



Cap a un model complet de la xarxa molecular alterada en l'anèmia de Fanconi i el càncer de mama

Griselda Martrat Sánchez

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

IDIBELL
Institut d'Investigació Biomèdica de Bellvitge



UNIVERSITAT DE BARCELONA



ICO
Institut Català d'Oncologia
Hospital Duran i Reynals

UNIVERSITAT DE BARCELONA

FACULTAT DE MEDICINA

PROGRAMA DE DOCTORAT EN BIOMEDICINA

**CAP A UN MODEL COMPLET DE LA XARXA MOLECULAR
ALTERADA EN L'ANÈMIA DE FANCONI I
EL CÀNCER DE MAMA**

Griselda Martrat Sánchez

Febrer, 2012

CAP A UN MODEL COMPLET DE LA XARXA MOLECULAR ALTERADA EN L'ANÈMIA DE FANCONI I EL CÀNCER DE MAMA

Memòria presentada per **Griselda Martrat Sánchez** per optar al grau
de **Doctor per la Universitat de Barcelona**

Aquesta tesi doctoral ha estat realitzada sota la direcció del Dr. Miquel Angel Genestar Pujana al Laboratori de Recerca Translacional de l'Institut Català d'Oncologia.

L'Hospitalet de Llobregat, Febrer de 2012

Dr. Miguel Angel Genestar Pujana
Director

Dr. Victor Raúl Moreno Aguado
Tutor

Griselda Martrat Sánchez
Doctoranda

A les meves iaies

**No tens enemics? És que mai has dit la veritat o que mai has
estimat la justícia**

Ramón y Cajal (Científic Navarrès)

TAULA DE CONTINGUTS

TAULA DE CONTINGUTS

TAULA DE CONTINGUTS	I
ACRÒNIMS	VII
RESUM	1
INTRODUCCIÓ	5
1 Anèmia de Fanconi	7
1.1 Generalitats.....	7
1.2 Genètica	8
1.3 Via de senyalització FA/BrCa	9
2 Reparació del DNA	15
2.1 Mecanismes de reparació del dany al DNA.....	15
2.2 Reparació per recombinació homòloga.....	16
2.3 Reparació per unió d'extremes no homòlegs	19
2.4 Reparació per unió de cadena senzilla	21
2.5 Col·laboració entre la HR i NHEJ	21
2.6 Entrecreuament entre cadenes.....	23
2.7 Els DSB com a pas intermediari de la reparació dels ICL	23
2.8 Reparació del DNA i relació amb FA.....	24
3 Càncer de mama	25
3.1 Gens de susceptibilitat al càncer	26
3.2 Classificació dels gens de susceptibilitat al càncer de mama	27
3.2.1 Gens de susceptibilitat al càncer de mama d'alta penetrància	28
3.2.2 Gens de susceptibilitat al càncer de mama de moderada penetrància	28
3.2.3 Gens de susceptibilitat al càncer de mama de baixa penetrància	29
3.3 Modificadors de BRCA1 i BRCA2.....	30
3.4 Connexió de FA i el càncer de mama	32
3.5 Estructura de BRCA1 i BRCA2.....	33
3.6 Cooperació de BRCA1 i BRCA2 en la reparació del dany al DNA	34
3.7 Característiques de BRCA1	34
3.8 Característiques de BRCA2	36
3.9 Interacció BRCA2 amb PALB2	38
3.10 Noves proteïnes involucrades en la via de senyalització FA/BrCa	39
HIPOTESIS	41
OBJECTIUS D'ESTUDI	45

MATERIALS I MÈTODES	49
1. MATERIALS.....	51
1.1 Cultius cel·lular.....	51
1.2 Anticossos.....	51
1.3 Vectors d'expressió.....	53
2. PROCEDIMENTS EXPERIMENTALS	54
2.1 Cribatge del yeast two-hybrid	54
▪ Mating screening protocol.....	55
2.2 Anàlisi de perfils d'expressió.....	56
2.3 Assaig de supervivència i siRNA	57
2.4 Western Blotting	57
2.5 Immunofluoroscències.....	58
2.6 Co-immunoprecipitacions	58
2.7 Co-affinity purification	59
2.8 Estudis en <i>Caenorhabditis elegans</i>	59
2.9 Estudi de les mostres i Anàlisis estadístics i genotípics	60
RESULTATS	63
1. Noves interaccions físiques en la via de senyalització FA/BrCa	65
2. Interacció entre PALB2-MRG15	76
3. Estudi de MRG15 com a possible gen FA	79
4. MRG15 i reparació del dany al DNA	81
5. Estudi de la funció de NRG15 en <i>C.elegans</i>	86
6. <i>MORF4L1</i> i el risc a BrCa	89
DISCUSSIÓ.....	95
ANNEX.....	109
CONCLUSIONS.....	119
BIBLIOGRAFIA.....	123

Llista de figures

Figura 1. Anàlisi cariotípic de cèl·lules derivades dels pacients que pateixen anèmia de Fanconi (FA).....	8
Figura 2. Esquema de l'activació de la via de senyalització de FA/BrCa.....	11
Figura 3. Esquema de la reparació de DSB per HR.....	17
Figura 4. Nucleofilament de RAD51.....	18
Figura 5. Interacció entre BRCA2 i RAD51.....	18
Figura 6. Via de reparació per unió d'extrems no homòlegs (NHEJ).....	20
Figura 7. Competició entre les diferents vies de reparació dels DSB.....	22
Figura 8. Gens de susceptibilitat al càncer de mama.....	26
Figura 9. Correlació fenotípica-genotípica de mutacions bial·lèliques i monoal·lèliques.....	29
Figura 10. Associació de les mitjes de les freqüències i el risc relatiu dels gens de susceptibilitat al càncer de mama.....	30
Figura 11. Esquema de BRCA1.....	35
Figura 12. Organització de BRCA2 i estructura del domini DBD.....	37
Figura 13. Models en controvèrsia de la funció de MRG15.....	40
Figura 14. Estructura del vector pDONR201 i pDEST27.....	53
Figura 15. Vectors Gateway utilitzats en el Y2H.....	56
Figura 16. Passos a seguir per a l'obtenció dels <i>bait</i> s de cada proteïna.....	70
Figura 17. Obtenció dels <i>bait</i> s amb el seu domini d'unió al DNA (DBD).....	71
Figura 18. Exemple de regions d'interacció.....	74
Figura 19. Validació de les interaccions mitjançant co-immunoprecipitacions endògenes i co-affinity purification.....	74
Figura 20. Diagrama esquemàtic de l'estructura de MRG15, MRGX i MORF4.....	75
Figura 21. Resultats de les diferents co-AP per PALB2-MR15/MRGX.....	78
Figura 22. Anàlisi de la monoubiquitinació de FANCD2.....	79
Figura 23. Anàlisi de l'expressió proteica de MRG15 en pacients FA no classificats.....	81
Figura 24. Mrg15 deficients confereixen sensibilitat a la irradiació- γ	81
Figura 25. Co-localització de EmGFP-tagged TSNAX i TRF2.....	82
Figura 26. Les línies cel·lulars embrionàries de fibroblast de murins (MEF) Mrg15 deficients danyen la formació de foci de Rad51.....	84
Figura 27. Nivells de Brca1, Brca2 i Rad51.....	85
Figura 28. Estudi fenotípic dels mutants <i>brc-2</i> i <i>mrg-1</i> de <i>Caenorhabditis elegans</i>	87
Figura 29. Variació del locus <i>MORF4L1</i> i el risc a càncer de mama.....	93
Figura 30. Possible model de participació de MRG15 en la reparació per HR dels DSB.....	103

Figura 31 Diagrama esquemàtic del gen E6TP1	111
Figura 32 Co-immunoprecipitació (co-IP) endògena de BRCA2 i E6TP1 en HeLa..	113
Figura 33 Co-affinity purification dels diferents constructes de E6TP1-Myc.....	114
Figura 34 Co-affinity purification del bait 49GST de BRCA2.....	115
Figura 35 Fraccionament de la línia cel·lular HeLa.....	116

Llista de taules

Taula 1. Gens que juguen un paper important en la via de senyalització de FA..	9
Taula 2. Taula d'incidència i mortalitat entre la població mundial femenina de tots els tipus de càncer.	25
Taula 3. Llista d'anticossos primaris.	52
Taula 4. siRNA MORFL1 i MORF4L2	57
Taula 5. Taula amb les proteïnes involucrades en la via de senyalització FA/BrCa distribuïdes segons la seva funcionalitat.....	69
Taula 6. Exemple de les troballes obtingudes en el cribatge del Y2H..	72
Taula 7. Taula que mostra les 27 interaccions obtingudes a partir del sistema del Y2H	73
Taula 8. Associació entre les variants en el locus de <i>MORF4L1</i> i el risc a càncer de mama	90

ACRÒNIMS

3AT	3-amino 1,2,4-triazole	IR	Radiació ionitzant
aa	Amino àcid	LEU	Leucina
AD	Domini d'activació	LZ	Leucine zipper
ATM	Ataxia telangiectasia mutated	MEFs	Línies cel·lulars embrionàries de fibroblast de murins
ATR	Ataxia telangiectasia and Rad3 related	MMC	Mitomicina C
BD	Domini d'unió	MMR	Reparació d'aparellaments erronis
BrCa	Càncer de mama	MORF4L1/	Mortality factor on chromosoma 15
		MRG15	
CGEMS	Cancer Genetic Markers of Susceptibility	MORF4L2/	Mortality factor on chromosoma X
		MRGX	
CI	Interval de confiança	NER	Excisió de nucleòtids
CIMBA	Consorti d'Investigadors de Modificadors de <i>BRCA1</i> i <i>BRCA2</i>	NHEJ	Reparació per unió d'extrems no homòlegs
Co-AP	Co-affinity purifications	NLS	Domini de localització nuclear
Co-IP	Co-immunoprecipitacions	NOS	Espècies reactives de nitrogen
D'	Coefficient de desequilibri normalitzat	OB	Domini d'unió d'oligonucleòtids-oligosacarids
DAPI	4,6-diamidino-2-phenylIndole	OR	Odds ratio
DEB	Diepoxibutà	ORF	Open-reading frame
D-loop	Llaç de desplaçament	P2df	Model codominant
DNA	Àcid desoxirribonucleic	PCC	Coefficient de correlació de Pearson
DSB	Trencament de doble cadena	PCR	Reacció en cadena de la polimerasa
DSBR	Reparació dels trencaments de doble cadena	Ptrend	Model additiu
E6TP1	E6-targeted protein 1	RAD	Gens sensibles a la radiació
ER	Receptor d'estrogen	ROS	Espècies reactives d'oxigen
FA	Anèmia de Fanconi	RPA-1	Proteïna de replicació A1
FBS	Sèrum fetal boví	S22	Residu serina222
GWAS	Anàlisis genòmic global	SCCs	Carcinoma cel·lular esquamós
HATs	Histona acetiltransferasa	SCEs	Intercanvi catenari de cromàtides germanes
HD	Domini ric en helix	SDSA	Síntesi dependent d'unió a cadena
HDACs	Histona deacetiltransferasa	SNPs	Vairants polimòrfiques d'un sol nucleòtid
HIS3	Gen informador histidina	SSA	Reparació per unió de cadena senzilla
HJ	Holliday Junction	SSB	Trencaments de cadena senzilla
HLH	Helix-bucle-helix	ssDNA	Cadena senzilla de DNA
HNSCCs	Carcinomes cel·lulars de cap i coll	TLS	Síntesi per translesió
HPV16	Papilomavirus humà tipus 16	TRP	Triptòfan
HPVs	Papilomavirus Humà d'alt risc	UV	Llum ultraviolada
HR	Recombinació homòloga	WB	Western Blot
HRP	Horseradish	wHR	Hazard ratio per pesos
ICL	Entrecruament entre cadenes	WT	Wild type
IF	Immunofluorescència	Y2H	Doble híbrid



RESUM

RESUM

Per aprofundir en les causes genètiques de l'anèmia de Fanconi (FA) i la susceptibilitat al càncer de mama (BrCa), així com en els mecanismes moleculars de reparació del dany al DNA per part de la via de senyalització FA/BrCa, s'ha dut a terme un cribatge massiu d'interaccions proteïna-proteïna per 34 components involucrats en aquesta via. Aquest estudi ha identificat 25 noves interaccions d'alta fiabilitat, la majoria de les quals estan involucrades en la regulació del cicle cel·lular o la resposta al dany al DNA. Algunes d'aquestes interaccions han estat validades mitjançant estudis de co-immunoprecipitació endògena i sobreexpressió en cèl·lules de mamífer. En aquesta tesi doctoral hem caracteritzat la nova interacció entre FANCN/PALB2 i *MORF4L1*/MRG15. S'han realitzat estudis bioquímics i funcionals amb la finalitat de caracteritzar-la tan molecularment com funcionalment en cèl·lules d'humans, de ratolí i *Caenorhabditis elegans*. Els resultats obtinguts ens permeten dibuixar un possible mòdul funcional entre BRCA2, PALB2, RAD51 i RPA1 que suggereixen una implicació de MRG15 en la reparació dels trencaments de doble cadena (DSB) en el DNA. Els nostres resultats no mostren alteracions patogèniques de *MORF4L1*/MRG15 en els pacients FA amb mutació desconeguda. Pel que fa a l'estudi de dos variants genètiques comunes en el locus *MORF4L1*, tampoc s'observa una associació significativa amb el risc a càncer de mama entre els portadors de mutació *BRCA1* i *BRCA2*; tot i que s'observa una tendència entre els portadors de mutacions *BRCA2*. És per aquest motiu, que serà necessari un anàlisi amb sèries de portadors més grans.



INTRODUCCIÓ

1 Anèmia de Fanconi

1.1 Generalitats

FA va ser descrita per primera vegada al 1927 pel pediatra suís Guido Fanconi a rel d'una família amb tres fills que presentaven pancitopènia, estatura baixa, hipogonadisme i pigmentació anormal a la pell [1]. Es tracta d'una malaltia genètica rara, amb una prevalença estimada de 1-5 per cada milió d'habitants [2]. Es caracteritza per una disfunció al moll de l'ós, defectes congènits en el desenvolupament, anormalitats en els cromosomes i una predisposició a desenvolupar càncer. El càncers més freqüents que desenvolupen els pacients FA són del tipus hematopoètics i carcinomes de cèl·lules escamoses de cap i coll [2].

Des del punt de vista genètic, aquesta malaltia és altament heterogènia. Fins l'actualitat, després dels exhaustius estudis de complementació genètics, s'han descrit 15 grups de complementació diferents [3]. En els propers anys és possible que aquest nombre es vegi incrementat ja que resten pacients FA sense cap grup de complementació assignat i on s'han descartat tots els 15 grups coneguts fins ara. El producte d'aquests gens, constitueixen una xarxa comuna d'ubiquitinació-fosforilació anomenada **via de senyalització de FA** [4]. Aquesta via de senyalització coopera amb altres proteïnes involucrades en la reparació del DNA i el control del cicle cel·lular per la reparació de les lesions produïdes per entrecreuaments entre cadenes (ICLs), amb la finalitat de mantenir la integritat genòmica [4].

En aquest treball, pretenem aprofundir en aquests mecanismes moleculars on es troben involucrats el conjunt d'aquest gens i entendre com cooperen entre ells en els processos de reparació del DNA i la senyalització del dany al DNA, així com descobrir noves proteïnes involucrades en aquesta via de senyalització.

Les cèl·lules derivades dels pacients FA mostren hipersensibilitat als agents de DNA-crosslinking, tals com la mitomicina C (MMC) o cisplatí. Aquests agents provoquen ICLs, que al no ser reparats correctament causen un alt nivell d'aberracions cromosòmiques, incloent trencaments cromosòmics i la formació dels característics cromosomes radials (**Figura 1**) [4]. La sensibilitat extrema dels pacients FA a ICLs prohibeix rotundament el tractament dels càncers mitjançant qualsevol fàrmac quimioterapeuic inductor de ICLs tals com la MMC.

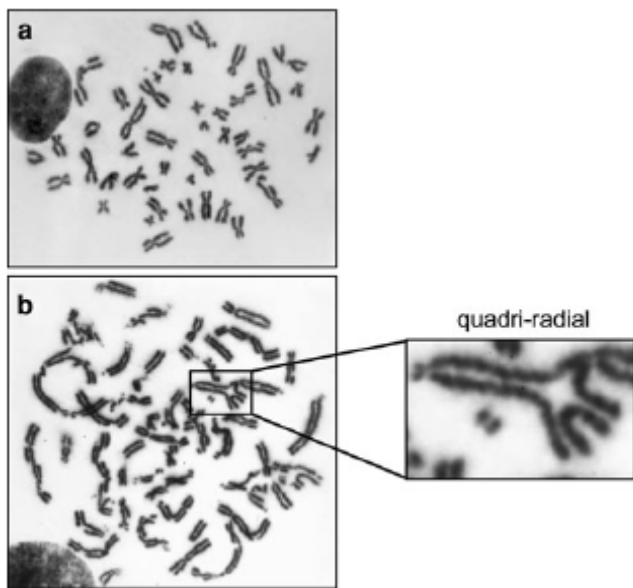


Figura 1: Anàlisi cariotípic de cèl·lules derivades dels pacients que pateixen anèmia de Fanconi (FA). (a) Abans i (b) després de tractament amb mitomicina C (MMC). On s'observa que la MMC produeix aberracions cromosòmiques tals com trencaments cromatídics i cromosomes quadri-radials. Aquests defectes observats, s'utilitzen de manera rutinària en el diagnòstic de pacients FA. Adaptada de [4].

Una altra característica de les cèl·lules FA és que s'acumulen en fase G_2/M del cicle cel·lular en resposta a tractaments amb agents inductors de ICLs. Aquestes observacions suggereixen que les proteïnes que formen part de la ruta FA podrien estar involucrades en la resposta cel·lular al dany induït per ICLs [5]. Aquestes característiques s'han utilitzat rutinàriament pel diagnòstic clínic dels pacients FA. Aquest diagnòstic comporta l'anàlisi citogenètic de limfòcits dels pacients tractats amb agent inductor d'enllaços ICLs al DNA tals com la MMC, el cisplatí o el diepoxibutà (DEB) en el conegut com a test del DEB, com es mostra a la (**Figura 1**). El conjunt d'aquests descobriments, suggereixen que una reparació ineficient de ICL pot ser la causa dels fenotips clínics i cel·lulars associats amb FA.

1.2 Genètica

FA és una malaltia autosòmica per tots els gens excepte per *FANCB* [6] que es troba localitzat al cromosoma X. En conseqüència, la proporció de pacients entre homes i dones és de 3:1, sent la incidència a la població general de 1 a 5 naixements afectats per cada milió d'habitants [2]. Cal destacar que en algunes ètnies aquesta incidència està considerablement augmentada degut a efectes

fundadors: als sudafricans [7], als jueus asquenazites [8] i als gitanos, sent aquesta ètnia la posseïdora de la freqüència de portadors FA més alta del món (1/64 a 1/70) [9]. Com es mostra a la (**Taula 1**), les mutacions en *FANCA*, *FANCG* i *FANCC* conjuntament són els causants de la majoria d'afectats de pacients FA [10].

Taula 1. Gens que juguen un paper important en la via de senyalització de FA. Taula modificada de [4].

Gene	Unique mutations (n = 706) (%)	Total mutations (n = 2,002) (%)	Chromosomal location	Molecular weight (kDa)	Required for FancD2 mono-Ub ⁷
<i>FANCA</i>	60.9	57.0	16q24.3	160	Yes
<i>FANCB</i>	2.0	0.9	Xq22.31	95	Yes
<i>FANCC</i>	7.6	14.4	9q22.3	63	Yes
<i>FANCD1 (BRCA2)</i>	5.0	2.8	13q12-13	380	No
<i>FANCD2</i>	4.7	3.9	3p25.3	155	-
<i>FANCE</i>	3.5	2.3	6p21-22	60	Yes
<i>FANCF</i>	2.0	2.0	11p15	42	Yes
<i>FANCG</i>	6.9	11.2	9p13	68	Yes
<i>FANCI</i>	2.8	1.7	15q25-26	140	Yes
<i>FANCJ (BACH1/Brip1)</i>	1.7	2.4	17q22-24	140	No
<i>FANCL</i>	0.4	0.2	2p16.1	43	Yes
<i>FANCM (Hef)</i>	0.3	0.2	14q21.3	250	Yes
<i>FANCN (PALB2)</i>	2.1	0.8	16p12	140	No
<i>FANCO (Rad51C)</i>	-	-	17q25.1	42	No
<i>FANCP (SLX4)</i>	-	-	16p13.3	200	No
<i>FAAP100</i>	-	-	17q25.1	100	Yes
<i>FAAP24</i>	-	-	19q13.11	24	Yes
<i>FANI</i>	-	-	15q13.2-q13.3	60	No

1.3 Via de senyalització FA/BrCa

Fins ara, s'han descrit mutacions en 15 gens FA (*FANC*): *FANCA*, *FANCB*, *FANCC*, *FANCD1/BRCA2*, *FANCD2*, *FANCE*, *FANCF*, *FANCG*, *FANCI*, *FANCJ/BRIP1*, *FANCL*, *FANCM*, *FANCN/PALB2*, *FANCO/RAD51C* i *FANCP/SLX4* [11]. Les proteïnes codificades per gens FA i/o gens de susceptibilitat a BrCa, cooperen en una mateixa via de reparació del dany al DNA [12], anomenada **via de senyalització FA/BrCa**. Les proteïnes FA, funcionen de manera lineal en la via de reparació al dany al DNA. Les primeres proteïnes FA, són activades en resposta al dany al DNA o sota les senyals de replicació, conduint la monoubiquitinació de FANCD2 [12].

Aquestes 15 proteïnes descrites, es divideixen en tres grups funcionals en el procés de reparació al dany al DNA sota la senyalització de les quinases *ataxia telangiectasia mutated* (ATM) i *ataxia telangiectasia and Rad3 related* (ATR).

Grup I: Complex central de FA

El grup I està constituït per 10 proteïnes, 8 de les quals s'han trobat mutacions en pacients: **FANCA, B, C, E, F, G, L i M**. Les altres dos proteïnes del grup I són les proteïnes associades a FA: **FAAP100 i FAAP24** [13]. La nomenclatura d'aquestes proteïnes és deguda a que no s'han trobat pacients FA amb mutacions en cap d'aquestes proteïnes, encara que la seva depleció també provoca fenotip Fanconi. Totes elles formen el denominat **complex central (core complex)** i actuen com a lligasa d'ubiquitina E3 per monoubiquitinar les proteïnes FA del segon complex en resposta a dany al DNA. Aquest segon complex és un heterodímer format per les proteïnes FANCD2 i FANCI (dímer ID). Si existeix alguna proteïna del *core complex* mutada no és produïda aquesta modificació post-traducciona en FANCD2 ni en FANCI. Aquesta modificació és per tant, fonamental en el procés de reparació del DNA, encara que és pròpiament FANCL la que té l'activitat catalítica E3 lligasa del complex [6]. El fet que no tots els pacients FA del grup central tinguin el mateix fenotip clínic, dóna suport a la hipòtesi de múltiples funcions de les proteïnes del complex a part de la de monoubiquitinar FANCD2/FANCI [1]. S'ha observat que aquest complex, interacciona amb el DNA a través de FANCM i FAAP24, sent les úniques proteïnes del complex amb capacitat d'unió al DNA [14]. Aquestes, permeten l'ancoratge del *core complex* al lloc de dany del DNA, d'aquesta manera pot tenir lloc la monoubiquitinació de FANCD2, la consegüent reparació i el correcte processament del DNA. FANCM té dominis helicasa i nucleasa tot i que la funcionalitat d'ambdós dominis no ha estat mai verificada; de fet, no s'ha detectat activitat endonucleasa per a cap de les proteïnes del complex central. FANCM es considera paràleg de XPF perquè són les dues úniques proteïnes conegudes en humans amb dominis en tàndem helicasa – nucleasa en la seva estructura i se suposa que deriven d'un ancestre comú en funcions de reparació del DNA, la proteïna Hef d'arqueobacteris. La proteïna Hef d'arqueobacteris funciona en forma homodimèrica per resoldre les forquilles de replicació bloquejades [15]. Anàlisis detallats de la seqüència de FANCM han conclòs que aquesta és incapaç de desenvolupar activitat endonucleasa des d'eucariotes inferiors a mamífers de manera que FANCM no seria la endonucleasa responsable de resoldre les forquilles de replicació bloquejades i hauria adquirit noves funcions. L'activitat helicasa de FANCM no s'ha pogut comprovar mai *in vitro* tot i que conserva activitat translocasa de DNA de manera que és capaç de translocar el complex central al DNA de manera dependent a ATP facilitant els següents passos per a la reparació juntament amb FAAP24 [16]. D'aquesta manera, es suggereix una funció de control del processament i estabilització de la forquilla de replicació bloquejada [17] per a

FANCM. FANCM es fosforila per la quinasa 3 relacionada amb ATR i contribueix a l'activació de tota la via FA/BrCa [18].

Algunes de les proteïnes del complex central de FA són hiperfosforilades en resposta a dany al DNA a través de les quinases de control al dany en fase replicativa del DNA ATR i la seva quinasa 1 de punt de control del cicle cel·lular Chk1. En destaquen FANCA,-M,-E i -G [19]. Mitjançant aquestes fosforilacions, ATR controlaria l'activitat del complex en resposta al dany al DNA, permeten l'activació de la via de senyalització FA/BrCa, tal i com s'observa a la **Figura 2** en els punts 2, 3 i 4.

