraki for the technical assistance; and Ovid Da Silva (Research Support Office, Research Centre, Centre hospitalier de l'université de Montréal) for his editorial revision of this article.

References

- King MC, Marks JH, Mandell JB. Breast and ovarian cancer risks due to inherited mutations in BRCA1 and BRCA2. *Science* 2003;302:643-6.
- D'Andrea AD, Grompe M. The Fanconi anaemia/BRCA pathway. *Nat Rev Cancer* 2003;3:23-34.
- Scully R, Livingston DM. In search of the tumour-suppressor functions of BRCA1 and BRCA2. *Nature* 2000;408:429-32.
- Venkitaraman AR. Cancer susceptibility and the functions of BRCA1 and BRCA2. *Cell* 2002;108:171-82.
- Jasin M. Homologous repair of DNA damage and tumorigenesis: the BRCA connection. *Oncogene* 2002;21:8981-93.
- Meyn MS. Chromosome instability syndromes: lessons for carcinogenesis. *Curr Top Microbiol Immunol* 1997;221:71-148.
- Liang F, Han M, Romanienko PJ, Jasin M. Homology-directed repair is a major double-strand break repair pathway in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:5172-7.
- Khanna KK, Jackson SP. DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. *Nat Genet* 2001;27:247-54.
- Johnson RD, Jasin M. Sister chromatid gene conversion is a prominent double-strand break repair pathway in mammalian cells. *Embo J* 2000;19:3398-407.
- West SC. Molecular views of recombination proteins and their control. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003;4:435-45.
- Belmaaza A, Chartrand P. One-sided invasion events in homologous recombination at double-strand breaks. *Mutat Res* 1994;314:199-208.
- Paques F, Haber JE. Multiple pathways of recombination induced by double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev* 1999;63:349-404.
- Bertrand P, Saintigny Y, Lopez BS. p53's double life: transactivation-independent repression of homologous recombination. *Trends Genet* 2004;20:235-43.
- Kolomietz E, Meyn MS, Pandita A, Squire JA. The role of Alu repeat clusters as mediators of recurrent chromosomal aberrations in tumors. *Genes Chromosomes Cancer* 2002;35:97-112.
- Venkitaraman AR. Tracing the network connecting brca and fanconi anaemia proteins. *Nat Rev Cancer* 2004;4:266-76.
- Moynahan ME, Pierce AJ, Jasin M. BRCA2 is required for homology-directed repair of chromosomal breaks. *Mol Cell* 2001;7:263-72.
- Tutt A, Bertwistle D, Valentine J, et al. Mutation in Brca2 stimulates error-prone homology-directed repair of DNA double-strand breaks occurring between repeated sequences. *Embo J* 2001;20:4704-16.
- Lambert S, Lopez BS. Characterization of mammalian RAD51 double strand break repair using non-lethal dominant-negative forms. *Embo J* 2000;19:3090-9.
- Wu L, Hickson ID. The Bloom's syndrome helicase suppresses crossing over during homologous recombination. *Nature* 2003;426:870-4.
- Brenneman MA, Wagener BM, Miller CA, Allen C, Nickoloff JA. XRCC3 controls the fidelity of homologous recombination: roles for XRCC3 in late stages of recombination. *Mol Cell* 2002;10:387-95.
- Liu Y, Masson JY, Shah R, O'Regan P, West SC. RAD51C is required for Holliday junction processing in mammalian cells. *Science* 2004;303:243-6.
- Marmorstein LY, Kinev AV, Chan GK, et al. A human BRCA2 complex containing a structural DNA binding component influences cell cycle progression. *Cell* 2001;104:247-57.
- Scully R, Puget N, Vlasakova K. DNA polymerase stalling, sister chromatid recombination and the BRCA genes. *Oncogene* 2000;19:6176-83.
- Chen J, Silver DP, Walpita D, et al. Stable interaction between the products of the BRCA1 and BRCA2 tumor suppressor genes in mitotic and meiotic cells. *Mol Cell* 1998;2:317-28.
- Villemure JF, Abaji C, Cousineau I, Belmaaza A. MSH2-deficient human cells exhibit a defect in the accurate termination of homology-directed repair of DNA double-strand breaks. *Cancer Res* 2003;63:3334-9.
- Capizzi RL, Jameson JW. A table for the estimation of the spontaneous mutation rate of cells in culture. *Mutat Res* 1973;17:147-8.
- Xia F, Taghian DG, DeFrank JS, et al. Deficiency of human BRCA2 leads to impaired homologous recombination but maintains normal nonhomologous end joining. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:8644-9.
- Klein HL. Genetic control of intrachromosomal recombination. *Bioessays* 1995;17:147-59.
- Spain BH, Larson CJ, Shihabuddin LS, Gage FH, Verma IM. Truncated BRCA2 is cytoplasmic: implications for cancer-linked mutations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:13920-5.
- Tarsounas M, Davies D, West SC. BRCA2-dependent and independent formation of RAD51 nuclear foci. *Oncogene* 2003;22:1115-23.
- Shiloh Y. ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity. *Nat Rev Cancer* 2003;3:155-68.
- Lomonosov M, Anand S, Sangrithi M, Davies R, Venkitaraman AR. Stabilization of stalled DNA replication forks by the BRCA2 breast cancer susceptibility protein. *Genes Dev* 2003;17:3017-22.
- Yuan ZM, Huang Y, Ishiko T, et al. Regulation of Rad51 function by c-Abl in response to DNA damage. *J Biol Chem* 1998;273:3799-802.
- Conilleau S, Takizawa Y, Tachiwana H, Fleury F, Kurumizaka H, Takahashi M. Location of tyrosine 315, a target for phosphorylation by cAbl tyrosine kinase, at the edge of the subunit-subunit interface of the human Rad51 filament. *J Mol Biol* 2004;339:797-804.
- Slupianek A, Schmutte C, Tomblin G, et al. BCR/ABL regulates mammalian RecA homologs, resulting in drug resistance. *Mol Cell* 2001;8:795-806.
- Foray N, Marot D, Randrianarison V, et al. Constitutive association of BRCA1 and c-Abl and its ATM-dependent disruption after irradiation. *Mol Cell Biol* 2002;22:4020-32.
- Zheng L, Li S, Boyer TG, Lee WH. Lessons learned from BRCA1 and BRCA2. *Oncogene* 2000;19:6159-75.
- Adams MD, McVey M, Sekelsky JJ, Drosophila BLM in double-strand break repair by synthesis-dependent strand annealing. *Science* 2003;299:265-7.
- Belmaaza A, Milot E, Villemure JF, Chartrand P. Interference of DNA sequence divergence with precise