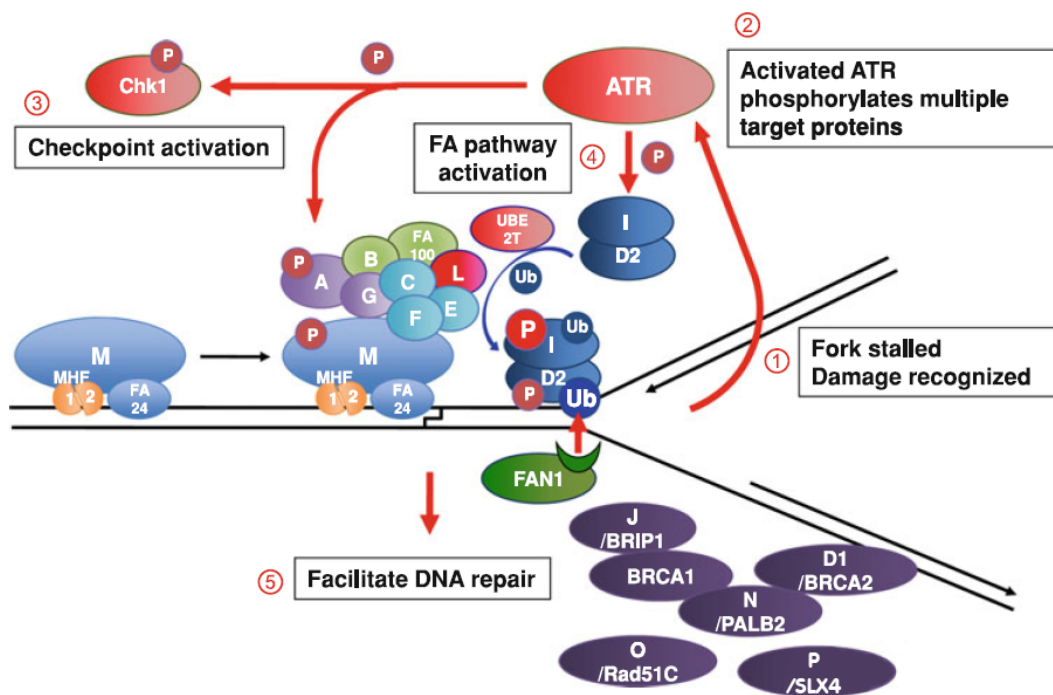


Figura 2. Esquema de l'activació de la via de senyalització de FA/BrCa. (1) La forquilla de replicació és bloquejada sota estrès replicatiu induït per entrecreuaments entre cadenes (ICLs). Es reconeix el dany al DNA. **(2)** ATR es activa i fosforila múltiples proteïnes diana incloent Chk1, FANCI entre d'altres. **(3)** Es desencadena l'activació del punt de control del cicle cel·lular via fosforilació de Chk1. **(4)** El complex FANCD2-FANCI és monoubiquitinat, seguit d'una fosforilació de FANCI i s'uneix a la cromatina. **(5)** Té lloc la reparació del DNA a través de mecanismes que involucren el reclutament de proteïnes com FAN1 i el grup 3. Imatge modificada de [4].

Grup II: Complex FANCD2 i FANCI

El segon grup de proteïnes està per tant format per **FANCD2 i FANCI** que interaccionen entre elles constituint el denominat **complex ID**. Ambdues proteïnes són paràlogues i coexisteixen en varies espècies sent de les poques proteïnes FA que tenen homòlegs en espècies que no són vertebrats [20]. La monoubiquitinació de FANCD2 i FANCI és interdependent de manera que sense una de les dues l'altre no és monoubiquitinada, sent els gens claus en la via FA/BrCa per connectar les proteïnes del primer grup amb les del tercer grup [12] (**Figura 2** punt 4). La monoubiquitinació de FANCD2 al residu K561 és clau per la seva localització a la cromatina [21]. La importància d'aquesta localització a la cromatina és vital per a la reparació dels ICLs ja que la proteïna FANCD2 mutant en el residu K561 és incapaç de corregir la hipersensibilitat d'una línia cel·lular deficient en FANCD2 a agents inductors de ICLs, mentre que la proteïna intacte sí que ho és [22]. Així doncs, la ubiquitinació és un mecanisme per dirigir eficientment el complex ID a la cromatina i als foci nuclears (acumulació de proteïnes al lloc de dany) on té lloc la reparació del DNA. Aquesta localització no només depèn del grup central de proteïnes FA sinó que també hi intervenen altres proteïnes relacionades amb la via com BRCA1 [23], ATR, responsable de la fosforilació del complex ID i activada com a resposta a les forquilles de replicació bloquejades [24], i la forma fosforilada de la histona H2AX, γ H2AX [25]. La fosforilació de la histona H2AX és un mecanisme clau per a la senyalització del dany al DNA, principalment de DSBs i ICLs, i el subseqüent reclutament de proteïnes de reparació [26]. Línies cel·lulars deficientes en γ H2AX són hipersensibles a MMC mostrant-se incapaces de reclutar el complex ID a la cromatina tot i ser capaces de monoubiquitinar FANCD2. Aquest fet demostra la importància de la fosforilació de la histona H2AX per la correcta localització del complex en foci i per dirigir la maquinària de reparació al lloc de dany [25].

El fenotip clínic de pacients FA amb mutacions en FANCD2 és més sever que el de pacients FA del complex central, confirmant la hipòtesi que deficiències en proteïnes del final de la via són més severes que no pas del principi. Aquesta observació suggereix funcions crítiques per a FANCD2 independents de la via [27]. A més a més, les mutacions de pacients FANCD2 identificades són hipomòrfiques, de manera que es mantenen nivells basals de proteïna amb capacitat de ser monoubiquitinada [28]. El fet que no existeixin pacients FA totalment deficientes per FANCD2 indica la importància de la proteïna durant el desenvolupament i es demostra que la inactivació completa de FANCD2 és letal. Per contra, els pacients del grup central de FA són més freqüents i a vegades presenten mutacions de pèrdua d'expressió suggerint precindibilitat durant el desenvolupament. El cas més

conegut és el de pacients del grup de complementació A amb un ampli ventall de mutacions a la proteïna FANCA, el grup FA més freqüent a nivell mundial [29]. Totes aquestes observacions ens porten doncs a concloure noves funcions per a FANCD2 independents de la seva monoubiquitinació. En destacarem la seva capacitat per contribuir en establir el punt de control en fase replicativa del cicle cel·lular després de dany al DNA. Els punts de control de diverses fases del cicle cel·lular són activables en resposta al dany i donen temps a la cèl·lula per reparar-lo. En el cas del punt de control en que intervé FANCD2 també ajuda a prevenir el col·lapse de les forquilles de replicació i evita lesions més greus com ara DSBs i la consegüent inestabilitat genòmica. En el punt de control de fase S del cicle cel·lular, la proteïna ATM, una de les quinases de fosforilació més importants en resposta a dany al DNA, fosforila FANCD2 al residu serina 222 (S222) en resposta a radiació ionitzant (IR). Juntament amb la fosforilació d'altres substrats, ATM coordina l'establiment del punt de control de fase S en resposta a IR [30]. Així doncs, el complex ID desenvolupa com a mínim dues funcions controlades per les quinases de resposta al dany ATR i ATM. La monoubiquitinació i consegüent reparació depèn de la senyalització per ATR i el complex central de FA, mentre que l'establiment del punt de control de fase S depèn de la senyalització per ATM [31].

Què fa el complex ID després del seu reclutament als llocs de dany encara és incert. Fins al moment, s'han proposat varies vies de senyalització que involucra proteïnes com BRCA2, on FANCD2 recluta BRCA2 als llocs de dany per promoure la recombinació homòloga (HR).

Grup III: proteïnes FA relacionades amb càncer

El **tercer** i últim **grup** de proteïnes de la via FA/BrCa està format per **FANCD1/BRCA2**, **FANCN/PALB2**, **FANCI/BRIP1**, **FANCO/RAD51C** i **FANCP/SLX4**. Contràriament als altres dos grups de proteïnes, deficiències en proteïnes d'aquest tercer grup no impedeixen la monoubiquitinació del complex ID en resposta a dany al DNA indicant que aquestes proteïnes funcionen *downstream* del complex ID i/o en vies paral·leles [12] (**Figura 2**, punt 5). Una característica important d'aquest tercer grup és la connexió que presenten amb la susceptibilitat del càncer de mama. Mutacions germinals bial·lèliques de pèrdua de funció d'aquestes proteïnes provoquen FA, mentre que mutacions germinals monoal·lèliques de pèrdua de funció predisposen a desenvolupar càncer de mama i ovari [32-34] suggerint una via comuna d'aquests gens supressors de tumors en la reparació del DNA. FANCP/SLX4 és l'excepció i és l'única proteïna del grup per al qual no han estat descrita aquesta associació a càncer familiar de mama i ovari

[35]. Totes les proteïnes del tercer grup desenvolupen funcions en el mecanisme de reparació per HR; FANCD1/BRCA2, la primera identificada d'aquest tercer grup [36] i FANCO/RAD51C [37] són cofactors de la proteïna recombinasa essencial per HR, RAD51. FANCN/PALB2 interacciona amb BRCA2 i en regula la seva localització a la cromatina [38]. FANCI/BRIP1 va ser identificada com a helicasa interactora de BRCA1, un altre dels gens de susceptibilitat a càncer de mama familiar involucrat en la reparació per HR [39, 40], FANCP/SLX4, identificat recentment com a nou gen FA [41], és responsable de resoldre les unions de Holliday produïdes durant el procés de HR [42] a més d'interaccionar amb FANCD2 monoubiquitinat, ajudant a la resolució de les estructures generades per reparar ICLs [43]. Tots aquests resultats indicarien que aquest tercer grup podria funcionar com una xarxa interconnectada amb les proteïnes de reparació per HR de manera parcial o totalment independent a la resta de gens FA del grup central i del complex ID [4]. A més, també reflexa la connexió de FA amb el càncer de mama i suggereix que FA podria ser un model atractiu per la identificació de més gens de susceptibilitat a BrCa.

La identificació de noves proteïnes causants de FA en pacients en els quals s'han descartat tots els 15 grups de complementació descrits fins ara de ben segur que contribuiran a aprofundir el coneixement de la via i a clarificar-ne millor les seves funcions.

2 Reparació del DNA

La preservació de la integritat genòmica és essencial pel funcionament i la supervivència de tots els organismes vius. La reparació del DNA és el procés a través del qual les cèl·lules són capaces d'identificar i corregir el dany produït a les pròpies molècules de DNA. L'objectiu de la reparació és preservar íntegre el genoma per al correcte i normal funcionament de la cèl·lula i de la seva descendència [44]. Es postula que en humans, el dany al DNA està involucrat en diverses malalties, envelliment [10] i carcinogènesi [45]. Aquest dany pot ser produït per diversos factors: **factors endògens**, incloent la pròpia activitat metabòlica de la cèl·lula o per errors durant el procés de replicació del DNA, o bé per **factors exògens** com ara l'exposició a llum ultraviolada (UV) o la IR entre d'altres.

Per combatre totes aquestes agressions, les cèl·lules han desenvolupat processos de resposta coordinats i altament regulats per assegurar que el material genètic sigui preservat, duplicat i segregat correctament a la descendència. Aquests processos inclouen: la detecció del dany i el bloqueig de les forquilles de replicació, l'establiment de punts de control o parada de cicle cel·lular per tal de donar temps als mecanismes de reparació a corregir el dany i l'activació de mecanismes transcripcionals adaptatius [46]. Si el dany és sever la cèl·lula desencadena mecanismes d'apoptosi o mort cel·lular [47].

Els mecanismes bàsics de reparació de dany al DNA estan molt conservats evolutivament des d'eucariotes inferiors com *Sacharomyces*, fins a eucariotes superiors com mamífers, de manera que podem identificar proteïnes homòlogues en molts casos [48]. Aquest fet indica la importància de desenvolupar mecanismes eficaços per a la preservació del genoma i per la supervivència cel·lular. En mamífers superiors aquests mecanismes de reparació del dany han anat evolucionant cap a una major especialització, diversificació i complexitat, per tal d'assolir una reparació més eficient de les lesions produïdes al DNA.

2.1 Mecanismes de reparació del dany al DNA

Els DSB són considerats una de les formes citotòxiques més importants de dany al DNA [49]. Aquests es generen accidentalment de manera endògena durant la replicació del DNA o exògenament com a resultat de l'exposició a agents inductors de dany tals com la IR entre d'altres. Deficiències en la reparació dels DSB poden

conduir a mutacions, reorganitzacions cromosòmiques, inestabilitat genòmica i la inducció de tumors [50].

L'acció coordinada dels diferents components de les vies de reparació de DSB, juga un paper crític en l'habilitat de les cèl·lules a l'hora de reparar les lesions del DNA d'una manera acurada. L'elecció d'un o altre mecanisme de reparació és clau per al manteniment de la integritat de la cèl·lula i evitar la tumorigènesis [51].

Els diferents mecanismes de reparació dels DSB en eucariotes són: la reparació per HR [52], la reparació per unió d'extrems no homòlegs (NHEJ) [53] i la reparació per unió de cadena senzilla (SSA) [54]. Així doncs, la reparació per HR únicament es pot dur a terme durant la fase S i G₂ ja que utilitza la cromàtide germana coma còpia fidedigne de la informació danyada. En canvi, la reparació per NHEJ utilitza la unió de cues no homòlogues per la reparació. Aquesta és tendent a error, però disponible al llarg de tot el cicle cel·lular [51]. Per tant, la decisió d'escollir una o altre via de reparació ha de ser adequadament regulada. La via de senyalització de FA juga un paper fonamental en la coordinació de la reparació dels DSB [55].

2.2 Reparació per recombinació homòloga

La reparació per HR comprèn una sèrie de rutes interrelacionades que funcionen amb l'objectiu de reparar els DSBs i els ICL. Es pot definir en termes generals com a cerca de la homologia i invasió de la cadena senzilla de DNA [56]. La HR és un mecanisme altament conservat amb una alta fidelitat en la reparació del dany al DNA, imprescindible pel manteniment de l'estabilitat genòmica. La HR és necessària per la correcta segregació dels cromosomes durant la meiosi en el procés d'intercanvi catenari de les cromàtides germanes (SCEs) i constitueix una via clau per la reparació de DSB i ICL [57]. A més, juga un paper clau en la correcta duplicació del genoma mitjançant un suport crític del DNA en la replicació i el manteniment dels telòmers.

Els passos principals de la reparació per HR són: reconeixement de la homologia i intercanvi catenari [58]. Així doncs, quan es produeix un DSB es processen els extrems generats pel trencament mitjançant l'acció de nucleases. Aquest processament dels DSBs és necessari pels passos següents de la reparació i dona lloc a una cadena senzilla de DNA en extrem 3' (ssDNA). Aquest extrem és capaç d'envair el DNA dúplex que conté la seqüència homòloga [59] (**Figura 3**).

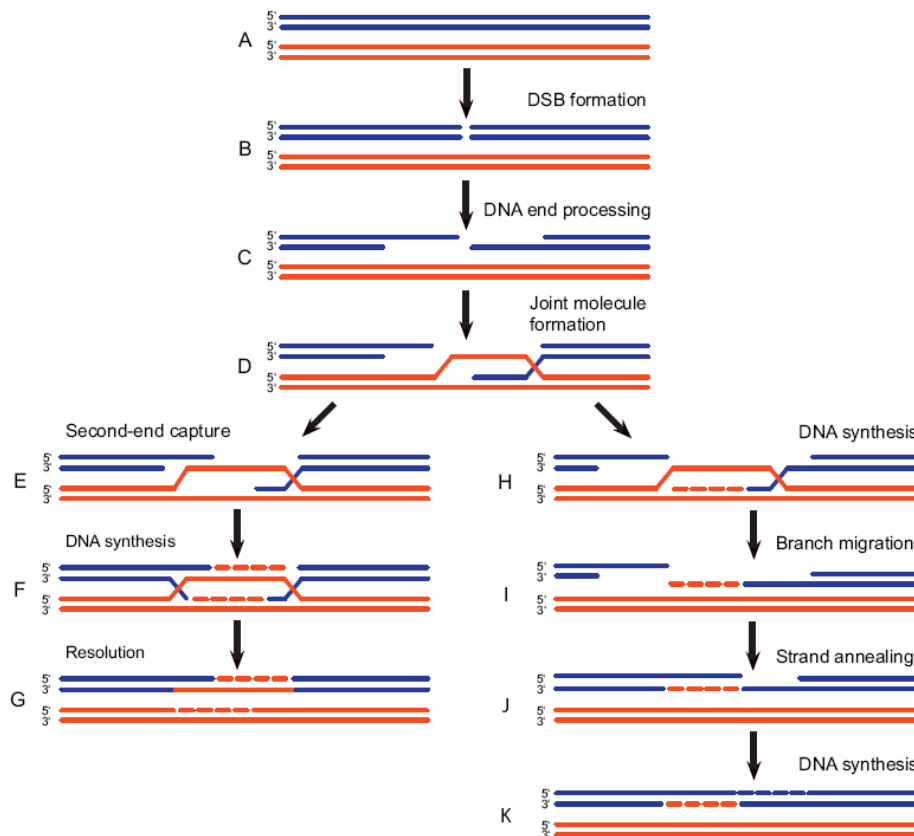


Figura 3. Esquema de la reparació de DSB per HR. (A) Cromàtides germanes homòlogues, indicades pel parell de línies blaves i el parell de línies vermelles. Aquest esquema es focalitza en els esdeveniments que succeeixen en el DNA durant la recombinació, no està representat les proteïnes que hi participen (B). Després del trencament de doble cadena (DSB) els extrems són processats formant una cua de cadena senzilla en 3' (C). (D) Les proteïnes recombinases s'uneixen en un nucleofilament proteic a la ssDNA, regulant la invasió a la cadena homòloga i per tant el procés de reparació per recombinació homòloga (HR), que es pot dur a terme o bé per la via de (E), reparació de trencaments de doble cadena (DSBR) on les molècules recombinants són unides via *holiday junction* (HJ) (F). (G) Resolució de les HJ mitjançant endonucleases específiques alliberant el dúplex de DNA reparat. O bé per la via de reparació per HR és mitjançant la síntesi depenent d'unió a cadena (SDSA) (H). Quan comença la síntesi de DNA es dissol la unió de les molècules (I) i la síntesi de nou de la cadena s'uneix amb el processament del segon extrem del DNA (J). (K) Es completa la síntesi del DNA i es repara. Adaptada de [59].

Aquest extrem cohesiu en 3' de la cadena senzilla de DNA és ràpidament unit per la proteïna de replicació A (RPA), la qual és necessària pel reclutament de les proteïnes de la HR tals com RAD51 [60]. RAD51 és homòleg de la proteïna RecA de bacteris i té activitat ATPasa depenent de DNA. D'aquesta manera, RAD51 és capaç de formar els nucleofilaments amb el DNA i reemplaçar RPA (**Figura 4**). Un cop format el filament de RAD51-ssDNA es realitza la cerca d'homologia i la invasió de la cadena de DNA, promovent un reordenament específic.

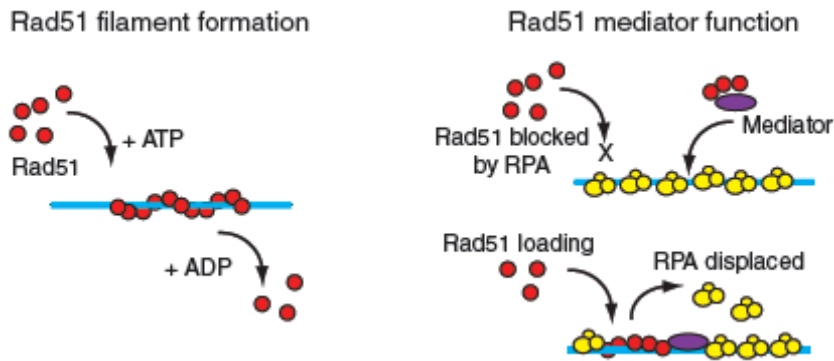


Figura 4. Nucleofilament de RAD51. El principi de la recombinació homòloga (HR) és la cerca de la seqüència homòloga de DNA i la invasió de la cadena. En eucariotes, aquesta reacció és duta a terme mitjançant RAD51 el qual té activitat catalítica per la recombinació mitjançant la seva polimerització al voltant de ssDNA formant un nucleofilament. L'ATP és necessari per aquesta activitat. Aquests factors (ATP-ADP) contribueixen a la unió i desunió del filament, els quals són necessaris per la regulació de la HR. Quan la ssDNA es coberta per RPA, RAD51 no hi pot accedir. En aquests cas, és necessari un mediador que permeti a RAD51 la polimerització al llarg de la cadena de ssDNA, amb la conseqüent dissociació de RPA. Aquesta estabilització de RAD51 és la que més tard, potenciarà la capacitat per la HR. Adaptada de [61].

En cèl·lules de mamífer, RAD51 és reclutat als DSBs pel producte del gen de susceptibilitat a càncer de mama *BRCA2* [62]. *BRCA2* s'uneix a RAD51 a través d'interaccions amb les sèries conservades de vuit repeticions anomenades motius BRC [38]. A través de les repeticions BRC, *BRCA2* estimula la formació del nucleofilament de RAD51 al ssDNA amb la presència d'ATP [63, 64], tal i com es mostra a la **Figura 5**. Mentre que *BRCA2* s'uneix directament a ssDNA [65].

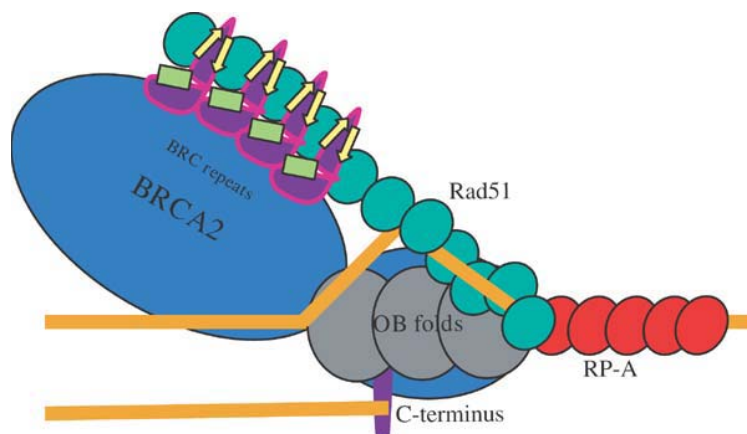


Figura 5. Interacció entre BRCA2 i RAD51. RAD51 interacciona amb els motius de repetició de BRCA2 anomenats BRC. Aquest model proposa que les repeticions BRC proporcionen una línia d'unió pels monòmers de RAD51 i que l'extrem C-terminal de BRCA2 s'uneix al ssDNA proporcionant una manera de desplaçar RPA, permetent la unió ordenada del filament de RAD51. Quan *BRCA2* és absent afecta a l'inici de la recombinació homòloga i en la conseqüent reparació del dany al DNA. Adaptada de [66].

Un cop RAD51 és reclutat als DSB, es catalitza l'intercanvi catenari durant el qual ssDNA envaeix el dúplex homòleg de DNA formant un llaç de desplaçament (D-loop) que pot ser resolt de múltiples maneres. En cèl·lules mitòtiques, es produeix el que s'anomena síntesi-depenent d'unió de cadena, on l'extrem 3' del D-loop és estès per la síntesi de reparació. Seguidament la cadena de DNA de nova síntesi es dissocia per unir-se a l'altre extrem del DNA i completar la reacció. Si el segon extrem de DNA és "capturat" pel D-loop, aleshores es produeix el que en anglès s'anomena una estructura en doble *Holliday junction* (HJ) que pot ser resolta per diferents proteïnes com ara GEN1 i SLX1/SLX4 [67]. Com a resultat de la resolució de la unió de HJ es poden generar productes d'entrecruament o sense entre les cadenes de DNA. Mentre que els entrecruaments juguen un paper important per facilitar la segregació dels cromosomes durant la recombinació meiótica [68], els entrecruaments que transcorren durant la fase de recombinació mitòtica poden tenir efectes deleteris molt greus, tals com la pèrdua d'heterogozitat [52]. Les proteïnes que interrompen els D-loops o dissolen les HJ, són proteïnes protectores de la integritat genòmica i disminueixen el risc de desordenaments cromosòmics [69]. En destaquen les proteïnes síndrome de Bloom.

Existeixen múltiples subvies de reparació per HR, com la reparació de trencaments de doble cadena (DSBR) amb o sense associació als entrecruaments, explicada prèviament, i la síntesi depenent d'unió a cadena (SDSA)[70, 71]. Totes les subvies de la HR comparteixen la primera fase de pre-sinàpsis en el processament dels DSB, la qual finalitza amb la invasió de la cadena 3' i la formació del nucleofilament de RAD51 [56].

Tan les cèl·lules HCC1937 les quals presenten mutacions per *BRCA1*, com la línia cel·lular humana CAPAN-1 provinents de tumor epitelial pancreàtic que presenten una forma truncada de *BRCA2* i la pèrdua d'un al·lel de *BRCA2* [72-74], són defectives per la HR [75, 76]. La qual cosa, indica que aquestes proteïnes juguen un paper important en el procés de reparació per HR.

2.3 Reparació per unió d'extrems no homòlegs

Les proteïnes de la NHEJ van ser inicialment identificades degut al seu requeriment per la resistència a la IR i per la recombinació V(D)J del sistema immune [53]. El mecanisme de reparació per NHEJ implica una re-l·ligació dels extrems del DNA trencats. Aquest procés de l·ligació és tendent a error degut a la pèrdua de bases terminals properes al punt de trencament. A més a més, la NHEJ no es basa en el reconeixement de seqüències llargues per reparar-les, sinó que té la capacitat de

l·ligar els extrems del DNA procedents de DSBs diferents, de manera que el sistema de NHEJ és capaç d'unir extrems de cromosomes no-homòlegs. Aquest tipus de reparació aberrant provoca cromosomes acèntrics i dicèntrics que poden causar problemes a la cèl·lula durant la segregació dels cromosomes a la mitosi. Així doncs, una utilització inapropiada de la reparació per NHEJ pot ser una possible causa de reorganitzacions i translocacions en les cèl·lules [51].

Molecularment, el procés de reparació per NHEJ s'inicia pel primer complex d'aquesta via, l'heterodímer Ku70/80 (Ku) que s'uneix a l'extrem del DNA. En cèl·lules de mamífer, Ku interacciona amb la subunitat catalítica de la proteïna quinasa dependent de DNA (DNA-PKcs) i juntes actuen coordinadament en la sinapsis dels dos extrems de DNA per tal de reparar-lo [77] (**Figura 6**). Els extrems de DNA són units mitjançant el complex lligasa IV/XRCC4 [78]. La unió d'aquests extrems pot conduir a la formació de diferents estructures. Degut al processament dels extrems del DNA previs a la reparació per NHEJ, es poden generar petites delecions i insercions nucleotídiques, de manera que el sistema de reparació per NHEJ és més susceptible d'incorporar errors al DNA que no pas la HR [51].

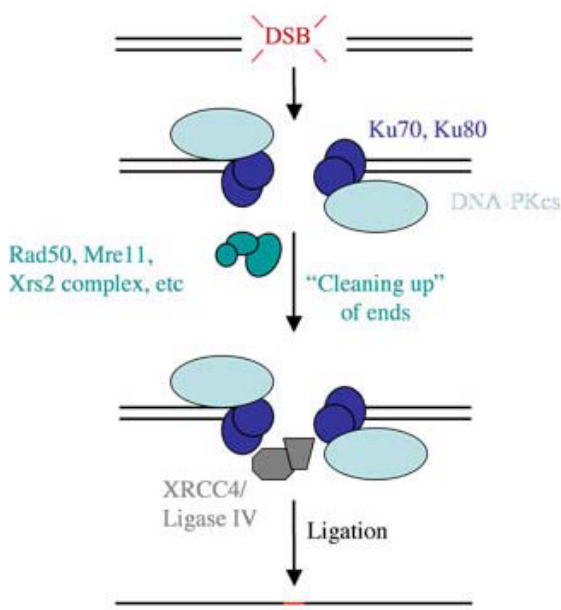


Figura 6. Via de reparació per unió d'extrems no homòlegs (NHEJ). La NHEJ involucra sis proteïnes en una seqüència coordinada per tal d'assegurar la lligació dels extrems del trencament. Es produeix una pèrdua de seqüència de DNA en el lloc de reparació. Adaptada de [79].

2.4 Reparació per unió de cadena senzilla

Una altra via de reparació que involucra la seqüència homòloga però diferent que la HR, és la SSA. Es basa en la unió d'extensions curtes de seqüències homòlogues que flanquegen el lloc de trencament. La reparació per SSA es realitza un cop s'han processat els extrems del DNA generats pel trencament, però únicament pot succeir si la repetició de seqüències es troba en ambdues bandes del DSB. Durant la reparació per SSA, es perd la seqüència de DNA compresa entre les repeticions, ja que busca la complementarietat de la cadena senzilla formada per repeticions (**Figura 7**) i després es du a terme la reacció d'unió on s'uneixen els extrems. Comparat amb la HR, la reparació per SSA és per tant, més mutagènica ja que s'indueixen delecions de seqüències i en conseqüència es perd informació genètica. Les proteïnes identificades que promouen la reparació per SSA en cèl·lules de mamífer i llevat són RAD52, ERCC1 i Rad1/Rad10 (flap endonucleasa) [80-82].

L'elecció d'una o altra via de reparació dels DSB està regulada per diferents factors, incloent la naturalesa d'aquestes lesions i la fase del cicle cel·lular. Molts DSB es presenten durant la replicació del DNA i per la seva reparació és necessària la HR així com la NHEJ la qual dóna lloc a possibles translocacions. Generalment, la fase del cicle cel·lular és el primer determinant en la limitació de la HR, ja que com he comentat anteriorment, la NHEJ transcorre durant tot el cicle cel·lular [83], mentre que la HR únicament transcorre durant la fase S/G₂ del cicle cel·lular, ja que necessita la cromàtide germana que no és present durant la fase G₁.

2.5 Col·laboració entre la HR i NHEJ

Hi ha evidències significatives que demostren que la HR i la NHEJ col·laboren per dur a terme la reparació del DNA i preservar la integritat genòmica. Ambdues, són essencials per la reparació del dany al DNA. S'han fet estudis en mutants senzills de ratolins per múltiples components d'una o altra via, com per exemple de BRCA2 implicat en la HR i XRCC4 implicat en la NHEJ. El resultat ha estat la mort d'aquests ratolins durant l'embriogènesi [84]. Aquest fet confirma la importància d'aquestes dues vies de reparació. Altres evidències de la importància de la col·laboració entre aquestes dues vies, recau en l'anàlisi fet sobre dobles mutants dels components de la HR o la NHEJ. Aquests estudis suggereixen que la pèrdua concomitant d'una proteïna involucrada en la HR i una proteïna involucrada en la NHEJ resulta en un fenotip molt més sever que el que esperaríem en un mutant senzill per una de les dues vies, és a dir, el mutant doble presenta un increment significatiu de la

inestabilitat genòmica [85, 86], així com en un increment dels DSB no reparats, que són mesurats pels foci de γ H2AX, generats fins i tot sense presència d'agents inductors de dany al DNA [86].

La col·laboració entre HR i NHEJ és necessària pel manteniment de la integritat genòmica, ara, la competició entre elles per reparar els DSB és també un fet. En la següent **Figura 7**, es mostra un esquema dels tres mecanismes involucrats en la reparació dels DSB i quins són els passos on els diferents factors competeixen entre ells per la reparació dels DSB. Per exemple, la pèrdua de funcionalitat de factors involucrats en la NHEJ comporta un increment en la reparació per HR i SSA. Per contra, mutants encarregats del processament del DNA per generar un extrem 3' al DNA en el procés inicial de la HR tenen augmentada la NHEJ. Així mateix, trastorns de la formació del filament de RAD51 provoca que els extrems del DNA siguin reparats per SSA.

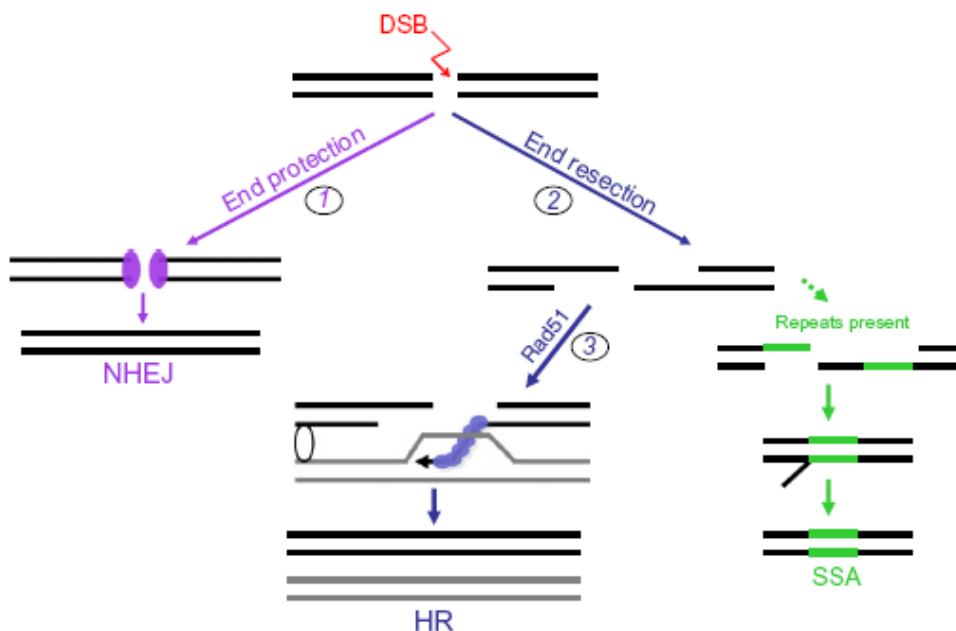


Figura 7. Competició entre les diferents vies de reparació dels DSB. La recombinació homòloga (**HR**) es iniciada en direcció 5' a 3' després del processament dels extrems del DNA, un pas que en anglès l'anomenen *end resection*, en el qual es forma la cua de la cadena de DNA sencilla amb l'extrem 3' on s'hi unirà RAD51. RAD51 formarà els nucleofilaments i permetrà la invasió de la cadena sencilla de DNA en el dúplex homòleg, és a dir, la cromàtide germana per iniciar la síntesi de la reparació. La cadena sintetitzada de nou, és desplaçada per unir l'altre extrem del DNA per tal de completar la reacció de la HR. Quan els trencaments de doble cadena (DSB) i el conseqüent processament succeeixen en seqüències repetitives (línies verdes), aleshores es dur a terme la reparació per unió de cadena sencilla (**SSA**), on la complementarietat de les repeticions de la cadena sencilla poden unir-se, augmentant el nombre de còpies aberrants tot provocant repeticions i delecions. La reparació per unió d'extrem no homòlegs (**NHEJ**) involucra la unió dels extrems del DNA amb una petita o absència presència d'homologia. En aquesta via, l'heterodímer de Ku s'uneix als extrems del DNA protegint-lo del seu processament (*end resection*). Seguidament, són reclutats els factors de processament els quals permeten la formació d'una gran varietat d'estructures per tal d'unir els extrems. Adaptada de [51].

2.6 Entrecreuament entre cadenes

Els ICLs són una lesió altament tòxica que impedeix la transcripció i la replicació mitjançant la inhibició de la separació de les cadenes de DNA. Els agents que indueixen els ICLs van ser i de fet encara ho són, un dels primers utilitzats com a agents quimioterapèutics. No ha estat fins al cap d'uns anys que s'ha sabut com funcionen aquests agents: com la cèl·lula els reconeix i repara els entrecreuaments i finalment en desenvolupa resistència, permeten el recreixement del tumor [11].

La separació de les dos cadenes de la doble hèlix de DNA és essencial pels processos cel·lulars tals com la replicació i la transcripció. Els ICLs són extremadament tòxics per les cèl·lules ja que impedeixen aquesta separació mitjançant reaccions químiques amb les bases de la cadena oposada. La unió covalent com a resultat d'aquestes reaccions és sovint, irreversible. Els entrecreuaments covalents entre bases de la mateixa cadena de DNA, coneguts com a ICL també es veuen augmentats. Aquest dany, pot ser evitat per diferents DNAPolymerases, fent aquesta lesió menys tòxica durant la replicació que els entrecreuaments entre les dos cadenes de DNA.

L'acumulació de ICLs inapropiats, indueix una parada transitòria en fase G₂ del cicle cel·lular, presumiblement fins que la ICL hagi estat reemplaçada [87]. En cèl·lules de pacients FA aquesta aturada és considerablement més llarga ja que es postula que tenen defectes en el mecanisme de reparació [88].

2.7 Els DSB com a pas intermediari de la reparació dels ICL

La reparació dels ICLs és diferent segons les etapes del cicle cel·lular, involucra diferents proteïnes i la formació d'estructures diverses. Així doncs, en les cèl·lules en fase G₁, la reparació per excisió de nucleòtids (NER) permet remoure els ICLs, no obstant, algunes lesions no poden ser evitades d'aquesta manera. Durant la fase S es forma l'estructura anomenada *chicken foot* i el conseqüent col·lapse de les forquilles de replicació, la qual activarà els llocs de control de dany al DNA i la monoubiquitinació de FANCD2/FANCI. Seguidament es produeix la formació dels DSB [89, 90], així com la participació de FANCM durant la fase S tardana i la fase G₂, permeten la regressió de les forquilles per tal d'estabilitzar-les i així permetre que altres proteïnes vagin a reparar-les. Per tant doncs, la participació dels diferents factors de la HR que funcionen específicament en la reparació de ICLs indica que hi pot haver diferències estructurals importants segons el tipus d'intermediaris del DNA durant la reparació [11].

2.8 Reparació del DNA i relació amb FA

Els mecanismes de reparació de ICLs no són del tot clars, són complicats i utilitzen múltiples vies de reparació. La reparació per HR, la reparació per síntesi de translació (TLS), o la reparació NER [91, 92]. Aquests mecanismes de reparació actuen de manera coordinada en diferents passos.

Les cèl·lules dels pacients FA tenen defectes tan en la HR com en TLS [93]. El fracàs en la reparació de ICL i la conseqüent tumorigènesis en individus amb FA, ens indica que els gens *FANC* són essencials per la reparació de ICL. Defectes específics en molts gens de reparació al DNA poden conduir a sensibilitat a ICL, per tant, FA ens serveix com a model per entendre la reparació dels ICL. A més a més, es ben sabut que FA està involucrat en la coordinació de varies vies de reparació, tals com la HR, NER i TLS [94].

Estudis recents indiquen que la inestabilitat genòmica, mort cel·lular i l'alta freqüència de cromosomes radials observada en cèl·lules FA sota tractament amb agents inductors de ICLs, podria ser explicada per una deficiència en l'elecció del sistema de reparació dels DSBs [95]. Aquests estudis expliquen el fenotip FA per deficiències en la reparació dels DSBs i proposen que les proteïnes FA, més que promoure la HR, protegirien el DNA de la reparació inapropiada per NHEJ en fase replicativa del cicle cel·lular. La hipòtesi es veu corroborada en l'observació que línies cel·lulars deficientes en FA milloren el seu fenotip de sensibilitat a MMC amb la inhibició de gens claus de la ruta NHEJ [96]. Aquestes observacions poden portar a desenvolupar nous tractaments per a millorar la simptomatologia clínica de pacients FA malgrat que és necessària una major comprensió del mecanisme d'elecció per part de la via FA en la reparació dels DSBs.

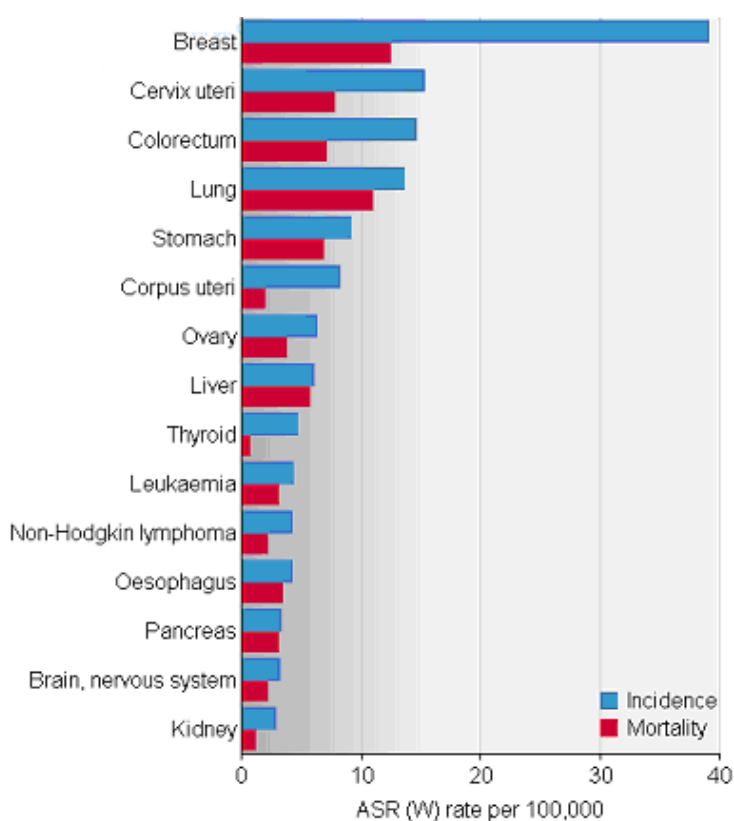
Actualment doncs, es comença a conèixer el funcionament de la via FA en la reparació dels ICLs i com es regula la resposta a forquilles de replicació bloquejades mitjançant la intervenció de nombroses proteïnes susceptibles a ser modificades post-traduccionament.

La identificació de noves proteïnes causants de FA en pacients en els quals s'han descartat tots els 15 grups de complementació descrits fins ara de ben segur que contribuiran a aprofundir el coneixement de la via i a clarificar-ne millor les seves funcions.

3 Càncer de mama

En països occidentals, aproximadament una de cada deu dones desenvolupa càncer de mama, essent el càncer amb més incidència entre les dones i la primera causa de mort per càncer, com mostra la **Taula 2**.

Taula 2. Taula d'incidència i mortalitat entre la població mundial femenina de tots els tipus de càncer. Aquestes dades són un recull del 2008 proporcionades pel Globocan.



La majoria dels casos de càncer de mama són esporàdics tot i que aproximadament un 15% dels casos presenta algun tipus d'agregació familiar [97] (**Figura 8**). Les mutacions germinals en *BRCA1* o *BRCA2* representen entre un 20-40% dels casos d'agregació familiar, però si ens fixem en tots els càncers de mama en general, els que presenten mutacions germinals en *BRCA1* o *BRCA2* són menys d'un 5% [98]. Aproximadament un 80% dels individus amb mutacions a *BRCA1* o *BRCA2* desenvolupen càncer de mama abans dels 70 anys; mentre que aproximadament el 60% de portadors de mutacions *BRCA1* i el 30% en portadors de mutacions *BRCA2* desenvolupen càncer d'ovari en una edat semblant [99, 100]. No obstant, la penetrància varia entre i dins dels portadors de mutacions familiars, segons l'edat d'aparició i segons el tipus de càncer [101-103]. Per altra banda, hi

ha alguns síndromes hereditaris associats amb un increment del risc de càncer de mama causats per mutacions en *TP53*, *STK11*, *PTEN*, *CDH1* o *NF1*. No obstant, més del 50% dels càncers de mama amb agregació familiar romanen inexplicables [104-106].

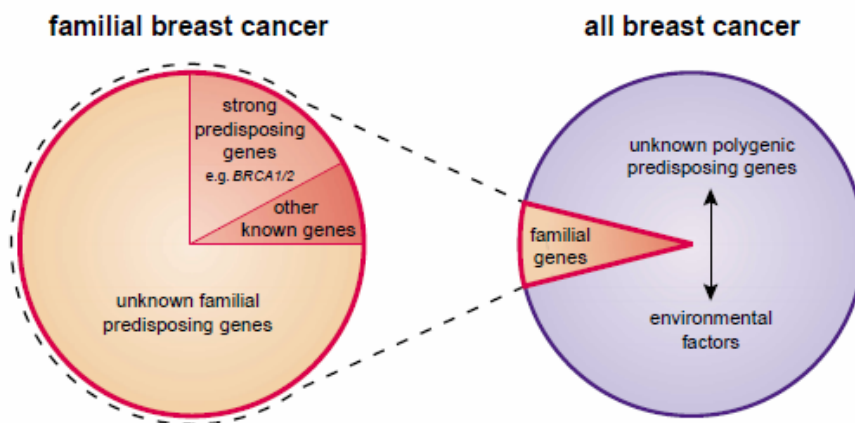


Figura 8. Gens de susceptibilitat al càncer de mama. Casos d’agregació familiar de càncer de mama (esquerra), constitueixen un 15 % del total de tots els càncers de mama (dreta). Els principals gens involucrats en els casos d’agregació familiar de càncer de mama són *BRCA1* i *BRCA2* que expliquen el 20-40% del risc familiar. Més d’un 50% dels càncers de mama amb agregació familiar romanen inexplicables. Moltes de les variants genètiques que contribueixen al risc de desenvolupar càncer de mama esporàdic són encara desconegudes. Adaptada de [107].

3.1 Gens de susceptibilitat al càncer

La última dècada ha estat testimoni de grans avenços en la comprensió de les bases genètiques de les malalties humanes. Podria dir-se, que el major impacte ha estat en l’àrea de la genètica del càncer, on l’explosió de la seqüenciació genòmica i les dades de perfils moleculars, han demostrat la gran complexitat en les neoplàsies humanes [107]. Així per exemple, en una cèl·lula tumoral, dotzenes de gens diferents poden tenir l’estructura o el número de còpies aberrants, i centenars o milers de gens poden ser expressats diferencialment. Així com també va canviar la percepció de la contribució genètica en la susceptibilitat als càncers comuns a partir de la dècada del 1980 on la major evidència va ser demostrada a rel d’individus amb agregació familiar que patien BrCa [107]. El fet que la malaltia tingués una alta prevalença en certes famílies va suggerir que pogués ser deguda a una predisposició de mutacions hereditàries en gens de susceptibilitat al càncer [108-110].

El càncer de mama i ovari són malalties complexes que impliquen factors ambientals i genètics en la seva etiologia. El factor de risc amb més força és el factor d'història familiar de la malaltia, tot i que han estat identificats altres factors, com el factor hormonal i d'estil de vida, que també juguen un paper important en aquestes dues patologies i on molts d'ells són comuns en ambdues [111-119]. Així doncs, les dones amb un familiar de primer grau afectats de càncer de mama tenen un risc estimat de càncer de mama de dues vegades més gran, comparat amb aquelles que no tenen un historial familiar [120]. Els gens amb mutacions que confereixen un alt risc de susceptibilitat a càncer de mama i ovari que han estat identificats fins al moment i que són els més importants en el context del consell genètic són *BRCA1* i *BRCA2*.

3.2 Classificació dels gens de susceptibilitat al càncer de mama

La base genètica de la susceptibilitat al BrCa, com he esmentat anteriorment, ha estat molt estudiada durant les dues últimes dècades. Però ha estat en aquests últims cinc anys quan la comprensió d'aquesta ha canviat dràsticament amb el coneixement de molts gens les mutacions dels quals influeixen en el risc a desenvolupar BrCa. Des del punt de vista de susceptibilitat, existeixen tres classes de gens segons la magnitud de l'efecte i la prevalença de les mutacions en la població [121]. Els gens que anomenem **d'alta penetrància**, són gens les mutacions dels quals confereixen un alt risc de desenvolupar càncer de mama, incrementant entre 10-20 vegades el risc [109], però aquestes mutacions tenen una prevalença baixa en la població general. Aquest gens són els ja esmentats *BRCA1* i *BRCA2* [32, 122, 123]. Els gens que anomenem de **moderada penetrància** són els gens que presenten mutacions poc freqüents en la població general i confereixen un increment del risc relatiu entre 2-4 vegades. Aquests gens serien *ATM* [124], *BRIP1* [125], *CHECK2* [126, 127], *PALB2* [128] i *RAD51C* [37] explicarien $\leq 1\%$ dels casos. La resta dels casos vindria donada per efectes ambientals i/o la combinació de mutacions de **baixa penetrància**. Es tractaria d'al·lels que es troben a la població en una freqüència alta, normalment superior al 5% però que confereixen un increment del risc molt petit, entre 1.2-1.6 vegades. Alguns d'aquests gens són *FGFR2* [33, 129], *LSP1* [33], *MAP3K1* [33], *TGFB1* [130], *TOX3* [33, 131].

Els casos d'agregació familiar de BrCa que no són deguts a mutacions en *BRCA1* ni *BRCA2* i que originalment eren atribuïts a un hipotètic *BRCA3*, és suggereix que poden ser deguts a una combinació d'efectes de mutacions en gens de baixa penetrància i gens de moderada penetrància amb els factors ambientals.

Diferents aproximacions genètiques i/o moleculars han donat lloc a la identificació d'aquests tres tipus de gens.

3.2.1 Gens de susceptibilitat al càncer de mama d'alta penetrància

Els gens les mutacions dels quals confereixen un alt risc en el BrCa van ser descoberts per anàlisis de lligament [132]. Aquests gens són *BRCA1* i *BRCA2* i representen un 15% dels casos d'agregació familiar de BrCa.

3.2.2 Gens de susceptibilitat al càncer de mama de moderada penetrància

Tan *BRCA1* com *BRCA2* estan involucrats en la reparació del DNA. Ha estat demostrat que mutacions monoal·lèliques en gens involucrats en la reparació del DNA com *ATM* i *TP53* estan associades a un increment del risc a càncer de mama [124]. Aquestes mutacions són poc freqüents en aquests gens. Per tant, els gens candidats per ser investigats en posteriors estudis de susceptibilitat al càncer de mama, eren aquells que estaven relacionats funcionalment amb la via de senyalització de *BRCA1* i *BRCA2* així com en processos de reparació del DNA, tals com *BRIP1*, *CHEK2*, *PALB2* i *RAD51C* [98]. Mutacions monoal·lèliques en aquests gens incrementen la odds ratio entre 2.0 i 4.3 el risc a BrCa. La odds ratio calcula el risc relatiu de desenvolupar càncer de mama, que en aquest cas, significa que aquest risc relatiu incrementa entre 2 i 4 vegades més si tenim una mutació en algun d'aquests gens [133]. La connexió entre la reparació del DNA i la susceptibilitat al càncer de mama és va fer encara més evident després de la descoberta que mutacions bial·lèliques en *BRCA2* eren responsables de FA, en concret, del subgrup *FANCD1* [12, 134]. Així com els portadors de mutacions bial·lèliques a *BRIP1* i *PALB2* estan associats a un increment del risc de BrCa moderat i al mateix temps mutacions monoal·lèliques resulten ser *FANCI* i *FANCD1* (**Figura 9**).

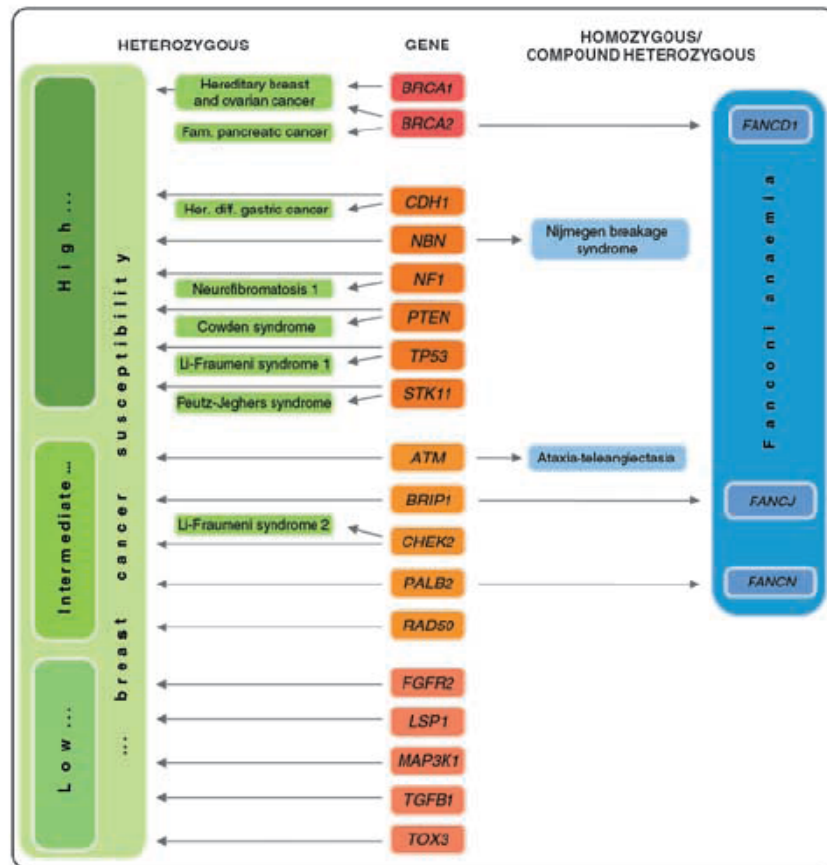


Figura 9. Correlació fenotípica-genotípica de mutacions bial·lèliques i monoal·lèliques entre els portadors de gens de predisposició al càncer de mama i SNPs de susceptibilitat al càncer de mama de baixa penetrància. A més a més dels gens *BRCA1* i *BRCA2*, els gens estan agrupats segons l'associació amb els síndromes de predisposició, gens de susceptibilitat al càncer de mama de penetrància intermèdia i polimorfismes d'un sol nucleòtid comuns de susceptibilitat al càncer de mama de baixa penetrància. Els gens estan ordenats alfabèticament per cada grup. Adaptada de [98].