- recombinational DNA repair in mammalian cells. *Embo J* 1994;13:5355-60.
40. Cavenee WK, Dryja TP, Phillips RA, et al. Expression of recessive alleles by chromosomal mechanisms in retinoblastoma. *Nature* 1983;305:779-84.
41. Tanooka H, Ootsuyama A, Sasaki H. Homologous recombination between p53 and its pseudogene in a radiation-induced mouse tumor. *Cancer Res* 1998;58:5649-51.
42. Slebos RJ, Resnick MA, Taylor JA. Inactivation of the p53 tumor suppressor gene via a novel Alu rearrangement. *Cancer Res* 1998;58:5333-6.
43. Bogliolo M, Taylor RM, Caldecott KW, Frosina G. Reduced ligation during DNA base excision repair supported by BRCA2 mutant cells. *Oncogene* 2000;19:5781-7.
44. Caldecott KW. XRCC1 and DNA strand break repair. *DNA Repair (Amst)* 2003;2:955-69.
45. Smith GR. How homologous recombination is initiated: unexpected evidence for single-strand nicks from $\nu(d)$ site-specific recombination. *Cell* 2004;117:146-8.
46. Yang H, Jeffrey PD, Miller J, et al. BRCA2 function in DNA binding and recombination from a BRCA2-DSS1-ssDNA structure. *Science* 2002;297:1837-48.
47. Paull TT, Cortez D, Bowers B, Elledge SJ, Gellert M. Direct DNA binding by Brca1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:6086-91.
48. Liehr J. G. Is estradiol a genotoxic mutagenic carcinogen? *Endocr Rev* 2000;21:40-54.
49. Buchholz TA, Wu X, Hussain A, et al. Evidence of haplotype insufficiency in human cells containing a germline mutation in BRCA1 or BRCA2. *Int J Cancer* 2002;97:557-61.
50. Welch PL, Owens KN, King MC. Insights into the functions of BRCA1 and BRCA2. *Trends Genet* 2000;16:69-74.