3.2.3 Gens de susceptibilitat al càncer de mama de baixa penetrància

Els polimorfismes en gens de baixa penetrància es van identificar per anàlisis globals del genoma, tan en gens coneguts, com en regions del cromosoma de gens desconeguts [121]. Actualment, estan disponibles noves eines com els *arrays* de variants polimòrfiques d'un sol nucleòtid (SNPs) per anàlisis genòmics globals (Genome-Wide Association Study, GWAS) [33, 129, 135]. En aquests estudis es testen les variants genètiques en sèries de centenars/milers de casos i controls per tal d'identificar les que estan associades a un increment del risc a BrCa [98]. Aquests estudis no tenen biaix perquè no es centren en gens candidats per participar en processos biològics prèviament relacionats amb càncer, encara que presenten limitacions estadístiques degut al gran nombre d'SNPs que s'analitzen i la

necessitat de mostres grans per detectar el baix increment de risc que confereixen [136]. L'objectiu d'aquests estudis és identificar un nombre de polimorfismes el qual cada un d'ells té un baix impacte en el risc de cada individu [98] (**Figura 10**). Per tal d'entendre com funcionen i interaccionen aquestes variants de risc amb els factors ambientals, serà necessari caracteritzar el seu paper en la tumorigènesis. Actualment, està augmentant el nombre d'informes sobre SNPs comuns en gens i regions de cromosomes que han estat identificats a partir dels estudis de GWAS. Avui en dia, aquests estudis es basen en la comparació entre els casos de càncer de mama amb agregació familiar que no presenten mutació ni en *BRCA1* ni en *BRCA2* i el càncer de mama esporàdic amb els grups controls. Aquests estudis identificaran nous polimorfismes de susceptibilitat i serà possible investigar efectes addicionals o sinèrgics sobre la susceptibilitat dels polimorfismes [106].

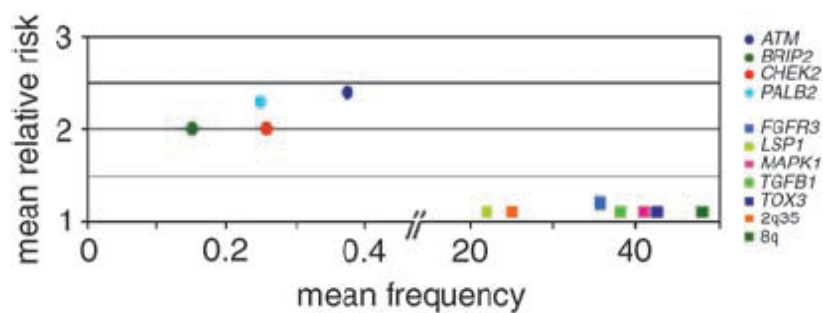


Figura 10. Associació de les mitjanes de les freqüències i el risc relatiu dels gens de susceptibilitat al càncer de mama. Aquesta figura mostra l'associació entre les mitjanes de les freqüències i les mitjanes de càncer de mama associades amb el risc relatiu. S'observa diferències pel que fa al risc relatiu, entre les mutacions poc freqüents en gens involucrats en la reparació del DNA de moderada penetrància i els polimorfismes d'un sol nucleòtid comuns (SNPs) de baixa penetrància. Adaptada de [98].

3.3 Modificadors de *BRCA1* i *BRCA2*

Diverses observacions com el fet que els portadors de mutacions *BRCA1* i *BRCA2* presenten una penetrància variable, suporten la hipòtesis que el risc de càncer de mama està modificat en part, per altres factors genètics [137]. Alguns estudis especulen que aquest increment del risc pot ser degut a l'herència de variants genètiques que actuen com a modificadors del risc en els gens *BRCA1/BRCA2* [138]. Actualment s'estan realitzant grans esforços per tal d'identificar gens modificadors en portadors de mutació en *BRCA1* o *BRCA2* [139].

Per tal de generar suficient poder estadístic que identifiqui gens modificadors, s'ha establert el Consorci d'Investigadors de Modificadors de *BRCA1* i *BRCA2* (CIMBA) [139]. El CIMBA conté 50 grups afiliats els quals conjuntament han recopilat DNA i dades clíniques d'aproximadament 10.000 portadors de mutacions *BRCA1* i 5.000 portadors de mutacions *BRCA2*. Un dels descobriments més rellevants dut a terme per Levy-Lahad i col·laboradors, va proporcionar la major evidència de l'existència de gens modificadors. En concret, van publicar que l'SNP -135G>C de *RAD51* modificava el risc en portadors de mutacions *BRCA2* [140]. Altres evidències sorgeixen d'estudis de factors de risc que es veuen influïts per factors genètics, com per exemple la densitat mamogràfica que té un fort component genètic [141], recentment ha estat demostrat que modifica el risc en portadors de mutacions *BRCA1* i *BRCA2* [142].

Els modificadors genètics comuns en el risc a càncer de mama pels portadors de mutacions en *BRCA1* i *BRCA2* han estat identificats essencialment mitjançant tres camins: estudis d'SNPs en els gens candidats, estudis d'SNPs associats en el risc a càncer de mama en el GWAS de la població general i estudis de GWAS en portadors de mutacions *BRCA1* i *BRCA2* [143].

- *Gens candidats:*

S'han investigat polimorfismes comuns en gens candidats com a modificadors potencial del risc a càncer de mama entre els portadors de mutacions *BRCA1* i *BRCA2*. Aquests estudis s'han centrat en gran part en els gens que són funcionalment rellevants en la malaltia o que interaccionen funcionalment amb *BRCA1* i/o *BRCA2* [143].

- *SNPs trobats pel GWAS que estan associats amb el risc a BrCa en la població general:*

Aquests estudis s'han centrat en SNPs amb una clara evidència estadística d'associació amb el risc a BrCa en la població general ($P < 10^{-7}$) com a potencials modificadors del risc de portadors de mutacions en *BRCA1* i *BRCA2*. Un dels resultats sorprenents del GWAS és la identificació d'una base genètica de susceptibilitat diferent pel càncer de mama segons el nivell d'expressió del receptor d'estrógen (ER). Així, la majoria de gens de baixa penetrància identificats fins al moment, influeixen en el desenvolupament de tumors ER positius però no el de tumors ER-negatius [131, 144]. De fet, els tumors de càncer de mama en portadors de mutacions *BRCA2* són predominantment ER positius, en canvi el

portadors de mutacions *BRCA1* són predominantment ER negatius [145].

- *GWAS en portadors de mutacions BRCA1 i BRCA2:*

Les variants genètiques que modifiquen el risc a càncer de mama en portadors de mutacions *BRCA1* difereixen de les variants en portadors de mutacions *BRCA2* i de les de no portadors. Aquesta investigació està dirigida a la cerca de regions cromosòmiques associades amb el càncer de mama en portadors de mutacions en *BRCA1* i *BRCA2* a través de GWAS separats en cada un dels dos grups a partir de les dades de diferents grups dins del consorci CIMBA [33, 143].

La identificació de modificadors genètics en el risc a càncer de mama en portadors de mutacions en *BRCA1* i *BRCA2* donarà lloc a una millora de la comprensió del càncer de mama i serà útil per la determinació del risc individual del càncer entre els portadors [106]. Tot i que el llistat de gens relacionats amb la susceptibilitat al càncer de mama és encara probablement incomplet i desconeixem els processos biològics implicats així com les relacions genètiques, moleculars i funcionals entre els gens d'alta, moderada i baixa penetrància. En aquesta tesi discutirem la implicació d'aquestes troballes en la predicció del risc a càncer de mama.

3.4 Connexió de FA i el càncer de mama

Estudis publicats anteriorment, demostren la connexió entre les proteïnes codificades pel producte dels gens de susceptibilitat al càncer de mama *BRCA1* i *BRCA2* i altres supressors de tumors com el producte dels gens *FANC* [12]. Unes de les característiques principals que mostren aquesta associació són: les proteïnes BRCA i FA s'associen per combatre lesions que bloquegen o interfereixen la replicació del DNA en fase S i G₂ del cicle cel·lular, de manera que les cèl·lules deficientes per qualsevol d'aquestes proteïnes, presenten fenotips semblants. Aquest fenotip es caracteritza per una acumulació espontània d'aberracions cromosòmiques durant la divisió cel·lular i una extrema sensibilitat als agents inductors de ICLs tals com la MMC.

Una altra evidència que mostra aquesta connexió són les mutacions bial·lèliques de pèrdua de funció en quatre gens FA que predisposen a desenvolupar BrCa respectivament: *FANCD1/BRCA2*, *FANCJ/BRIP1*, *FANCN/PALB2* i *FANCO/RAD51C*. *BRCA1* no està mutat en els pacients FA, però interacciona amb

BRIP1/FANCD1 [39, 40, 146] i amb BRCA2 per traslladar-se als llocs de dany del DNA [147]. BRCA2 co-immunoprecipita amb FANCD2 [148]. Les cèl·lules que han estat exposades a dany al DNA contenen FANCD2 al nucli, així com BRCA1, BRCA2 i RAD51. Aquestes evidències suggereixen un paper clau de FANCD2, FANCD1/BRCA2 i la via FA, en la ruta de reparació de dany al DNA mitjançant la HR. De fet, un gran nombre d'estudis realitzats demostren que línies cel·lulars deficientes de FA estan compromeses en la reparació de DSB per HR [149, 150]. Aquest fet mostra l'implicació del grup *downstream* de FANCD2 en la reparació del dany al DNA, tal i com s'observa en la **Figura 2**. No obstant, el mecanisme precís a través del qual la via FA promou la reparació del DNA no està del tot clara. El fenotip dels pacients FA amb mutacions a FANCD2 difereix d'altres subgrups FA, sobretot pel que fa a l'alt risc de tumors sòlids infantils, particularment els anomenats tumors de Wilms i els medul·loblastoma, els quals rarament es desenvolupen en els altres subgrups FA [36, 151]. Aquestes observacions suggereixen que és necessari una major comprensió de la via de senyalització de FA i que mutacions no identificades en altres gens FA poden donar una explicació a alguns casos d'agregació familiar de càncer de mama o ovari que no són explicats per *BRCA1* o *BRCA2/FANCD1* [89]. Addicionalment, les característiques biològiques que determinen si un gen FA predisposa també al càncer de mama, encara són desconegudes. No obstant, el que podem concloure és que els quatre gens FA que estan associats amb la susceptibilitat al càncer de mama (*BRCA2*, *BRIP1*, *PALB2* i *RAD51C*) no formen part del complex central de FA, i són els únics gens FA que actuen *downstream* de FANCD2 [128].

En aquesta tesi, intentarem augmentar el grau de coneixement de la via de senyalització FA/BrCa, a partir de resultats ja coneguts i de les noves interaccions obtingudes en aquest treball.

3.5 Estructura de *BRCA1* i *BRCA2*

El 1991, Mary Claire King i el seu grup mitjançant estudis de lligament genètic van mapar *BRCA1*, el primer gen descobert de susceptibilitat al càncer de mama que es troba al cromosoma 17 [132]. Tres anys més tard, Mark Skolnick i col·laboradors, el van clonar [123]. Estudis posteriors van demostrar mutacions truncadores en un llarg nombre de casos familiars de càncer de mama i més de 300 variants sense sentit. La búsqueda del segon gen de susceptibilitat al càncer de mama es deu a que hi havia casos familiars de càncer de mama sense mutació en el gen *BRCA1*. De nou, el 1995 estudis de lligament genètic van mapar el gen de susceptibilitat a

càncer de mama *BRCA2* al cromosoma 13 [32, 152]. Consistents amb el paradigma dels gens supressors de tumors, els tumors sorgeixen en individus amb mutacions en *BRCA1* o *BRCA2* que presenten pèrdua d'heterozygositat de l'al·lel no mutat [108-110].

En termes generals podem dir que *BRCA2* és un component integral de la maquinaria de HR, mentre que *BRCA1* és una ubiquitina E3 lligasa que té un impacte en la reparació del DNA, en la regulació de la transcripció, la progressió del cicle cel·lular i la inactivació del cromosoma X [153].

3.6 Cooperació de BRCA1 i BRCA2 en la reparació del dany al DNA

Defectes en la HR comprometen la capacitat de mantenir la integritat genòmica i pot portar a la pèrdua de cromosomes, desequilibris i reorganitzacions, els quals són successos iniciadors de la transformació tumorigènica [61]. S'ha demostrat que tant *BRCA1* com *BRCA2* juguen un paper important en aquest manteniment de l'estabilitat genòmica [154, 155]. De fet, tan *BRCA1* com *BRCA2* participen en una via de senyalització comuna per facilitar la HR i la reparació dels DSB. Defectes tan en *BRCA1* com en *BRCA2* comporta que els tumors que sorgeixen en els portadors *BRCA* siguin més sensibles a la IR que conseqüentment provoca reordenaments cromosòmics aberrants [66]. Aquest fenotip és associat a altres malalties tals com FA i el síndrome de Bloom [89, 156], les quals tenen un defecte comú en la reparació del DNA i el processament del dany al DNA. Les cèl·lules *RAD51* deficientes mostren fenotips similars, la qual cosa evidencia que la interacció amb *BRCA2* és essencial pel manteniment de la divisió cel·lular i l'estructura dels cromosomes [157, 158]. S'ha observat que aquestes proteïnes co-localitzen formant foci nuclear en el lloc de dany del DNA després de tractaments amb agents de dany al DNA tals com la IR, la qual cosa evidencia que aquestes proteïnes funcionen conjuntament en el procés de reparació del DNA [74], com s'ha esmentat anteriorment.

3.7 Característiques de BRCA1

La proteïna *BRCA1* és formada per 1863 amino àcids (aa) i s'expressa en moltes cèl·lules en proliferació [66]. L'extrem C-terminal es conegut com el domini BRCT, reconegut en moltes proteïnes de reparació al DNA. A l'extrem N-terminal es troba el domini ring-finger, involucrat en la ubiquitinació de proteïnes (**Figura 11**)[66]. *BRCA1* està implicat en processos cel·lulars diversos dependent del context cel·lular [159]. Així doncs, el trobem implicat en processos de senyalització del dany al DNA,

on és diana de la fosforilació per part de les quinases ATM/ATR i ràpidament es trasllada a les forquilles de replicació bloquejades. També funciona com a mediador en els punts de control de dany al DNA en les fases S i G₂/M del cicle cel·lular. El trobem que interacciona amb diferents proteïnes, incloent enzims del sistema de reparació d'aparellaments erronis (MMR), tals com MSH2 i MSH6, i la helicasa de DNA entre d'altres, les quals semblen estar implicades en el reconeixement de diferents aberracions de l'estructura del DNA. Per tant, la interacció amb altres proteïnes, mostra que té un paper general en la via de reparació del DNA [76] i el manteniment de l'estabilitat genòmica. BRCA1 també interacciona amb varis modificadors de la cromatina i és necessari pel manteniment de la XIST RNA en el cromosoma X inactiu [153]. Una altra implicació de BRCA1 és en la transcripció, doncs degut als dominis BRCT és un activador de la transcripció i es troba associat a RNA polimerasa II. Més extensament, BRCA1 està implicat en la regulació de la transcripció de molts gens activats en resposta al dany al DNA.

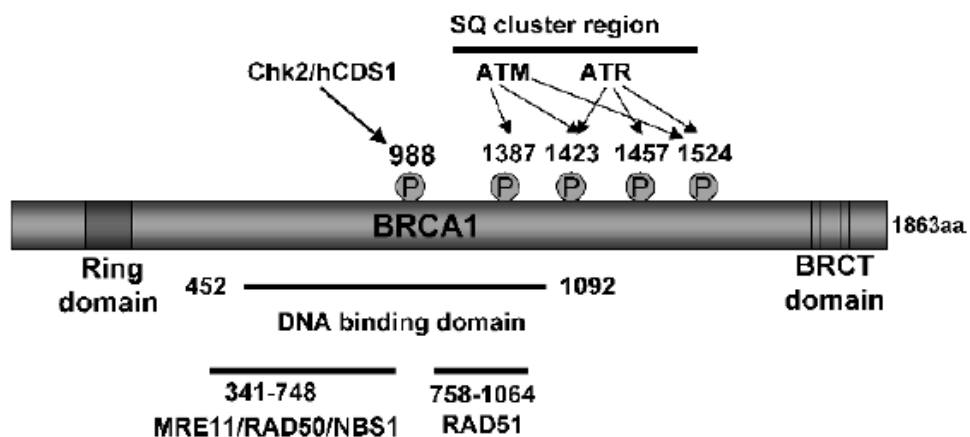


Figura 11. Esquema de BRCA1. Aquest esquema mostra els llocs funcionalment importants, incloent els llocs de fosforilació. El domini BRCT es troba a l'extrem COOH terminal de BRCA1 i sembla ser un domini important d'interacció proteica per proteïnes de reparació al DNA. El domini de Ring es troba a l'extrem NH₂ terminal de la proteïna i té la característica de ser una E3 ubiquitin lligasa, però els llocs de diana de la ubiquitinació encara no han estat identificats. BRCA1 funciona amb cooperació amb BARD1 com a ubiquitin lligasa. El domini d'unió al DNA de BRCA1 ha estat mapat a la regió central de la proteïna (452-1092aa). Aquí és on hi ha el lloc de fosforilació depenent de Chk2 al residu Ser⁹⁸⁸. El grup que compren la regió SQ adjacent al domini d'unió al DNA té múltiples dianes de fosforilació per ATM i ATR. També es mostren els llocs d'interacció amb Rad50 i Rad51. Adaptada de [160].

BRCA1 interacciona amb BRCA2 només transitòriament als llocs de dany o en les forquilles de replicació bloquejades, mentre que majoritàriament BRCA1 es troba en altres complexes proteics. BRCA2 actua *downstream* de BRCA1 i per tant, té una funció més directe en la via de la HR mitjançant la seva interacció amb RAD51 [160].

A més a més, BRCA1 el trobem associat com a regulador de la diferenciació epitelial [161]. Les característiques patològiques dels tumors de mama entre els portadors de mutacions *BRCA1* són predominantment del tipus *basal-like* i ER negatius [162], suggerint que la funció de BRCA1 és regular la diferenciació de les cèl·lules mare/progenitores [163]. Recentment s'ha identificat una variació genètica comuna en el gen de baixa penetrància *HMMR* que modifica el risc de càncer entre els portadors de *BRCA1*. La diferenciació epitelial luminal mamària, revela que tan BRCA1 com RHAMM, producte del gen *HMMR* són essencials en la reorganització citoesquelètica [164].

3.8 Característiques de BRCA2

La proteïna BRCA2 està formada per 3418 aa i té un pes molecular aproximat de 385 kDa. Es caracteritza per un exó molt llarg (l'exó 11) el qual codifica els motius necessaris per la interacció amb RAD51 [165]. Aquests motius són els anomenats BRC, en concret n'hi ha 8 i són els que permeten la interacció directa amb RAD51 (**Figura 12**), tot i que amb diferents afinitats cada un d'ells [166]. BRC3 i BRC4 són els que tenen una interacció més forta amb RAD51 [38]. Per la formació de foci de RAD51 és necessari BRCA2, després de dany al DNA. Tot i que també s'ha observat la formació de filaments de RAD51 en fase S en absència de BRCA2. La presència de BRCA2 és necessària per prevenir errors majors, tals com aberracions cromosòmiques [167]. Aquests errors poden reflectir la utilització de vies de reparació alternatives tals com la NHEJ. Les cèl·lules mare embrionàries de ratolins deficientes en *Brca2* són letals i presenten una manca de desenvolupament en els embrions [168] de la mateixa manera que *Rad51* [169].

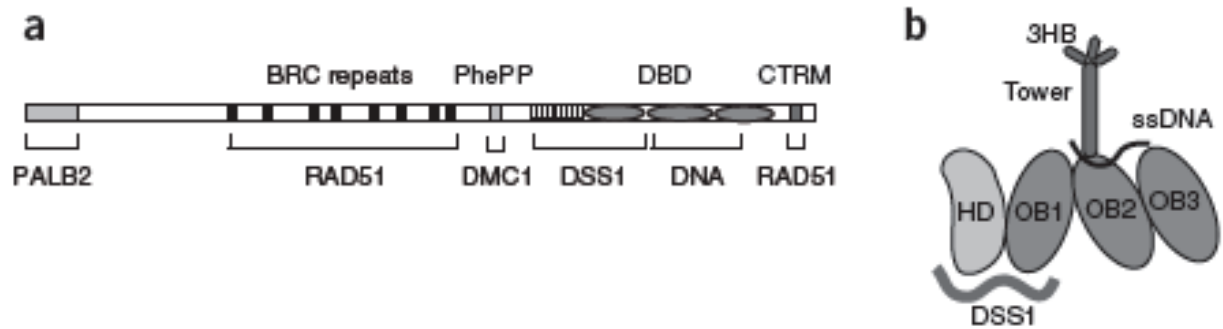


Figura 12. Organització de BRCA2 i estructura del domini DBD. (a) Esquema de BRCA2 amb els motius d'interacció proteics i els dominis identificats a la part de dalt. CTRM és el domini de l'extrem C-terminal de la cadena, que s'uneix a RAD51. El DBD està trencat en dominis rics en hèlix (representat com a ratlles), i amb els tres oligonucleòtids (representat en semicercle). (b) Els 800 residus DBD es mostren esquemàticament amb el domini ric de hèlix (HD) seguit dels oligonucleòtids d'increment d'unió. OB2 i OB3 estan empaquetats en tàndem. Mentre que OB1 està empaquetat amb OB2 en direccions oposades. El domini tower surt de OB2 i a dalt de tot té el llaç de triple hèlix (3HB). ssDNA interacciona amb OB2 i OB3. DSS1 interacciona amb el domini ric d'hèlix i OB1 a la cara oposada del domini. Adaptada de [61].

L'extrem C-terminal de BRCA2, en concret la regió compresa entre 2478-3418 aa de BRCA2 que conté aproximadament uns 800 aa completament separats de la regió BRC, es caracteritza per la seva unió al ssDNA [65] i a RAD51 [170]. Tot i que sembla que aquesta interacció amb RAD51 sigui dispensable per la recombinació i la reparació. És una regió altament conservada en l'evolució que forma una estructura de tres dominis d'unió d'oligonucleòtids-oligosacarids (OB) que es troben també en proteïnes com RPA la qual també s'uneix al ssDNA. Aquest segment és el que interacciona amb la proteïna DSS1 identificada per Marston et al [171] a partir d'un cribatge pel sistema de doble híbrid, de l'anglès Yeast two-hybrid (Y2H), on mapen la regió d'interacció entre els aminoàcids 2472 i 2957 de BRCA2. Gudmundsdottir et al [172] van demostrar a partir de la depleció de DSS1 en cèl·lules humanes, que comprometia la formació de foci de RAD51 després de dany al DNA, així com el manteniment del genoma, de la mateixa manera que s'observava en absència de BRCA2. La qual cosa, suggeria que DSS1 és un component de la via de reparació de la HR que d'alguna manera funciona amb BRCA2 per dirigir RAD51 als llocs de dany de DSB. Una altra proteïna que s'uneix directament a BRCA2 és FANCD2. Aquesta interacció també es va descriure a partir d'estudis basats en el Y2H [148]. Estudis recents suggereixen que la unió al DNA de BRCA2 està modulada per la seva associació amb PALB2 [128].

3.9 Interacció BRCA2 amb PALB2

Degut a les característiques de BRCA2 explicades anteriorment, podríem dir que BRCA2 funciona, almenys en part, com una proteïna *scaffold* que ajuda a promoure la formació d'un alt orde, que conté complexos multiproteics d'importància biològica.

L'any 2006, Xia et al, van descriure una nova interacció de BRCA2. En concret, van identificar PALB2 com interactor nuclear de BRCA2, el qual també s'ha vist implicat en la maquinària de reparació del DNA en els llocs de dany [173]. *PALB2* es troba al cromosoma 16p12, el producte del gen és una proteïna de 1186 aa (~130 kD). Estudis realitzats, han demostrat que PALB2 co-localiza amb BRCA2 en el foci nuclear, tan abans com després de dany al DNA, essent essencial per l'acumulació de BRCA2 i RAD51 als DSBs. Concretament PALB2 promou la localització i acumulació estable intranuclear de BRCA2, que al seu torn, fa possible la contribució de BRCA2 en la HR/DSBR i BRCA1 s'associa a BRCA2 a través de PALB2. A més, la depleció de PALB2 compromet la reparació per HR i la supervivència de les cèl·lules en resposta a estrès genotòxic [173]. Així com també són més sensibles als tractaments amb MMC, els quals provoquen ICLs i DSB [128]. El conjunt d'aquests resultats han evidenciat que PALB2 juga un paper crític en la HR i és important pel manteniment de la integritat genòmica i la supressió de tumors.

Nous estudis realitzats sobre PALB2 per part de Sarah et al [174], han identificat PALB2 com un nou subgrup de FA, anomenat FANCN. Mutacions bial·lèliques de *PALB2* causen FA, de manera similar a les mutacions bial·lèliques de *BRCA2* les quals causen FA del subgrup FANCD1 [36]. Tan el fenotip dels pacients FA del grup FANCD1, com el de FANCN, són molt més severs que els que succeeixen en altres subgrups de FA. Es tracta d'un gen de susceptibilitat a càncer de mama que mostra l'estreta relació entre FA, la via de reparació del DNA i la predisposició al càncer de mama.

El conjunt d'aquests coneixements ens deixa entreveure la complexitat de les vies de senyalització, qui regula a qui i que succeeix, que és el que promou una cascada d'activació i com repercuteix en les patologies. Per tal d'entendre el funcionament és necessari un estudi molecular detallat que ens ajudarà a entendre poc a poc, el conjunt d'aquests gens i proteïnes i com interaccionen entre ells. És per això, que aquesta tesi pretén contribuir en la comprensió de les vies de senyalització, concretament, en la via de senyalització FA/BrCa i la seva implicació en FA i BrCa.

3.10 Noves proteïnes involucrades en la via de senyalització FA/BrCa

Així doncs, PALB2 és un component integral del complex BRCA, important en el procés de reparació del DNA. Recentment, s'ha publicat dos articles que descriuen una nova interacció de PALB2 [175, 176] i que pot ajudar a la comprensió de la via de reparació del dany al DNA degut a la implicació directa de PALB2 en la reparació dels DSB.

Aquests nous estudis confirmen els nostres resultats obtinguts [177], i al mateix temps mostren controvèrsies en la senyalització dins la via de reparació del DNA [175, 176], tal i com mostra la **Figura 13**. Estudis publicats per Sy et al [176], descriuen la interacció directe entre PALB2 i MRG15. El grup de Hayakawa et al [175], descriuen aquesta interacció i suggereixen que MRG15 és necessari per la HR, de la mateixa manera que ho són BRCA1, PLAB2, BRCA2 i RAD51 [173, 178, 179]. També conclouen que MRG15 és necessari per la resistència a la MMC, tal i com ho són els components del complex BRCA. Finalment mitjançant el fraccionament nuclear, mostren que el reclutament de PALB2 a la cromatina i les seves proteïnes associades als llocs de dany, depenen de MRG15. Aquestes resultats, suggereixen que MRG15 participa en la resposta als DSB mitjançant el reclutament del complex BRCA en els llocs de dany del DNA [175]. Suggereixen que aquest reclutament té lloc quan la cromatina està en la conformació relaxada, després de l'acetilació de la histona pel complex NuA4 HAT. Per altra banda, el grup de Sy et al [176], suggereixen que el mutant de PALB2 el qual li falta el domini d'unió a MRG15 està associat amb una hiper-recombinació i resistència a la MMC. Aquesta discrepància, juntament amb els nostres resultats obtinguts, serà discutida en l'apartat de discussió. Sy et al, també mostren que la depleció de MRG15 no afecta als nivells de proteïnes de BRCA2 i incrementa la ratio de conversió gènica, calculada mitjançant assajos de HR.

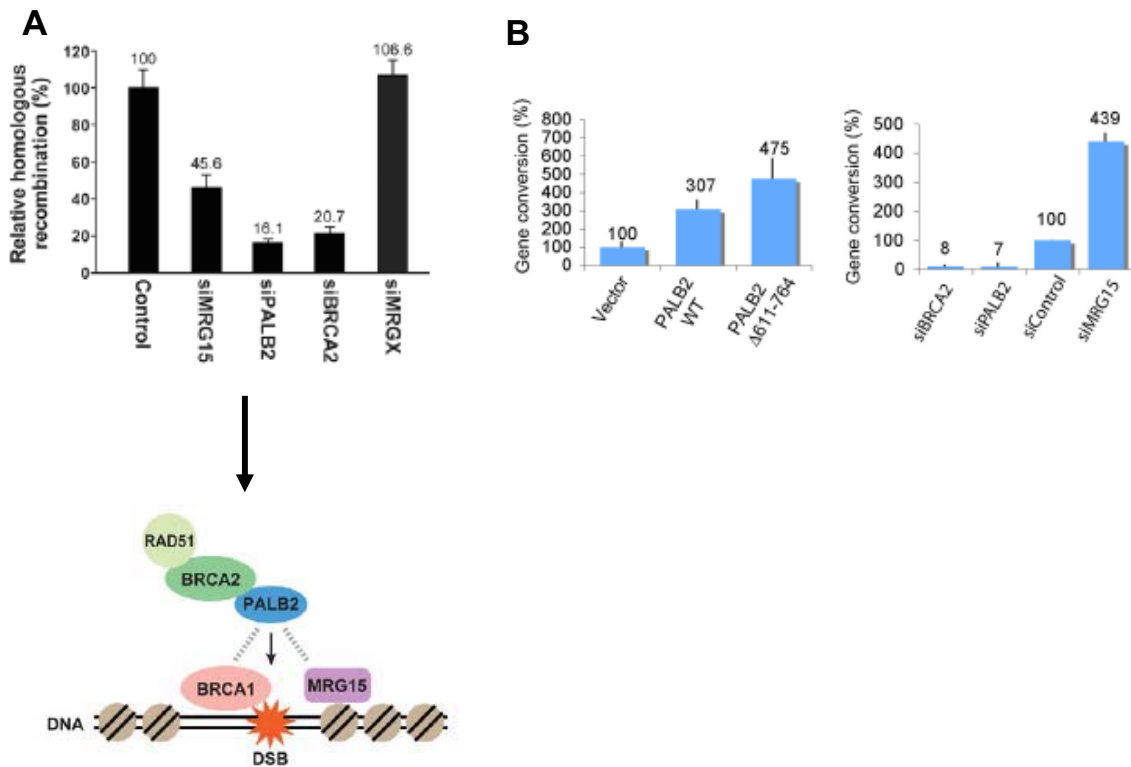


Figura 13. Models en controvèrsia de la funció de MRG15. A) Figures Hayakawa et al [175], mitjançant la utilització de diferents siRNA, mostren el paper crucial de MRG15 en la reparació dels trencaments de doble cadena (DSB) per recombinació homòloga (HR). Aquests resultats suggereixen que MRG15 és necessari per una reparació eficient mitjançant la HR. Tal i com mostra l'esquema representatiu. B) Figura provinent dels estudis realitzats per Sy et al [176], són els primers que van descriure la interacció entre PALB2-MRG15. En aquest gràfic es pot observar que la depleció de MRG15 no afecta la conversió gènica i per tant no està implicat en la HR.

En l'apartat de resultats, mostrarem les nostres observacions després de la realització de diferents experiments que pretenen donar noves eines per entendre el funcionament de la via de senyalització en la reparació del dany al DNA.



HIPÒTESI

HIPÒTESI

Les proteïnes codificades pels gens FA o els gens de susceptibilitat a BrCa cooperen en una mateixa via de senyalització en el procés de reparació del dany al DNA [12]. FA és una malaltia genètica rara on fins al moment s'han identificat 15 gens responsables [180]. Actualment encara resten pacients FA sense mutació coneguda. És per aquest motiu, que el nostre estudi es basa en la identificació de nous gens/proteïnes causants de FA que alhora ajudin a una major comprensió de la via de senyalització en el procés reparació del dany al DNA, concretament en la reparació dels ICL i DSB. Els gens del tercer grup que actuen *downstream* del complex ID com per exemple *FANCN/PALB2*, estan involucrats en la susceptibilitat al BrCa. Aquest estudis ens permeten hipotetitzar que nous gens del tercer grup, també puguin presentar SNPs o mutacions que predisposin a augmentar el risc de càncer de mama. Aquest projecte pretén identificar components de la via de senyalització FA/BrCa i alhora caracteritzar el seu paper en la predisposició al càncer de mama.



OBJECTIUS

OBJECTIUS

Identificació de noves proteïnes involucrades en la via de senyalització FA/BrCa i caracterització d'aquestes.

Identificació de variants polimòrfiques de predisposició al càncer de mama dins aquets nous gens identificats.



MATERIALS I MÈTODES

1 MATERIALS

1.1 *Cultius cel·lulars*

Les cèl·lules HeLa i HEK293 es van cultivar en el medi Duplecco's Modified Eagle's (DMEM) complementat amb un 10% de sèrum fetal boví (FBS), 2mM de Sodium Pyruvate i 2mM de L-glutamine. Les cèl·lules MEFs, *Morf411*^{+/+} i *Morf414*^{-/-} (proporcionades pel Dr. Tominaga K, The University of Texas Health Science Center, San Antonio) es van cultivar utilitzant medi Duplecco's Modified Eagle's complementat amb un 10% de sèrum fetal boví i 2mM de Sodium Pyruvate. Les cèl·lules MCF10A es van cultivar en el medi HuMEC (Invitrogen). Tots els cultius cel·lulars han crescut a 37°C en una atmosfera humida al 5% de CO₂.

1.2 *Anticossos*

Les immunoprecipitacions es van realitzar amb anti-ACTN (ACTN05 C4; Abcam, Cambridge, UK), anti-Actb (Abcam 8226), anti-ATR (Millipore 09-070), anti-BRCA2-Ab1 (Calbiochem OP95), anti-CHEK2 (Santa Cruz Biotechnology H-300), anti-CHUK (Abcam, ab54626), anti-E6TP1 (Santa Cruz Biotechnology, N-20), anti-FANCD2 (Abcam, ab2187), anti-phospho-Ser139-H2AX (JBW301; Millipore), anti-KPNA1 (Abcam ab6035 i ab55387), anti-MRG15 (Novus Biologicals, Littleton, CO, USA; 1-235 ab37602; Abcam i 15C [181-184], anti-NFKB (Santa Cruz Biotechnology, H-119), anti-PALB2 (Bethyl Laboratories, A301-246A i Novus Biologicals, 675-725), anti-PPHLN1 (Abcam, ab69569), anti-RAD51 (Santa Cruz Biotechnology, H-92), anti-RPA1 (C88375; LifeSpan BioScience, Seattle, WA, USA), l'anti TOP3A (Santa Cruz Biotechnology, N-20) l'anti-TSNAX (Santa Cruz Biotechnology, 3179C2a) i anti-USP1 (Abgent, AP130a, San Diego, CA, USA). L'anti-IgG (Santa Cruz Biotechnology), l'anti-IgM (Santa Cruz Biotechnology) i l'anti-IgR (Santa Cruz Biotechnology) van ser utilitzats com a controls. Per l'assaig de co-AP, es van utilitzar els anticossos anti-MRG15 rabbit, i anti-MRGX rabbit (reactius proporcionats pel Dr. Tominaga. K), així com anti-His (Santa Cruz Biotechnology H-15), anti-Myc (Sigma-Aldrich, 9E10) i anti-HA (Sigma Aldrich) per hPALB2Myc-His i MRG15-HA i MRGX-HA (reactius proporcionats també pel Dr. Tominaga. K). Els Westerns Blots van ser realitzats amb els anticossos anti-glutathion-s-transferase (GST) (Sigma). El complex anticòs-antigen es va visualitzar utilitzant el sistema d'anàlisi ECL Western blotting analysis system (Amersham Pharmacia Biotech) i

exposat en l'hiperfilm Amersham HyperfilmTM ECL (GE Healthcare). Els anticossos secundaris horseradish peroxidase-linked van ser adquirits de GE Healthcare i Abcam.

Les immunofluorescències es van realitzar amb anti-TRF2 (36 BD Transduction Laboratories, Mississauga, ON, USA), anti-RAD51 (Santa Cruz Biotechnology, H-92), l'anti-TSNAX (Santa Cruz Biotechnology, 3179C2a). Els anticossos secundaris fluorescents eren Alexa 488 o 546-594 nm anti-mouse i anti-rabbit respectivament (Molecular Probes, Invitrogen).

Taula 3. Llista d'anticossos primaris.

Anticós	Dil·lució	Casa comercial
ACTN	WB 1:1,000	Abcam
Actb	WB 1:1,5000	Abcam
ATR	WB: 1:500	Millipore
BRCA1	WB 1:2,000	Calbiochem
BRCA2	WB 1:300	Calbiochem
CHEK2	WB 1:1,000	Santa Cruz Biotechnologies
CHUK	WB 1:500	Abcam
E6TP1	WB 1:300	Sant Cruz Biotechnologies
FANCD2	WB 1:2,500	Abcam
GST	WB 1:2,000	Sigma-Aldrich
HA	WB 1:1,000	Sigma-Aldrich
HIS	WB 1:300	Santa Cruz Biotechnology
Phospho-Ser139-H2AX	IF 1:1,000	Millipore
KPNA1	WB: 1:1,000	Abcam
MRG15	WB 1:1,000	Novus Biological
MRG15	WB 1:500	Abcam
MYC (clon 9E10)	WB 1:2,000	Sigma-Aldrich
NFKB1	WB 1:500	Santa Cruz Biotechnologies
NUP62	WB 1:1,000	BD Biosciences
PALB2	WB 1:2,000	Bethel Laboratories
PALB2	WB 1:1,000	Novus Biological
PPHLN1	WB 1:500	Abcam
RAD51	WB 1:300 IF 1:100	Santa Cruz Biotechnology
RPA1	WB: 1:500 IF: 1:250	LifeSpan
TOP3A	WB 1:300	Santa Cruz Biotechnology
TRF2	IF 1:250	Transduction Laboratories
TSNAX	WB: 1:1,000 IF 1:500	Santa Cruz Biotechnology
USP1	WB 1:500	Abgent

1.3 Vectors d'expressió

Per tal de realitzar Y2H, primerament es van generar les seqüències d'interès de cada proteïna (*baits*) així com la proteïna codificada per complert *open-reading frame* (ORFs), mitjançant la reacció en cadena de la polimerasa (PCR). Per tal de generar aquests productes es van utilitzar diferents primers de 25 parells de bases més la seqüència attB amb guanines terminals (G). Aquest lloc attB permet clonar la seqüència d'interès en un vector donador, sense la necessitat d'utilitzar enzims de restricció, mitjançant el sistema Gateway. Així per exemple, el vector donador conté el gen d'interès i els llocs de recombinació attL que flanquegen el gen. Per tal de clonar el fragment d'interès es va utilitzar la reacció BP del sistema Gateway, segons el protocol (Invitrogen). Un cop clonada la seqüència d'interès en el vector DONR, es va procedir a la clonació en el vector de destinació pDEST27, mitjançant la reacció LR segons els protocol de sistema Gateway (Invitrogen).

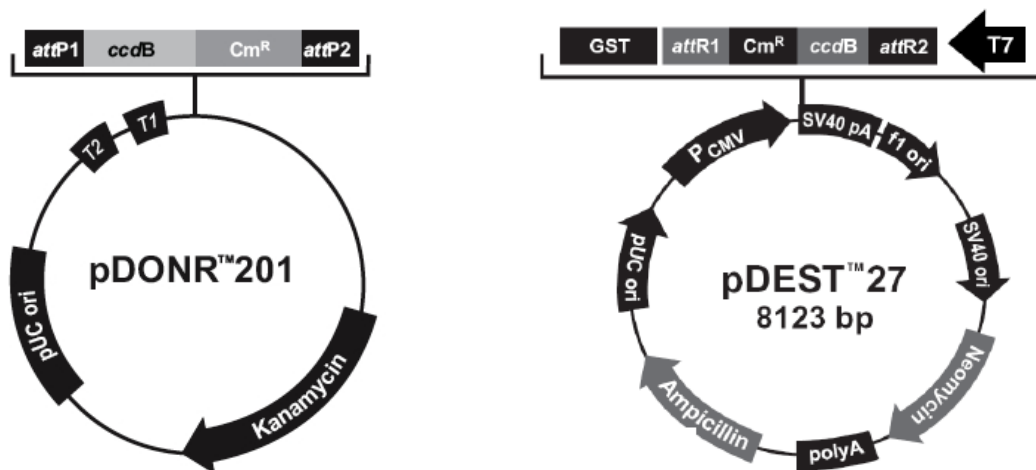


Figura 14. Estructura del vector pDONR201 i pDEST27. A l'esquerra el vector donador pDONR201 utilitzat per clonar els fragments d'interès en el sistema del doble híbrid (Y2H). A la dreta, estructura del vector de destinació pDEST27 utilitzat per corroborar l'expressió d'alguns dels fragments clonats prèviament en el vector DONR. Aquests dos vectors són compatibles amb el sistema Gateway.

2 PROCEDIMENTS EXPERIMENTALS

2.1 *Yeast two-hybrid screens*

El sistema del Y2H, és una tècnica molecular utilitzada per la identificació i caracterització d'interaccions proteiques. Consisteix en un factor de transcripció separat en dos fragments, el domini d'unió al DNA (DBD) i el domini d'activació (AD) [185]. D'aquesta manera, la interacció de proteïnes pot ser potencialment identificades (X-Y heterodímer o X-X homodímer) mitjançant la generació de dos proteïnes híbrides diferents, una amb la proteïna X fusionada al DBD i l'altre proteïna Y fusionada al domini AD [186], les quals, conjuntament poden reconstituir el factor de transcripció que al seu torn, pot activar la transcripció del gen informador regulat pels llocs de DBD.

Els criatges a escala proteòmica del Y2H es van realitzar seguint l'estratègia d'unió (*mating*) [186, 187] i utilitzant dos llibreries diferents de cDNA, de *human fetal brain* o *spleen* (ProQuest, Invitrogen) com a *preys*. Es van dissenyar múltiples *baits* per cada proteïna de la via de senyalització FA/BrCa d'acord amb els dominis familiars predits pel Pfam [188], regions desordenades predites pel PONDR [189] i la seqüència completa de la proteïna ORF. Els fragments dels *baits* es van obtenir a partir de la reacció en cadena de la polimerasa transcriptasa reversa (RT-PCR) utilitzant cDNAs provinents de limfòcits sans amb els *primers* corresponents per cada *bait* (*forward* i *reverse*), i subseqüentment clonats en el vector Gateway pDONR201 (Invitrogen). Els *baits* es van seqüenciar en 5' per tal de confirmar que la seqüència fos correcta i que estiguessin *in-frame*. Un cop verificats, es van transferir en el vector d'expressió de llevats pPC97 (Invitrogen) fusionat amb el DBD de Gal4. Els constructes es van transfectar a la soca de llevat AH109 (Clontech) pel posterior criatge utilitzant medi selectiu sense histidina (HIS) i a la soca de llevat Y187 (Clontech) va ser fusionada amb la llibreria de cDNA. La soca de llevat AH109 conté diferents gens informadors *ADE2*, *HIS3*, *lacZ* i *MEL1* GAL4. Els medis per la soca de llevat AH109 es van complementar amb 10 mM de 3-amino-1,2,4-triazole (3-AT; Sigma-Aldrich) pel test d'interacció-depenent de la transactivació del gen informador *HIS3*. El 3AT és un inhibidor competitiu del producte del gen *HIS3*. Per tant, perquè els llevats puguin créixer, és necessari la síntesis del gen informador *HIS3*. Si hi ha interacció entre les dos proteïnes, el factor de transcripció permet la síntesis del producte del gen *HIS3* i el conseqüent creixement de les colònies de llevat. Prèviament, es van examinar el *baits* segons si podien activar-se per si sols, mitjançant la utilització de diferents concentracions de

3-AT d'un rang de 10 a 80 mM. Sota aquestes condicions, es van cribar més de 10^7 transformants per cada *bait*. Els clons positius van créixer en un medi selectiu durant tres cicles (10 a 15 dies) per evitar els cDNAs contaminants, previs a l'amplificació per PCR i a la identificació del *prey* per seqüenciació [187].

- *Mating screening protocol*

Prèviament al cribatge, es va realitzar una amplificació de la llibreria de cDNA (ProQuest Invitrogen) que conté el vector pPC86 (Invitrogen) en la soca de llevat Y187 (Clontech), la qual conté els constructes informadors *lacZ* i *MEL1* que tan sols s'expressen en presència de la interacció de proteïnes basades en GAL4 i és una llibreria ideal com a hoste de la soca AH109. La transformació de la llibreria de cDNA es va realitzar segons el protocol: la soca de llevat Y187 que havia estat creixent durant tota la nit (o/n) en una placa amb medi YPD, es va inocular en un medi líquid de YPD (10 g d'extracte de llevat, 20 g bacto-peptone, 50ml 40% glucosa en 1 litre) durant aproximadament 11-12 hores fins que la OD_{600} incrementés fins a 0.4-0.5 unitats. Seguidament, les cèl·lules es van centrifugar durant 5 minuts a 2000 x g; després el pelet es va rentar dos vegades amb aigua destil·lada i després amb la solució TE/LiAc (per 50 ml, 5 ml de 10x TE 100 mM Trisc-HCl (pH 7.5, 10 mM EDTA) i 5 ml de 1 M LiAc) seguidament de la centrifugació, tal i com hem realitzat abans; després el pelet es va resuspendre amb solució TE/LiAc/PEG (TE/LiAc en 40 ml d'un 50% polyethylene glycol 3350) amb 3 mg/ml de DNA de esperma de salmó bullit utilitzat com a portador i 30 µg de llibreria de cDNA (ProQuest, Invitrogen); la barreja es va incubar durant 30 minuts a 30°C, seguidament d'un shock de 42°C durant 15 minuts; les cèl·lules després es van centrifugar per remoure la solució TE/LiAc/PEG i resuspendre-ho en aigua destil·lada per ser plaquejat en plaques d'agar amb medi selectiu YPD sense triptòfan (TRP) i complementat amb ampicil·lina i cloramfenicol; les cèl·lules després es van incubar durant dos o tres dies a 30°C, un cop passat aquests tres dies va aparèixer les colònies. L'últim dia, es van recollir les colònies de les plaques, diluïdes amb aigua destil·lada i emmagatzemades com a estocs de glicerols.

Pel cribatge, els diferents *baits* van créixer o/n a la soca de llevat AH109 en medi líquid YPD complementat amb ampicil·lina i cloramfenicol. El següent dia, es va incubar una alíquota de la llibreria de cDNA prèviament amplificada durant 10 minuts a 30°C en medi YPD complementat amb glucosa. Mentrestant, es va mesurar la OD_{600} del cultiu del *bait* o/n (que hauria de ser 2-5 unitats OD). Es necessitar 80 OD_{600} del cultiu (e.x per 3.6 OD_{600} de cultiu, es va utilitzar 21 ml) que es va barrejar amb la llibreria que havia estat creixent durant 10 minuts amb YPD.

La barreja es va centrifugar durant 10 minuts a 2,500 x g. El pelet es va resuspendre en medi líquid YPD i plaquejat en plaques d'agar no selectives de YPD. Les plaques es van incubar durant 4 hores 30 minuts a 30°C. El cultiu crescut es va recollir sota la flama utilitzant una pipeta Pasteur i aigua. El volum final es va centrifugar durant 10 minuts a 2,500 x g. Després el pelet es va resuspendre en aigua destil·lada, plaquejat en plaques de 10 mM 3-AT i incubat a 30°C. Addicionalment també es va plaquejar un volum final d'una dilució a 1/10,000 en una placa amb YPD sense leucina (LEU) i sense TRP com a control per calcular l'eficiència de la unió. Després de cinc o sis dies, es van picar les colònies i es va replicar unes 4-5 vegades en plaques amb 3-AT durant tres setmanes. Després de la última rèplica, es van picar les colònies i es van incubar a 37°C durant 5 minuts en una placa de 96 pous amb solució de lysis (zymolasa), després durant 5 minuts a 95°C en una màquina de PCR. Seguidament es va fer una dilució 1:10 del lysat i es va realitzar una PCR utilitzant els *primers* de la seqüència AD i la seqüència de terminació corresponent al vector pPC97. Després, els productes de la PCR es van purificar seguint els protocols (Genomed GmbH) i seqüenciats utilitzant els primers AD.

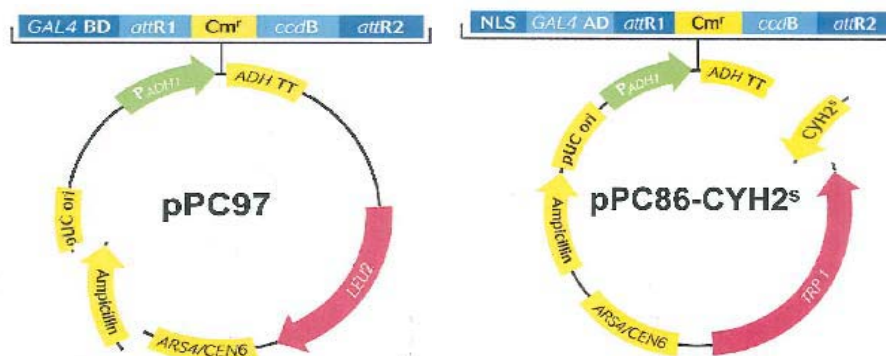


Figura 15. Vectors Gateway utilitzats en el Y2H. Les figures mostren l'estructura de pPC97 (esquerra del panell) i pPC86 (dreta del panell) utilitzats en el criatge del Y2H.

2.2 Anàlisi de perfils d'expressió

Es van avaluar les similituds dels perfils d'expressió mitjançant el coeficient de correlació de Pearson (PCC) utilitzant els nivells d'expressió normalitzats (gcRMA) de les dades del Human GeneAtlas U133A (<http://biogps.gnf.org>) [190]. Es van fer les comparacions per totes les possibles sondes de microarrays per la correcció de Bonferroni.

2.3 Assaig de supervivència i siRNA

Per tal d'avaluar la supervivència cel·lular, 24 hores abans de l'assaig, es van plaquejar 3×10^5 cèl·lules en plaques duplicades de 60-mm. Seguidament, els cultius es van exposar a MMC o a irradiació- γ a les dosis indicades. Després de 72 hores amb el tractament, es van rentar les cèl·lules amb PBS, es van recollir amb trypsina i es van contar. La supervivència es presenta com a percentatge relatiu als controls no tractats.

Cada siRNA es va transfectar dos vegades successivament, (24 hores després) amb una concentració final de 20 nM utilitzant Lipofectamina RNAiMAX (Invitrogen) d'acord amb el protocol del producte. Després de 4 dies, els cultius es van tractar amb MMC o irradiació- γ . Es va utilitzar com a control negatiu el siRNA Lo GC (12935-200; Invitrogen).

Taula 4. siRNA MORFL1 i MORF4L2

MORF4L1 Stealth RNAi #HSS145886 and #HSS145887 (Invitrogen)

MORF4L2 Stealth RNAi #HSS114413 and #HSS114414 (Invitrogen)

2.4 Western blotting

Pel gel d'electroforesis SDS-PAGE, es van barrejar les mostres amb Laemmli loading buffer (60mM Tris-HCl pH 6.8, 2% (w/v) SDS, 10% glicerol, 0.2 mg/ml bromofenol blau i 0.1 M DTT), desnaturalitzat a 70-95°C durant 5-10 minuts i carregat en un gel tris- glycine-SDS PAGE. La concentració de proteïnes en els lysats es va determinar mitjançant BioRad Bradford Protein Assay. Les proteïnes es van separar al gel per electroforesis utilitzant l'aparell de Bio.Rad. Seguidament, les proteïnes es van transferir a la membrana de Invitrolon PVDF (Invitrogen) o IMMOBILON PVDF (Millipore) mitjançant el sistema de transferència de Bio-Rad, utilitzant el buffer que conté 25 mM Tris base, 192 mM Glycine i entre un 10 o 20% de metanol (depenent del pes molecular de les proteïnes d'interès). Les membranes es van incubar almenys durant una hora en buffer de bloqueig al 5% de llet en pols amb TBS-T (TBS amb 0.1% Tween-20). Totes les incubacions dels anticossos es van dur a terme amb el buffer de bloqueig a 4°C o/n sota agitació constant. Seguidament, es van rentar les membranes tres vegades durant 10 minuts cada vegada amb TBS-T i incubat durant una hora amb l'anticòs secundari horseradish peroxidase (HRP), diluït amb el buffer de bloqueig d'acord amb les

indicacions de l'informe de l'anticòs. Després dels tres rentats de 10 minuts amb TBS-T, les proteïnes d'interès es van identificar mitjançant la detecció del complex anticòs HRP amb quimiluminescència utilitzant el kit Western blotting Detection ECL o ECL-Plus (GE Healthcare) seguint els protocols estàndards. En alguns casos, les mostres es van resoldre en uns gels comercials NuPAGE Novex 4-12% Bis.Tris o 3-8% Tris-Acetate Gels (Invitrogen).

2.5 Immunofluorescències

Es van plaquejar les cèl·lules en cobreobjectes, es van fixar amb paraformaldehyde al 4% durant 10 minuts a temperatura ambient i permeabilitzar amb 0.02% Tween-20 en PBS. En altres casos, les cèl·lules es van ficar en els cobreobjectes. Les cèl·lules un cop fixades es van incubar durant 45-60 minuts a temperatura ambient amb buffer de bloqueig (4% FBS i 0.02% Tween-20 amb PBS) i tenyides amb l'anticòs primari a 4°C o/n. El següent dia, es van rentar les cèl·lules tres vegades amb 0.02% Tween-20 amb PBS durant 5 minuts cada vegada. Posteriorment, es van incubar els cobreobjectes amb l'anticòs secundari conjugat amb qualsevol dels Alexafluor 488 o 594 (Invitrogen), durant 30-45 minuts a temperatura ambient. Després de tres rentats amb 0.02% Tween-20 amb PBS, es van muntar els cobreobjectes amb 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) amb VECTASHIELD (Vector Laboratories). Les immunofluorescències es van observar amb un microscopi confocal (Olympus BX60) i les imatges es van obtenir utilitzant una càmera SPOT RT Mono-2000 (Diagnostic instruments).

2.6 Co-immunoprecipitacions

Pels assajos de co-immunoprecipitacions (co-IP), les cèl·lules es van recollir amb una confluència del 80-90%, prèviament es van rentar dos vegades amb PBS. Els lysats de les cèl·lules es van obtenir a partir del buffer de lysis que conté 20mM Trisc-HCl (pH 8.0), 100-150 mM NaCl, 0.5% Nonidet P-40, 1 mM EDTA amb inhibidors de proteasa i fosfatasa (Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablets, Roche Diagnostics, i 5 mM NaF). En alguns casos vam lysar les cèl·lules amb NETN buffer (20 mM Tris pH 7.5, 1 mM EDTA, 0.5 NP-40 i 350 mM NaCl). Les cèl·lules es van incubar amb el buffer de lysis durant 15 minuts a 4°C i es va aclarir dos vegades mitjançant la centrifugació a 13,000 x g durant 20 minuts. El precleaning es va dur a terme amb una incubació d'una hora amb Protein G Sepharose Fast Flow (GE Healthcare) a 4°C. Les immunoprecipitacions es van dur a terme utilitzant de 2.5 a 5 µg d'anticòs a 4°C o/n. Seguidament, les proteïnes van ser incubades

durant una hora a 4°C amb Protein G Sepharose Fast Flow (GE Healthcare) i es van rentar tres vegades amb buffer de lysis, desnaturar a 70-95°C durant 5-10 minuts abans de carregar les mostres en un gel d'electroforesis SDS-PAGE.

2.7 Co-affinity purification

Pels assajos de co-affinity purifications (co-AP) es va transfectar el plàsmid (1.5 µg) en les cèl·lules HEK293/HeLa en cada pou de dis, mitjançant Lipofectamina 2000 (Invitrogen) o Fugene[®]6 (Roche Diagnostics). Després les cèl·lules van créixer durant 48 hores i seguidament lysades amb buffer que conté 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), de 100 a 150 mM NaCl, 0.5% Nonidet P-40, 1 mM EDTA i inhibidors de proteasa (Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablets, Roche Diagnostics). Els lysats es van aclarar dos vegades amb una centrifugació de 13,000 x g abans de la purificació del complex utilitzant els beads de glutathione Sepharose (GE Healthcare) durant una hora a 4°C. Seguidament, els beads es van rentar tres vegades amb buffer de lysis i desnaturats a 70-95°C durant 5-10 minuts abans de carregar les mostres en un gel d'electroforesis SDS-PAGE.

2.8 Estudis en *Caenorhabditis elegans*

Els cucs es van cultivar d'acord amb els protocols estàndards. Es van sembrar en agar NGM amb *Escherichia Coli* OP50 [191]. La soca Bristol N2 es va utilitzar com a wild-type. Les soques portadores de mutacions estudiades en aquesta tesi van ser sedides pel *Caenorhabditis* Genetics Center (University of Minnesota, Minneapolis): DW104 *brc-2(tm1086)* III/hT2 (*bli-4(e937)* let-? (*q782*) qIs48) (I;III); VC1873: *rad-51(ok2218)* IV/ nT1(qIs51) (IV;V) i XA6226 *mrg-1(qa6200)/qC1 dpy-19(e1259) glp-1(q339)* (qIs26). Les gònades dels adults es van dissecionar amb agulles de calibre fi per tal de realitzar una immunofluorescència estàndard. Els anticossos primaris an ser rat anti-RPA-1 (1:500) i Rabbit anti-RAD51 (1:100). Els anticossos secundaris van ser anti-rat Alexa 488 i anti-rabbit Alexa 568 (Invitrogen). Les gònades es van muntar amb el reactiu ProLong[®] Gold Antifade amb DAPI (Invitrogen). Per rentar les cèl·lules apoptòtiques mortes es va utilitzar SYTO 12 Green-Fluorescent Nucleic Acid Stain (Invitrogen).

2.9 Estudi de les mostres i anàlisis estadístics i genotípics

Tots els participants es van inscriure sota el Institutional Review Boards o comites ètnics aprovat per cada centre que hi participa i van donar per escrit el seu consentiment. La recerca es va dur a terme d'acord amb la Declaració de Helsinki.

La seqüència genòmica de *MORF4L1* es va obtenir de la University of California at Santa Cruz Genome Browser versió hg18 i els primers intrònics es van dissenyar utilitzant les bases de la web del programa Primer3 [192].

Els extractes cel·lulars dels 13 pacients FA no-classificats i FANCD2 monoubiquitinat, sense mutacions en *FANCI*, *FANCD1*, *FANCN*, *FANCO* o *FANCP* i incloent sis casos amb foci nuclear de RAD51 deficient, es van examinar a partir de immunoblot utilitzant l'anticòs anti-MRG15 15C [181-184]. Aquestes mostres també es van seqüenciar en tots els exons anotats per *MORF4L1* i els límits entre els exons-introns, utilitzant diferents primers.

Els portadors de mutacions *BRCA1* i *BRCA2* es van inscriure a través de 18 centres que participen en el consorci CIMBA i seguint els criteris prèviament detallats [193]. Es van recol·lectar les dades individuals i clíniques: any de naixement, descripció de la mutació, ètnia, país de residència, edat en l'últim seguiment, edat del diagnòstic de BrCa o càncer d'ovari, edat de la mastectomia profilàctica bilateral i edat de la ooforectomia profilàctica bilateral.

La genotipació es va realitzar al centre corresponent utilitzant els assajos basats en la nucleasa 5' a 3' (TaqMan; l'assaig iPLEX es va dur a terme a Queensland Institute of Medical Research (Brisbane, Australia) i conté els portadors EMBRACE, FCCC, GEORGETOWN, HEBCS, HEBON, ILUH, kConFab, Mayo Clinic, PBCS, SWE-BRCA i UPENN. Els resultats d'aquests assaig es van centralitzar i analitzar per controls de qualitat descrits prèviament [193]. Segons aquests criteris, en aquest estudi es va excloure un anàlisi.

L'estimació de la Hazard ratio es va obtenir a partir dels models de regressió de Cox sota ambdós anàlisis de regressió estàndards i tenint en compte el pes de la cohort que permet un apropament del disseny de l'estudi retrospectiu i de mostres aleatòries d'un efecte o no afecte en els portadors de mutacions [194]. Els anàlisis es van estratificar pel naixement de la cohort (<1940, de 1940 a 1949, de 1950 a 1959 i \geq 1960), segons la ètnia i pel centre d'estudi. L'estimació de la robustesa de la variança es va utilitzar per tenir en compte les correlacions familiars. El temps del diagnòstic de BrCa des del seu naixement es va modelar per la censura dels següents esdeveniments: mastectomia profilàctica bilateral, diagnòstic de BrCa, diagnòstic de càncer d'ovari, mort i la última dada en vida. Els subjectes es

consideren afectats si es van censurar en el diagnòstic de BrCa i no afectats en l'altre cas. L'aproximació del pes de la cohort implica l'assignació per separat (individus afectats i no afectats) dels pesos, de tal manera que la incidència dels pesos observats en les mostres, estigui d'acord amb els establerts en l'estimació per portadors de mutacions [194]. Aquesta aproximació s'ha vist que ajusta per la parcialitat en l'estimació de la Hazard ratio, resultant en un criteri de comprovació, que condueix a un sobremostreig de les dones afectades. Els pesos es van assignar per separat pels portadors de mutacions *BRCA1* i *BRCA2* i per un interval d'edat (<25, 25 a 29, 30 a 34, 35 a 39, 40 a 44, 45 a 49, 50 a 54, 55 a 59, 60 a 64, 65 a 69 i ≥ 70). *P* valor es va derivar del test de puntuació robust.



RESULTATS

1. Noves interaccions físiques en la via de senyalització FA/BrCa

Les proteïnes codificades pels gens de *FANC* i/o els gens *BrCa*, cooperen en una via comuna en la senyalització de la reparació al dany al DNA, la via FA/BrCa [12]. Per tal d'aprofundir en el coneixement d'aquesta via i la seva influència en el risc al càncer, es van buscar nous components a partir d'interaccions físiques proteïna-proteïna. Per fer-ho, es va utilitzar el sistema del Y2H, una tècnica genètica molecular que es basa en la identificació d'interaccions físiques entre proteïnes. Nosaltres, l'hem utilitzat amb l'objectiu d'identificar nous components de la via FA/BrCa.

A la primera fase del Y2H es van cribar 34 proteïnes, que estan implicades en diferents funcions dins la via de senyalització FA/BrCa. Segons la seva funció les podem classificar en: i/ proteïnes les mutacions de les quals causen fenotip FA, és a dir els gens *FANC* (**Taula 5**); ii/ proteïnes quinases ATM i ATR que es fosforilen en resposta al dany al DNA i conseqüentment activen la via de senyalització FA/BrCa [195]; iii/ varies proteïnes implicades en la reparació del dany al DNA i en el control del cicle cel·lular, entre aquestes destaquem *CHEK2*, que és una proteïna de punt de control del cicle cel·lular que és ràpidament fosforilada en resposta al bloqueig de les forquilles de replicació i del dany al DNA permeten la parada del cicle cel·lular en fase G_1 [196]. Aquesta proteïna interacciona amb *BRCA1* i la fosforila [197]. Mutacions en el gen *CHEK2* causen el síndrome de Li-Fraumeni i confereix una predisposició al càncer de mama [198, 199]. També destaquem dins aquest grup *ERCC1*, que actua en la via de reparació per NER i és necessària per la reparació del dany induït pel cisplatí. Aquesta proteïna forma un heterodímer amb la endonucleasa *XPF/ERCC4* que catalitza la reacció de reparació del DNA [200, 201]. Entre aquestes proteïnes de reparació també hem inclòs *BLM*, una DNA-helicasa capaç de resoldre diferents estructures del DNA. Mutacions en el gen *BLM* causen el síndrome de BLM, que té unes característiques similars al síndrome de FA, ambdues caracteritzades per inestabilitat genòmica i predisposició al càncer [202]. En aquest cribatge també hem seleccionat les topoisomerases iv/. La topoisomerasa *TOP3A* que controla la topologia del DNA semblant a com ho fa *TOPBP1*. *TOP3A* treballa conjuntament amb *BLM* amb l'objectiu de resoldre recombinacions intermediàries com les HJ. El conjunt d'aquestes proteïnes estan involucrades en varies activitats de processament del DNA. La investigació de com treballen totes aquestes proteïnes pot proporcionar una visió general dels mecanismes moleculars que són la base de varis síndromes, així com les regles generals que governen el manteniment del genoma.

Un cop seleccionades les 34 proteïnes, per tal d'incrementar la cobertura de l'interactoma es van utilitzar com a esquer (*bait*) diferents dominis o regions definides de cada proteïna. Aquests dominis es van predir a partir de la base de dades del Pfam, el qual conté informació sobre famílies de dominis [188], com també a partir de regions desordenades predites pels algorismes del PONDR [189]. Aquestes regions desordenades, manquen d'estructura terciària i semblen ser comuns en proteïnes nuclears involucrades en el cicle cel·lular, així com en processos de transcripció i senyalització [203, 204]. Finalment, també es va utilitzar com a *bait* la seqüència completa de la proteïna ORF. Conseqüentment, es va obtenir un total de 137 *baits*, provinents de les 34 proteïnes inicials. Aquests múltiples *baits* són els que es van utilitzar pel cribatge del Y2H, com s'observa a la **Taula 5**.

Nom proteïna	Síndrome	Baits (ORF, PFAM o PONDR)	5' AA	3' AA	Baits totals	
Via de senyalització FA/BrCa						
FANCA	FA Grup I	Mito-LTXXQ	1	149	5	
		RestA	150	655		
		RestB	656	1253		
		FA domain	1254	1316		
		RestC	1317	1455		
FANCB			full length	1	859	3
		Disord-Middle	356	470		
		Disord-Cterm	744	859		
FANCC			full length	1	558	3
		HCARG-Bromodomain	1	65		
		C-term-DNA fragmentation	461	558		
FANCE			full length	1	536	5
		DUF1983	1	36		
		Disord-FANCC interaction	138	337		
		MAD3-BUB1	291	387		
		Cterm	388	536		
FANCF			full length	1	374	4
		N-term	1	139		
		Disord-Middle	116	230		
	C-term	139	374			
FANCG		full length	1	622	5	
	Disord-Nterm	1	50			
	Disord-Middle	287	343			
	TPRs	209	547			
	C-term	547	622			
FANCL		full length	1	375	5	
	C3HC4-PHD	307	362			
	wd40-1	75	124			
	wd40-2	147	202			
	wd40-3	243	275			
FANCM		Disord-Nterm	1	300	7	
	Disord-Middle	568	729			
	Disord-Middle	764	912			
	Disord-Middle	1093	1254			
	Disord-Middle	1281	1816			
	SMC-Ku-Helicase	452	581			
	ERCC4-C-term	1819	2048			
FAAP24		full length	1	215	1	
FANCD2	FA Grup II	Disord-Cterm-DED-Yfcl	1	79	8	
		DYNEIN	66	597		
		EXO70	124	632		
		DiverseA	632	862		
		Disord-Cohesin-MAP	856	910		
		Disord-Middle	949	1007		
		MER-SNF2	887	1292		
		Disord-Cterm	1389	1451		
KIAA1794/FANCI		Lipocalin fold	1	650	4	
			612	650		
	Arm repeat	612	1268			
			985	1207		
FANCI/BRIP1	FA Grup III i BrCa	Disord-Nterm	1--248		5	
		DEAD	248	415		
		DING	239	887		
		HELIC	698	849		
		Disord-Cterm	874	1249		
FANCD1/BRCA2			N-term	1	/66	8
		SNF2	766	1073		
		BRCA2repeatS	1002	2085		
		BRCA2helic	2479	2667		
		BRCA2ob1	2670	2800		
		Tower	2831	2872		
		BRCA2ob3	3052	3190		
		Diverse-Cterm	2854	3418		
FANCN/PALB2		Disord-Nterm	1	393	5	
	Disord-Middle	428	575			
	Disord-Middle	610	863			
	Disord-Middle	945	1025			
	WD40	1025	1186			

Quinases d'activació de la via en resposta a dany al DNA

ATR	Seckel	N-term	1	894	7
		HEAT-Diverse	799	1365	
		Diverse	1370	1695	
		TPRs-FAT-MAD	1707	1986	
		MAD3-BUB1	1950	1980	
		PIK3	2321	2567	
		PIK3-FATC	2321	2644	
ATM	Atàxia telangiectàsia	FAT	2096	2491	9
		PIK3-FATC	2711	3056	
		BDHCT	1	356	
		Disord-Middle	401	488	
		DiverseA	356	971	
		HEATa	1037	1100	
		Disord-Cterm	2502	2612	
		DiverseB	1101	1445	
HEATb-FAT	1728	2491			

Proteïna de deubiquitització de la via FA

USP1		full length	1	785	4
		Disord-Nterm	1	77	
		Disord-Middle	224	488	
		Disord-Cterm	613	785	

Topoisomerases involucrades en la reparació del DNA

TOPBP1		Nterm-BRCTs	1	184	7
		Disord-Middle	196	264	
		Disord-Middle	362	497	
		Disord-Middle	643	836	
		BRCTs	184	638	
		Disord-Middle	931	1173	
		UPF0004-BRCTf	638	1435	
TOP3A		Topo	1	595	3
		Diverse	595	811	
		Disord-GRF-Zinc	745	1001	

Altres proteïnes involucrades en la reparació del dany al DNA

RAD51		full length	1	339	3
		HHH	1	77	
		Rec	73	339	
BRCA1	BrCa	MIF_Diverse	1	113	7
		BRCTs	1601	1801	
		DiverseA	254	650	
		DiverseB	650	1021	
		DiverseC	1021	1601	
		Brota	1601	1682	
		BRCTb	1715	1801	
CHEK2	BrCa i Li-Fraueni	full length	1	586	5
		Disord-Nterm	1	136	
		FHA	156	235	
		Disord-Cterm	501	586	
		Pkinase	263	413	
BLM	BLM	N-term-BDHCT	1	411	3
		BDHCT-DEAD	412	984	
		Disord-Cterm	1289	1417	
XPF/ERCC4	Xeroderma pigmentosum grup F	full length	1	916	4
		RIH-DUF809-1919	232	400	
		ERCC4-Nterm	683	916	
		Disord-Middle	442	541	
ERCC1		full length	1	297	4
		Disord-Nterm	1	105	
		RAD10	99	166	
		HHH-Cterm	259	297	
H2AFX		full length	1	143	1
EMSY		Disord-Nterm	1	108	3
		Diverse	108	1269	
		Disord-Cterm	1269	1321	
C19orf40		MUS81	108	215	1
XRCC3		full length	1	346	1
TERF2		full length	1	500	1
NBS1		full length	1	754	1
ZBTB32		full length	1	487	1
RPA1		full length	1	616	1
DSS1/ SHFM1		full length	1	70	1
MRE11		full length	1	680	1

Taula 5. Taula amb les proteïnes involucrades en la via de senyalització FA/BrCa distribuïdes segons la seva funcionalitat. Es mostren els *baits* dissenyats per cada una d'elles segons els dominis familiars del Pfam, els algorismes del PONDR i la seqüència completa de la proteïna (ORF). Taula mostrada en la pàgina anterior.

Per l'obtenció d'aquest *baits* va ser necessària la síntesi de cada un d'ells mitjançant la PCR a partir de cDNA *human fetal brain* i amb els seus encebadors (*primers forward i reverse*) corresponents. Posteriorment les PCR obtingudes van ser verificades en gel d'agarosa (**Figura 16**). Finalment, es va procedir al clonatge dels *baits* obtinguts en el vector pDONR201 (Invitrogen) (**Figura 14**). Per aquest clonatge es va utilitzar el sistema del Gateway (Invitrogen), el qual té com a objectiu la modificació dels llocs de recombinació *att* per tal d'augmentar l'eficiència i l'especificitat de la reacció. Un cop els *baits* van ser clonats, es va verificar la seva seqüència, obtenint un total d'aproximadament un 60% de clonatges correctes, és a dir, 81 *baits* clonats en el vector pDONR201 (**Figura 16**). La resta no es van poder clonar per diferents raons, unes de les principals va ser la síntesi aberrant del *primer* en 5' o la grandària del cDNA que es volia amplificar. De les 34 proteïnes seleccionades inicialment, només en cinc no es va poder clonar cap *bait* (MRE11A, NBS1, TERF2, XRCC3 i ZBTB32). Per tal de comprovar que els *baits* es van clonar correctament, se'n va verificar la correcte expressió d'alguns d'ells en línies de cèl·lules humanes. Per fer-ho, es van clonar alguns *baits* en el vector de destinació pDEST27 GST-N-term (**Figura 14**). Posteriorment aquest vector va ser transfectat a la línia cel·lular HEK293 (**Figura 16**) i es va comprovar la seva expressió mitjançant l'anàlisi per Western Blot.

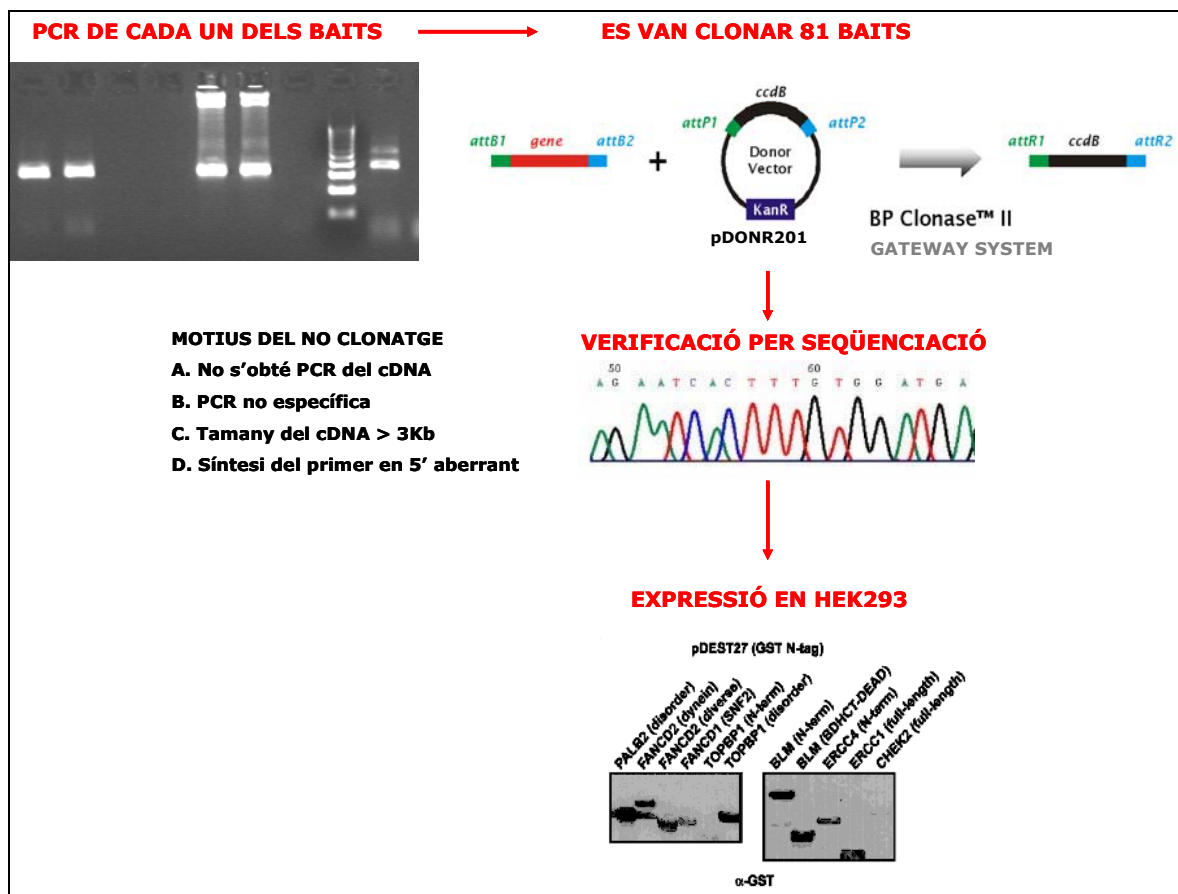


Figura 16. Passos a seguir per a l'obtenció dels baits de cada proteïna. Comprovació de la mida dels gens amplificats. Posterior clonatge en el vector donador pDONR201 mitjançant el sistema Gateway. Verificació per seqüenciació de la pauta de lectura correcte i que el gen transformat també sigui l'esperat. Per últim, comprovació de l'expressió d'alguns dels gens en cèl·lules HEK293.

Un cop confirmada la seqüència i l'expressió, es va procedir al cribatge del Y2H utilitzant les soques de llevat AH109 i Y187 pel mètode del *mating* [186, 187, 205] (explicat a l'apartat de materials i mètodes). Per tal de transfectar cada un dels baits en les corresponents soques de llevat, prèviament es va clonar cada vector donador pDONR201 amb el seu bait corresponent, en el vector de destinació pPC97 mitjançant el sistema del Gateway. Aquest vector conté el domini BD i la síntesi de LEU2, com s'observa a la **Figura 15**. Un cop clonat se'n va verificar novament la seva seqüència i finalment es va procedir a la transfecció a la soca de llevat AH109. D'aquesta manera la soca AH109 pot créixer en un medi selectiu sense LEU2 (**Figura 17**). Mentre que la soca Y187 va ser transfectada amb un vector comercial (Invitrogen) pPC86 que conté la llibreria de cDNA anomenada presa (*prey*), el domini AD a més de la síntesi de TRP1, el qual li permet a la soca créixer en un medi selectiu sense TRP1 (**Figura 15**). Aquestes sistema té la

peculiaritat de tenir un *background* baix i una especificitat relativament alta. Un cop les soques van ser transfectades amb els seus vectors corresponents, prèviament al cribatge es van descartar aquells *baits* que eren *self-activators* en el sistema (capaços d'induir creixement en medi selectiu sense LEU, TRP1 i amb 3AT, sense la necessitat d'interacció) (**Figura 17**).

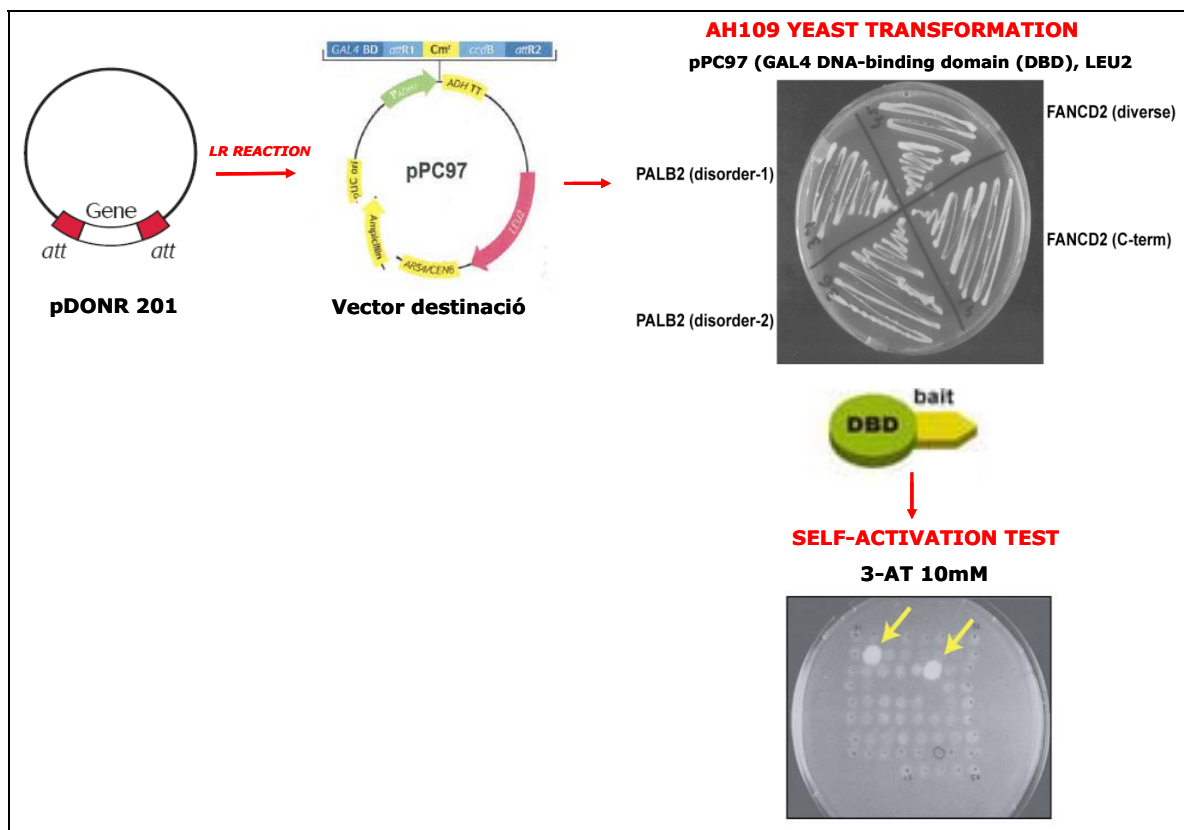


Figura 17. Obtenció dels *baits* amb el seu domini d'unió al DNA (DBD). Després de clonar el *bait* en el vector donador, es va clonar en el vector de destinació pPC97 mitjançant el sistema Gateway. Un cop clonat i verificat per seqüenciació, es va transformar a la soca de llevat AH109 i es va fer créixer en un medi selectiu sense leucina (LEU). Posteriorment, es va comprovar que aquest *bait* no s'activés per si sol. Per la comprovació es va realitzar un test amb 3AT (anàleg de la histidina), sense LEU i sense triptòfan (TRP).

Després de descartar dos *baits self-activators*, es van cribar 79 *baits* mitjançant el mètode del *mating*, descrit en l'aparat de materials i mètodes. Com a resultat positiu d'aquestes interaccions es van obtenir colònies que van créixer en un medi selectiu sense LEU, TRIP i HIS. Aquestes colònies poden créixer degut a l'interacció entre el *bait-prey* que formen el factor de transcripció i permeten l'activació del gen informador HIS i el conseqüent creixement de les colònies de llevat en el medi selectiu sense HIS. En 35 (44%) no es va trobar cap interacció, és

a dir, no van créixer colònies, la qual cosa és consistent amb les observacions d'estudis previs de llarga escala sobre el Y2H [206].

De les interaccions obtingudes, es van escollir aquelles a priori amb una alta fiabilitat, basant-nos en criteris sobre la tècnica i/o biologia: i/ més d'una troballa (ex. diferents colònies de llevat en un cribatge particular); ii/ troballes que estiguin representades per diferents fragments de cDNA en un *prey*; iii/ *baits* en menys de cinc *preys* diferents i en múltiples troballes; iv/ *preys* involucrats en processos biològics esperats per la via FA/BrCa com la resposta al dany al DNA o la regulació del cycle cel·lular. Alguns d'aquests exemples estan representats a la **Taula 6**. Segons aquests criteris, es van identificar 27 interaccions d'alta confidencialitat, com es mostra a la **Taula 7** i on dos d'aquestes són prèviament conegudes (BLM - MLH1 [207], i ERCC1 - ERCC4 [208]). Aquest parell de proteïnes interaccionen a través de regions desordenades i dominis familiars respectivament (**Figura 18**).

Taula 6. Exemple de les troballes obtingudes en el cribatge del Y2H

Nom proteïna	Baits (ORF, PFAM o PONDR)	5' AA	3' AA	Colònies o troballes
CHEK2	full length	1	586	CA436975.1 CNN3 LDHA
	FHA	156	235	NFKB1
FANCD1/BRCA2	BRCA helicasa	2479	2667	E6TP1 E6TP1 E6TP1
FANCN/PALB2	Disord-Middle	1	393	No clonat
	Disord-Middle	428	575	No colònies
	Disord-Middle	610	863	MORF4L1 MORF4L1 MORF4L1 MORF4L1

En el cas de CHEK2, es van obtenir troballes a partir del *full length* de la proteïna utilitzada com a *bait*. En aquest cas, es van obtenir múltiples troballes de diferents *preys* (no estan representats tots el *preys* obtinguts per aquest *bait*). A partir del domini FHA de CHEK2 utilitzat com a *bait*, es va obtenir una troballa representada per un sol *prey*. Del *bait* BRCA helicasa de la proteïna FANCD1/BRCA2 es van obtenir múltiples troballes representades per un sol *prey*. De les diferents regions desordenades de FANCN/PALB2 utilitzades com a *baits*, també se'n va obtenir múltiples troballes representades pel mateix *prey*. En aquest cas, ens vam centrar en aquesta interacció perquè el *prey* obtingut està involucrat en la reparació del DNA i perquè el *genome wide association study* (GWAS) informa de la possibilitat que variants genètiques en aquest loci, estiguin associades amb un increment del risc a càncer de mama (BrCa). A més, tal i com s'ha comentat anteriorment, considerem més fiables aquelles troballes representades per diferents fragments de cDNA en un *prey*. En alguns casos, no es van obtenir troballes, és a dir, no van créixer colònies de llevat.

Taula 7. Taula que mostra les 27 interaccions obtingudes a partir del sistema del Y2H

Proteïna	Bait (ORF, PONDR o PFAM)	Prey	Gene Ontology		
			Funció	Procés	Component
ATR	Diverse domains	FIBP1	Activitat quinasa I kappaB	Transducció de senyal	Complex I kappaB Citoesquelet, nucli i citoplasma Citoplasma i citoesquelet
	Diverse domains	FIBP2	Unió zinc-finger	Regulació negativa de la proliferació cel·lular	
	Diverse domains	FIBP3			
BLM	N-term-BDHCT	FIBP4	Serin proteasa	Processos metabòlics	Lisosoma
	Disord Cterm	MLH1	Contribueix a la unió de la cadena senzilla de DNA	Resposta al dany al DNA , DSB via NHEJ	Complex MutLalfa
	Disord Cterm	FIBP5	Ubiquitina lligasa	Reparació del DNA i ubiquitinització	Complex central de FA
CHEK2	Full lenght	FIBP6	Proteïna d'unió	Reparació del DNA i remodelació de la cromatina	Nucli
	FHA	FIBP7	Factor de transcripció del DNA	Regulador positiu de la transcripció	Complex NFkB
FANCB	Disord Middle	FIBP8	Proteïna d'unió al seleni	Transport de proteïna	Membrana, citoplasma i nucli
FANCC	HCARG-Bromodomain	FIBP9	Factor de transcripció d'unió al DNA	Desenvolupament embrionari	Citoplasma i nucli
FANCD1/ BRCA2	Helicase	FIBP10	Substrat de la kinasa neuronal CDC2	Regulació de la diferenciació neuronal	Component cel·lular
	Helicase	FIBP11	Activador de la GTPasa	Regulador de l'activitat RAP GTPasa	Component cel·lular
	Helicase	FIBP12			Centrosoma
	Tower	FIBP13	Domini proteic d'unió específic	Organització del fus mitòtic	Centrosoma
FANCF	Cterm	FIBP14	Ubiquitina	Interactor de ERCC1 i RAD23A	Complex receptor GRIP/AMPA
	Cterm	FIBP15	Funció molecular	Processos biològics	
FANCL	C3HC4-PHD	FIBP16	Regulació del cicle cel·lular i proliferació		Complex trimolecular de les membranes de l'endosoma Transmembrana Citoesquelet d'actina
	C3HC4-PHD	FIBP17	Activador de PIKFYVE	Transducció de senyals	
	C3HC4-PHD	FIBP18	Regulació del flux de l'ió de calci	Activador del canal de calci	
	C3HC4-PHD	FIBP19	Enzim activador d'activitat	Transducció de senyals. Unir PP1c delta i incrementar l'activitat fosfatasa	
FANCM	Disord Middle	FIBP20	Activitat proteïna tirosina fosfatasa	Processos cel·lulars, com el control de l'adhesió epitelial	Receptor transmembrana tipus PTP
PALB2	Disord Middle	FIBP21	Unió de proteïnes per l'extrem N-terminal	Reparació del DNA via HR i remodelador de la cromatina	Component del complex NuA4 acetiltransferasa i Sin3-HDAC
TOP3A	Diverse	FIBP22	Proteïna transportadora que s'uneix a les seqüències específiques del DNA	Diferenciació cel·lular i transport de trasllin	Nucli i citoplasma
TOPBP1	Disord-Middle	FIBP23	Unió de proteïnes	Processos de metabolització del mRNA	Nucli i citoplasma
	Disord-Middle	FIBP24	Diferenciació epitelial	Queratinització	Nucli i citoplasma
USP1	Disord-Middle	FIBP25	Activitat transportadora de proteïnes	Regulador de la recombinació del DNA	Component cel·lular
XPF/ ERCC4	ERCC4-Nterm	ERCC1	Proteïna d'unió al dany al DNA	Funció en la via de reparació del DNA per NER	Nucli i citoplasma

Amb un nom codificat per cada interacció obtinguda, el procés biològic en el que estan involucrades i les dos interaccions prèviament conegudes.

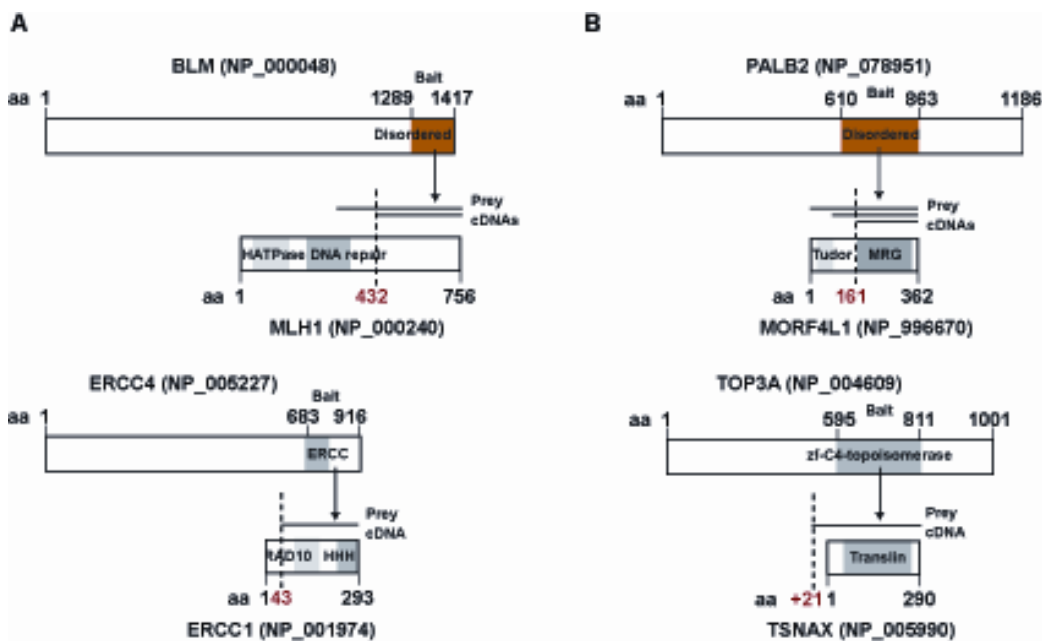


Figura 18. Exemples de regions d'interaccions (a) Al panell de dalt: BLM interacciona físicament amb MLH1 a través de la seva regió C-terminal, la qual és predita per PONDR per ser una regió desordenada (quadre taronja), entre els amino-acids (aa) 1,289-1,417 (NP_000048). En el cribatge, han estat identificades múltiples colònies de llevat, almenys dos de diferents, però parcialment solapades amb *MLH1 full length Open Reading Frame* (ORF) que mapen el domini d'interacció entre els aa 432-756. Al panell de baix: ERCC4 interacciona físicament amb ERCC1 a través de la seva regió C-terminal que conté el domini familiar ERCC definit per Pfam. (b) Al panell de dalt: representa la interacció física entre *PALB2* i *MORF4L1* a través de les regions desordenades predites per PONDR i per l'extrem C-terminal de *MORF4L1* respectivament. En el cribatge, van ser identificades divuit colònies de llevat, almenys tres de diferents, però parcialment solapades amb *MORF4L1* ORF. Al panell de baix: *TOP3A* interacciona físicament amb *TSNAX* a través del seu domini familiar topoisomerasa. En el cribatge, van ser identificades múltiples colònies de llevat representades per totes elles pel gen complet de *TSNAX* ORF.

Per tal de corroborar els resultats del Y2H es van validar algunes d'aquestes 27 interaccions utilitzant tècniques alternatives bioquímiques com *co-affinity purification* (co-AP) i/o *endogenous co-immunoprecipitation* (co-IP), en cèl·lules de mamífer HEK293. Els resultats obtinguts suggereixen la fiabilitat de quatre interaccions CHEK2-NFKB1, PALB2-MRG15, TOP3A-TSNAX i USP1-KPNA1 (**Figura 19**). Estudis prèvis referents a TOP3A mostren que aquest va ser co-purificat amb BLM, FANCA i proteïnes de replicació [13]. TSNAX (també conegut com a *traslin-associated factor X*, TRAX) prèviament es va trobar que interaccionava físicament amb MRG15/*MORF4L1* [205]. Respecte a USP1 i KPNA1 van ser co-purificades en altres estudis [209].

Una d'aquestes interaccions físiques amb les que ens varem centrar, ha estat descrita recentment: PALB2 i MRG15 [175, 176] .

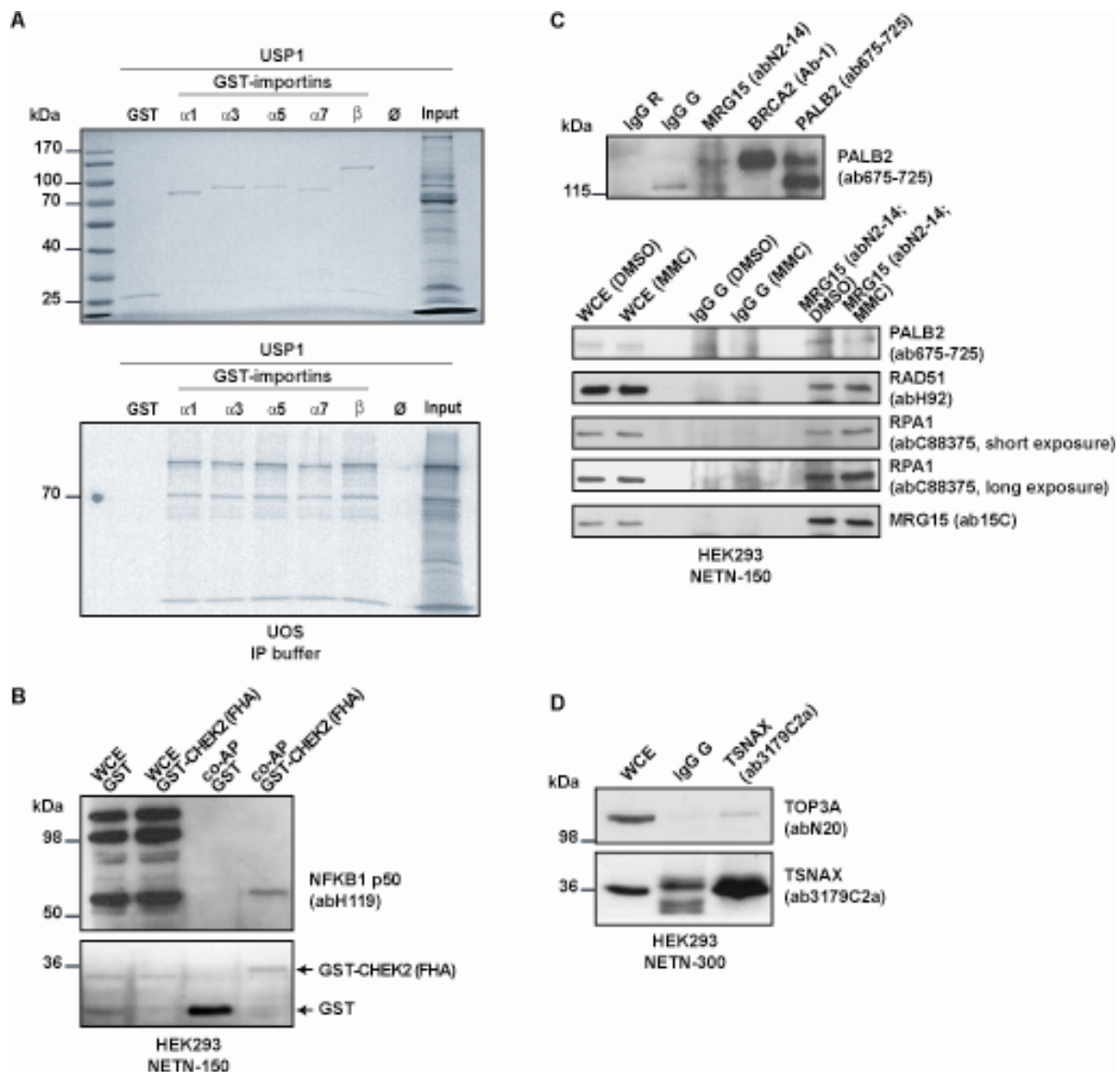


Figura 19. Validació de les interaccions mitjançant co-immunoprecipitacions i co-AP (A) Co-AP de USP1 i importins. El panell de dalt, gel tenyit amb Coomassie. El panell de baix, una autoradiografia per sobre 35-USP1 co-purificada amb GST-importins però no amb el control GST. Els pesos moleculars estan indicats (kDa, kilo Daltons). (B) Co-AP de GST-CHEK2 (en el criatge del Y2H es va utilitzar el domini FHA) amb NFKB1 endògena (ab, anticòs) en els extractes cel·lulars de HEK293 i utilitzant el tampó NETN amb 150 mM de NaCl. WCE, whole-cell extract. (C) Al panell de dalt, co-IP de PALB2 i MRG15 o BRCA2. IgG, control negatiu de la immunoglobulina (R, rabbit; G, goat). Al panell de baix, co-IP de MRG15 i PALB2, RAD51 i RPA1. MMC, mitomycin-C. (D) Co-IP de TOP3A i TSNAX en les HEK293 utilitzant un tampó amb altes condicions d'astringència (300 mM NaCl).

2. Interacció entre PALB2-MRG15

Família de proteïnes MRG

Originalment, *MORF4* (*moratlity factor on chromosoma 4*) va ser aïllat en estudis basats en l'habilitat d'induir senescència replicativa en cèl·lules humanes immortals [210]. Com a resultat de la caracterització molecular de MORF4, es va identificar una nova família de set gens, anomenada família MRG [211]. Dos dels membres de la família són MRG15/*MORF4L1* (*moratlity factor on chromosoma 15*) i MRGX/*MORF4L2* (*mortality factor on chromosoma X*) [210].

Les proteïnes de la família MRG són presents en molts eucariotes, des dels llevats fins als humans. Tan MORF4 com MRG15 i MRGX comparteixen el domini MRG, altament conservat entre totes les proteïnes que el contenen, una regió d'unió a ATP/GTP seguida de la regió helix-bucle-helix (HLH) i leucine zipper (LZ) a l'extrem C-terminal. Aquestes tres proteïnes tenen una part C-terminal comuna i una part N-terminal diferent (**Figura 20**). Es creu que la diferència en l'extrem N-terminal és la base de la seva funcionalitat diversa. En termes generals, la família MRG està associada a la proliferació cel·lular, la regulació transcripcional i la reparació del dany al DNA. Addicionalment MRG15 i MORF4 contenen la senyal de localització nuclear (NLS) bipartida, flanquejada per llocs de fosforilació, mentre que MRGX conté únicament una regió NLS. Consistent amb els motius NLS, aquestes tres proteïnes es localitzen al nucli [212]. Totes tres proteïnes interaccionen amb la histona acetiltransferasa (HAT) i deacetilasa (HDAC), suggerint una funció en la regulació dinàmica de la cromatina [213].

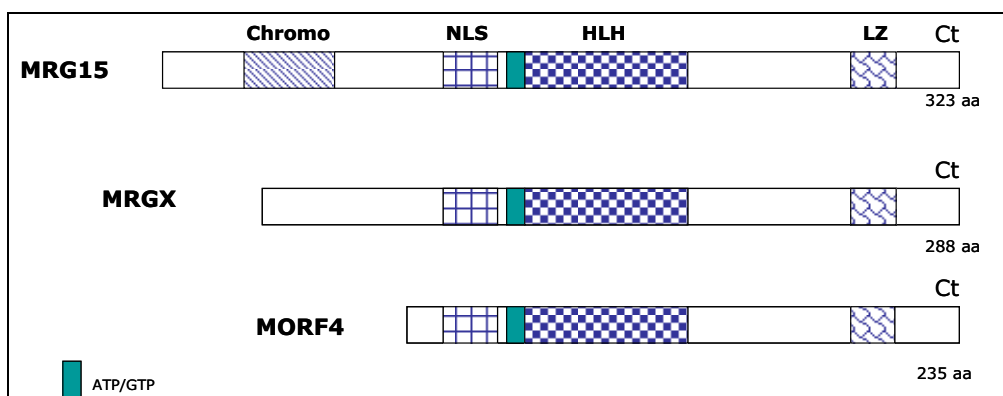


Figura 20. Diagrama esquemàtic de l'estructura de MRG15, MRGX i MORF4. Chromo (Chromodomain), NLS (nuclear localization signal), HLH (helix-loop-helix), LZ (leucine zipper), Ct (C-terminal), aa (aminoàcids). Figura adaptada de [210].

MORF4: És una proteïna codificada per 235 aa, sent la més petita de la família. Té l'habilitat d'induir senescència en línies cel·lulars immortals humanes.

MRG15: També conegut com a producte del gen **MORF4L1** (*mortality factor 4 like 1*), és la proteïna més llarga, codificada per 323 aa i és l'ancestre evolucionat de la família, altament conservat en llevats, *C. elegans*, *Drosophila melanogaster*, plantes i mamífers, implicat en la remodelació de la cromatina [212]. MRG15 és la única proteïna de la família que conté un cromodomini prop de l'extrem N-terminal, que implica una paper en les funcions relacionades amb la cromatina i en les interaccions proteïna-proteïna. Aquesta proteïna és present en el complex de la histona acetiltransferasa/deacetilasa (NuA4/Tip60-HAT i Sin3-HDACs) i conseqüentment juga un paper important en l'activació/silenciament de la transcripció gènica. A més a més, els complexes de HAT estan implicats en la detecció del dany al DNA i la seva reparació [214]. La depleció de MRG15 en ratolins és letal en l'embrió com a resultat d'una organogènesis i proliferació inapropiada o degut a defectes en la reparació del dany al DNA [212]. L'ortòleg de MRG15 en *Drosophila melanogaster* ha estat co-purificat en el complex de la histona xaperona amb un interactor en humans de BRCA2, anomenat EMSY [215]. Consistent amb el rol en la reparació del dany al DNA, es va demostrar que l'ortòleg de *MORF* en *Saccharomyces cerevisiae*, *EAF3*, interacciona genèticament amb els gens sensibles a la radiació (*RAD*) [216]. Altres estudis informen que MRG15 interacciona a partir de l'extrem C-terminal amb la proteïna supressora de tumors de retinoblastoma (Rb) i amb la proteïna nuclear PAM14 durant la regulació de la transcripció [217].

MRGX: Està codificada per 288 aa. És el producte del gen **MORF4L2** (*mortality factor 4 like 2*). Aquesta proteïna tan sols és present en vertebrats i té una identitat de seqüència del 89% amb MRG15. Està relacionada amb la progressió del cicle cel·lular així com amb una activació de la proliferació cel·lular [183].

Tenint en compte les característiques d'aquestes proteïnes i un cop validada la interacció entre PALB2-MRG15 (**Figura 19**), es va acotar el domini d'interacció entre les dos proteïnes. Els resultats del Y2H d'aquesta interacció mostren diferents fragments de cDNA representats per un mateix *prey* (MRG15). Així, consistent amb els dominis d'interacció delineats pels resultats del Y2H, es va definir la regió d'interacció de MRG15 a partir del seu mutant, el qual li manca el domini C-terminal LZ però no del cromodomini a l'extrem N-terminal. Tal i com s'observa a la **Figura**

21, MRG15 és capaç d'interaccionar amb PALB2. De la mateixa manera i tenint en compte les característiques estructurals ja esmentades anteriorment entre MRG15 i MRGX, és possible que ambdues interaccionin amb proteïnes comunes i que participin en els mateixos processos cel·lulars. En aquest cas, la regió HLH de MRGX és necessària per co-purificar amb PALB2 (**Figura 21**). El conjunt d'aquests resultats recolzen la identificació de la interacció física entre PALB2 i MRG15 i probablement MRGX.

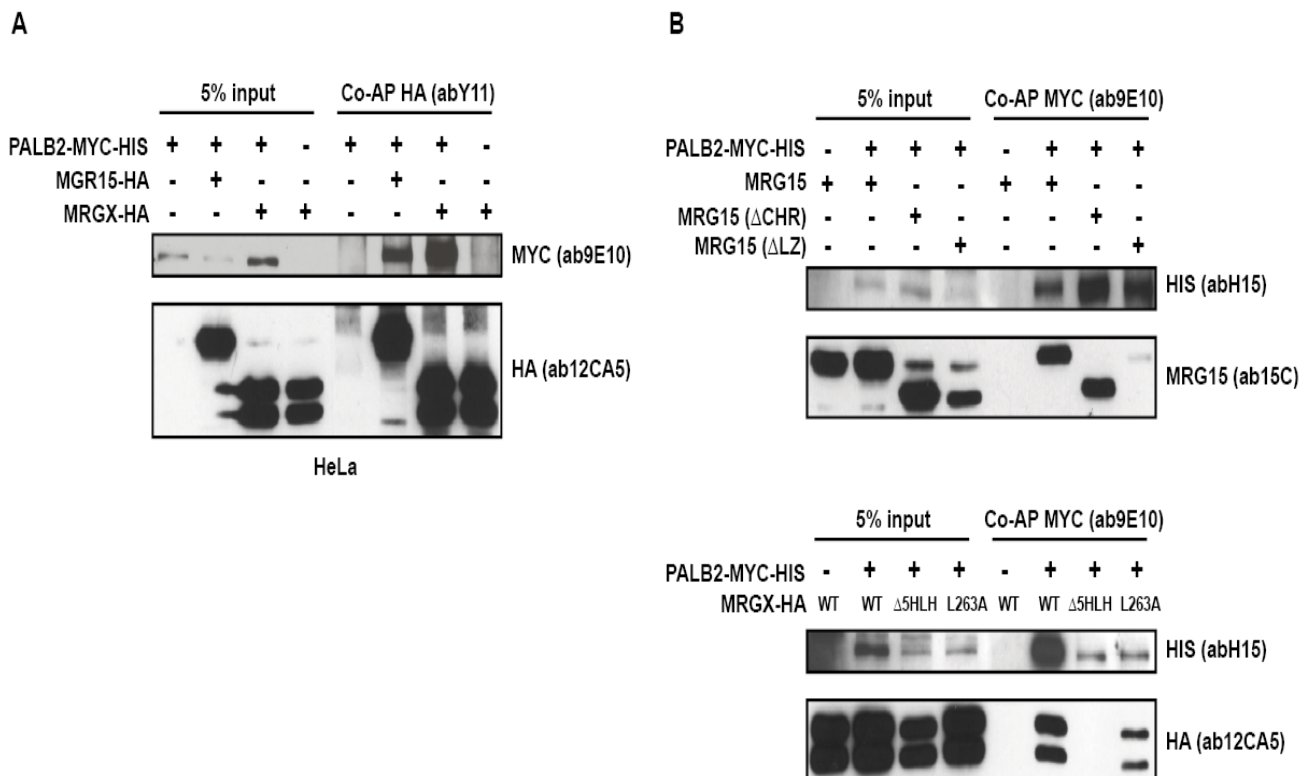


Figura 21. Resultats de les diferents co-AP per PALB2-MR15/MRGX (A) Resultats de les co-AP per PALB2-MRG15/MRGX detectades directament amb els anticossos contra els tags de la proteïna en els extractes cel·lulars de les HeLa. (B) Al panell de dalt, resultats dels assajos de co-AP utilitzant el mutant de MRG15 deplecionat pel cromodomini (Δ CHR) o el domini leucine zipper (Δ LZ). El panell de baix representa els resultats dels assajos de co-AP el mutant de MRGX deplecionat pel domini helix-loop-helix (Δ 5HLH) o per una mutació puntual L263A.

(Els anàlisi per Western Blotting dels diferents constructes de MRG15 i MRGX representats a la **Figura 21** van ser realitzats amb la col·laboració del Dr. Kaoru Tominaga, de la University of Texas Health Science Center)

3. Estudi de MRG15 com a possible gen FA

És conegut que mutacions bial·lèliques de PALB2 causen FA del grup de complementació FANCN [174, 218]. Per tant, es va investigar el paper de MRG15 com a possible gen FA dins la via de senyalització FA/BrCa. Un dels punts claus de la via és la monoubiquitinació de FANCD2 per part de les proteïnes del complex central en resposta a dany al DNA. Es va realitzar un anàlisi per WB de l'activació de FANCD2 en cèl·lules deplecionades per MRG15. Els resultats no mostren una monoubiquitinació alterada de FANCD2, la qual cosa descarta MRG15 com a proteïna del complex central (**Figura 22**).

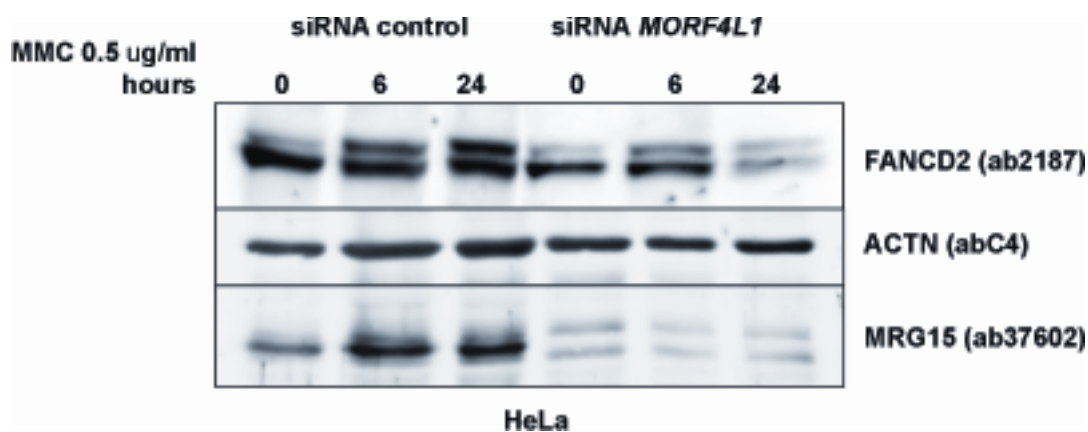


Figura 22. Anàlisi de la monoubiquitinació de FANCD2. Resultats obtinguts de la depleció de MRG15 mitjançant siRNA en la línia cel·lular HeLa i anàlisi de la monoubiquitinació de FANCD2 després de tractament amb mitomicina C (MMC).

Les cèl·lules dels pacients FA són sensibles als agents inductors de ICL tals com la MMC. Aquestes cèl·lules al no poder reparar eficientment els ICL presenten una marcada parada del cicle cel·lular en fase G₂/M. Aquesta característica, s'ha utilitzat rutinàriament com a diagnòstic de la malaltia FA [4].

En un dels articles publicats prèviament per un altre grup, s'observava sensibilitat intermèdia a MMC en els cultius cel·lulars deplecionats per MRG15, en contrast amb els cultius cel·lulars deplecionats per BRCA2 i PALB2 [175]. No obstant, en el nostre estudi, les cèl·lules MEFs deficientes en Mrg15 i les cèl·lules HeLa i MCF10A deplecionades per MRG15, no condueixen a un increment estadísticament significatiu de la mortalitat induïda per la MMC. A més, les cèl·lules deplecionades per MRG15 tampoc mostren una parada del cicle cel·lular en fase G₂/M en contrast amb les cèl·lules deplecionades per BRCA2 i PALB2.

Finalment, es van fer assajos de detecció per MRG15 a partir de 13 extractes cel·lulars provinents de línies cel·lulars de pacients FA no identificats per cap grup de complementació (cedides pel Dr. Detlev Schindler, Universitat d'Alemanya) i que presentaven una monoubiquitinació de FANCD2 positiva i on sis d'ells eren defectius per foci de RAD51. En cap dels 13 extractes analitzats, no es va observar una reducció de l'expressió proteica de MRG15 (**Figura 23**).

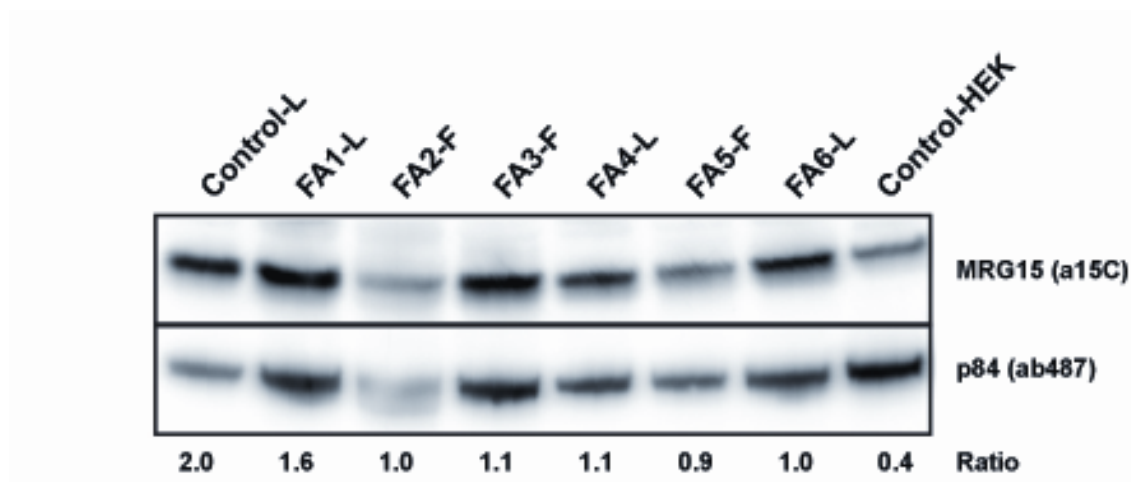


Figura 23. Anàlisi de l'expressió proteica de MRG15 en pacients FA no classificats. Es mostra la banda de la proteïna MRG15 en sis línies cel·lulars diferents de pacients FA amb mutació desconeguda que presenten una monoubiquitinació de FANCD2 normal però deficiències en la formació de foci de RAD51. (L, lymphoblast; F, fibroblast) sense mutacions en FANCD1, D1, N, O o P i dos controls (HEK293, cèl·lules embrionàries de ronyó (human embryonic kidney 293 cells)). Es va determinar la proporció de MRG15 relativa a la proteïna de la matriu nuclear p84 en un arxiu d'imatges digitals. Hi ha alguna variabilitat en l'expressió de MRG15 entre les mostres, però els nivells en els casos no estaven per sobre o sota els controls.

Per tal de comprovar més detalladament si hi havia alguna mutació o variant comuna, es va realitzar la seqüenciació de *MORF4L1* en aquestes línies cel·lulars. Aquests anàlisis tan sols van detectar unes quantes substitucions de bases i deleccions d'una sola base en els introns, i variants comunes ja descrites en els exons. El conjunt d'aquests resultats ens porta a concloure que MRG15 no és un nou gen FA.

4. MRG15 i reparació del dany al DNA

La via de senyalització FA/BrCa participa en el procés de reparació dels DSB per HR [219, 220]. Conseqüentment, un cop descartat MRG15 com a gen FA, es va estudiar la seva possible implicació en la reparació del DNA a través de la via de senyalització FA/BrCa. Com s'ha descrit en la introducció, PALB2 és un interactor nuclear de BRCA2 [173]. Tan PALB2 com BRCA2 juguen un paper crític en la reparació dels DSB mitjançant el mecanisme de reparació per HR. La depleció de qualsevol d'ells en cèl·lules de mamífer compromet la HR i provoca que aquestes siguin més sensibles a agents inductors de DSB, tals com la IR [179, 221, 222].

Tenint en compte aquestes característiques, es van realitzar diferents experiments per esbrinar el paper de MRG15 en la reparació dels DSBs. En primer lloc, es va testar la sensibilitat a IR en MEFs deficientes per MRG15 (*Morf4l1*^{-/-}) les quals mostren més sensibilitat (mesurada com a supervivència cel·lular) a la radiació que els controls wild-type (**Figura 24**). El nivell de sensibilitat a la radiació és moderat en comparació amb les MEFs *Atm*^{-/-}. La línia MEFs *Atm*^{-/-}, utilitzada com a control positiu en aquest experiment, és coneguda per la seva alta sensibilitat a la IR [31]. La sensibilitat mostrada per la línia MEF *Morf4l1*^{-/-} a IR podria suggerir que MRG15 també està implicat en el procés de reparació per HR. Aquests resultats reforcen funcionalment la interacció descrita, ja que la literatura, demostra l'estreta relació de BRCA2 i PALB2 en el complex de reparació de DSB.

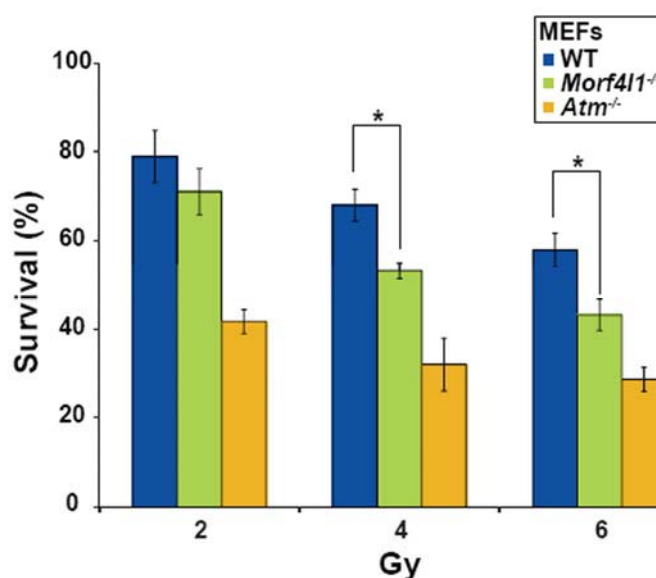


Figura 24. Mrg15 deficientes confereixen sensibilitat a la irradiació-γ. Les cèl·lules murines embrioniques de fibroblast (MEFs) mostren sensibilitat intermèdia a la irradiació-γ en relació als controls. (WT, wild-type; *Morf4l1*^{-/-}, Mrg15 deficientes i *Atm*^{-/-}, *Atm* deficientes). * Diferències significatives entre les MEFs WT i *Morf4l1*^{-/-} (test de t d'una cua P<0.01).

Contràriament als resultats obtinguts per MRG15/Mrg15, en el cas de les línies deficientes per MRGX no es van observar els fenotips sensibles a IR (també consistent amb els estudis previs [175]).

Referent a la interacció entre TOP3A i TSNAX obtinguda en el Y2H també es va estudiar la seva possible implicació en el complex de reparació dels DSB, ja que, com s'ha esmentat anteriorment, estudis previs referents a TSNAX descriuen la seva interacció amb MRG15/*MORF4L1*. Així doncs, es va realitzar el mateix assaig de sensibilització a IR en cèl·lules humanes HeLa deplecionades per TSNAX. En aquest cas, no es van observar fenotips sensibles a la IR, contràriament als resultats obtinguts per les MEFs deficientes per MRG15. Per tant, els nostres resultats suggereixen que TSNAX i MRG15 no participen conjuntament en la reparació dels DSBs. No obstant, és conegut el paper de TOP3A en el manteniment del telòmer [223], conseqüentment es va investigar el possible paper de TSNAX en aquest procés. Els resultats obtinguts mostren com la proteïna EmGFP-tagged TSNAX co-localitza amb estructures nuclears específiques amb la proteïna d'unió al telòmer TRF2 com s'observa a la **Figura 25**. D'aquesta manera, relacionem funcionalment TOP3A amb la nova proteïna interactora TSNAX.

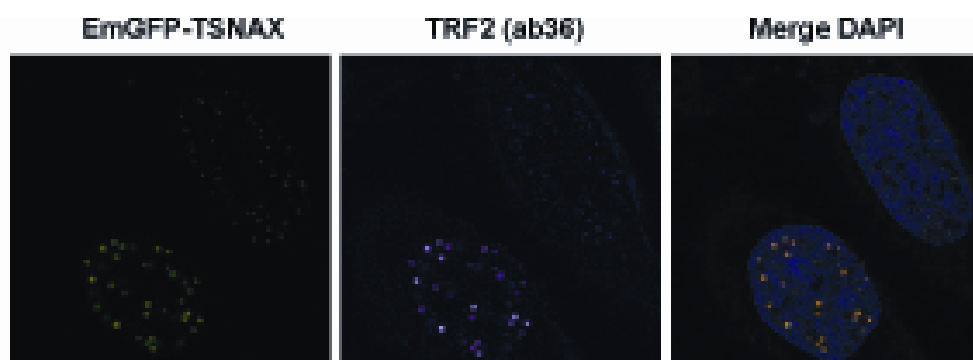


Figura 25. Co-localització de EmGFP-tagged TSNAX i TRF2 (detectat amb ab36) en estructures nuclears específiques en cèl·lules en interfase.

L'escurçament dels telòmers ha estat relacionat a la patologia FA [224-226], i s'ha demostrat que alguns productes de *FANC* participen en el manteniment del telòmer [227-229]. Aquestes observacions condueixen a especular que les interaccions entre TOP3A-TSNAX podrien tenir un paper en el manteniment del telòmer mitjançant la via de senyalització FA/BrCa. Són necessaris però, nous experiments per aprofundir en el possible mòdul funcional que relaciona aquestes proteïnes.

Tenint en compte el fenotip de sensibilització a la IR en cèl·lules deficientes per MRG15 però no per cèl·lules deficientes per MRGX ni TSNAX, es va estudiar l'implicació de MRG15 en el procés de reparació dels DSBs per HR. En el procés de reparació dels DSB per HR és necessari el reclutament de RAD51 en el lloc de dany per part de BRCA2 [230]. Aquestes proteïnes, s'acumulen en els llocs de dany juntament amb altres proteïnes implicades en la reparació per HR i formen els anomenats foci. S'ha demostrat, que la depleció de BRCA2 en cèl·lules de mamífer, impedeix la formació de foci de RAD51 provocant deficiències en la HR [230]. Amb l'objectiu d'entendre millor el paper funcional de MRG15 dins d'aquesta via de reparació i tenint en compte els resultats anteriors de sensibilitat a IR, es van aprofundir els estudis mitjançant les línies MEFs *Morf411*^{-/-}. En els treballs citats prèviament, MRG15 apareix necessari per l'associació de BRCA2/PALB2/RAD51 amb la cromatina i la formació de foci nuclear després de irradiació- γ [175]. D'acord amb aquestes observacions, els nostres resultats en les cèl·lules *Morf411*^{-/-} mostren un número més baix en la formació de foci nuclear de Rad51 després d'irradiació- γ en comparació amb les MEFs *Morf414*^{+/+} (mostres preses en diferents temps post-irradiació i utilitzant clons i cultius cel·lulars no seleccionats com es mostra en la **Figura 26**. En aquest experiment, es va utilitzar com a marcador de DSBs la histona H2AX, la qual es fosforila en resposta a IR.

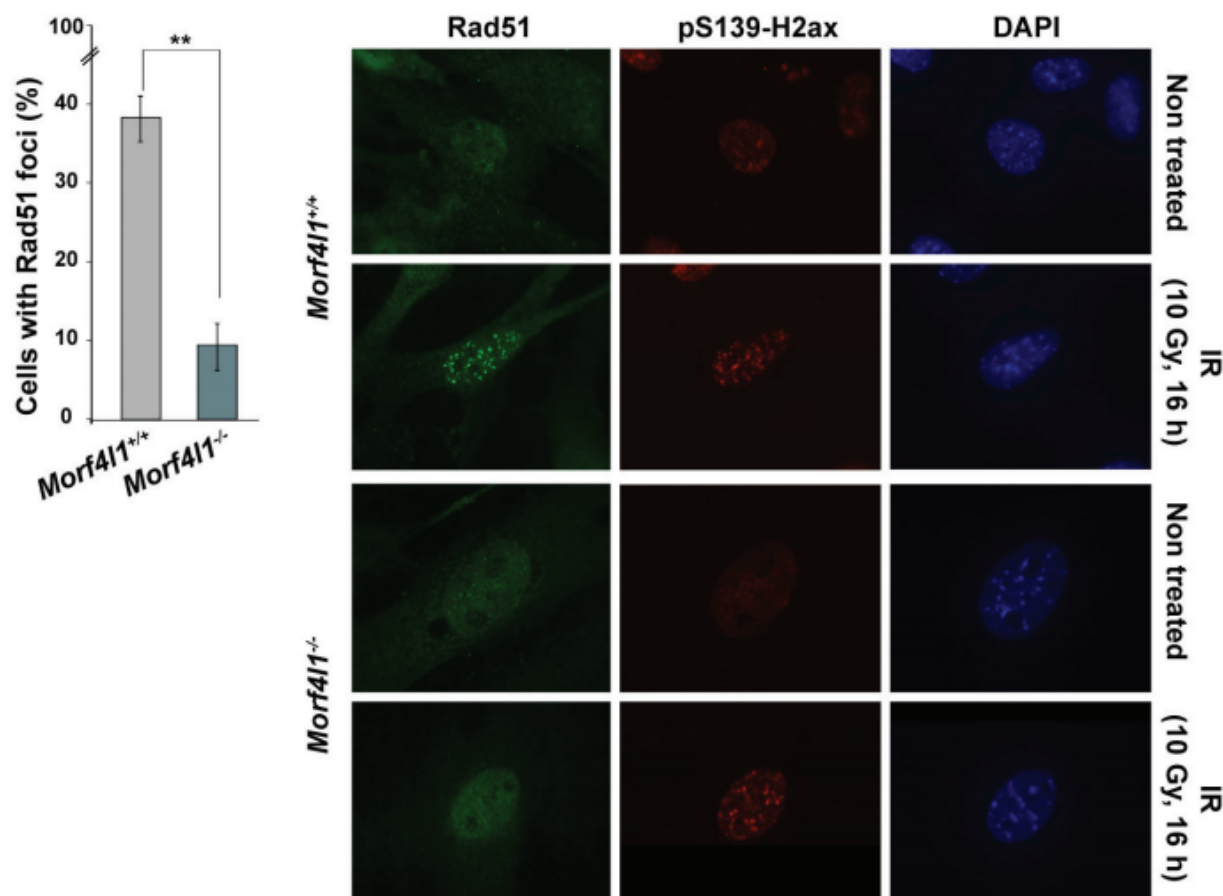


Figura 26. Les línies cel·lulars embrionàries de fibroblast de murins (MEF) *Mrg15* deficients danyen la formació de foci de Rad51. El panell de l'esquerra: número de cèl·lules amb foci nuclear de Rad51 (>4 foci per nucli) en els wild-type i en els clons de MEF *Morf411^{-/-}* després de 16 hores de tractament a 10 Gy. ** Diferències significatives (t-test, $P < 0.001$). Al panell de la dreta: imatges representatives de la immunodetecció de Rad51 i pS139-H2ax en cultius cel·lulars on s'observen els foci nuclears. DAPI, 4,6-diamidino-2-phenylindole; IR, radiació- γ .

Simultàniament, es van investigar els nivells d'expressió de diverses proteïnes involucrades en la reparació per HR en línies cel·lulars *Morf414^{-/-}*. Els resultats analitzats per WB dels extractes cel·lulars de les MEFs *Morf414^{-/-}*, mostren nivells inferiors de Brca1 i Brca2, però els resultats són variables per Rad51 (**Figura 27**). Els nivells de Palb2 no han estat mesurats perquè els anticossos utilitzats no reconeixen la proteïna del extractes cel·lulars de ratolí. El resultat obtingut per Brca2 és contrari a les dades obtingudes en estudis previs utilitzant models de cèl·lules humanes [176], no obstant, un altre estudi, mostra la reducció de BRCA2 degut a la depleció transitòria de MRG15 però no de MRGX [175]. Aquests resultats suggereixen que MRG15 és necessari pel reclutament de BRCA2 de la mateixa manera que ho és PALB2 [173]. Malauradament, no hem pogut testar si MRG15 és necessari pel reclutament de PALB2. Altres treballs publicats mostren

que el reclutament de PALB2 i la seva associació als llocs de dany del DNA, depenen de MRG15 [175]. El conjunt dels nostres resultats suggereixen la participació de MRG15 en la reparació dels DSB del DNA a través de la relació entre BRCA2, PALB2 i RAD51.

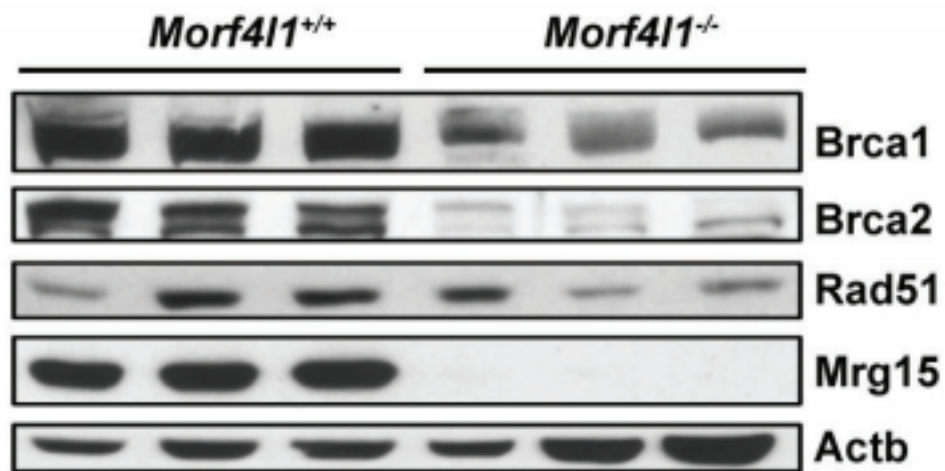


Figura 27. Nivells de Brca1, Brca2 i Rad51 i control de Actb en els extractes cel·lulars de les MEFs *Morf4l1*^{-/-} i el seu homòleg wild-type (es mostren tres clons cel·lulars per cada genotip).

5. Estudi de la funció de MRG15 en *C.elegans*

Per aprofundir en l'estudi de MRG15 en HR, es va extrapolar aquests resultats en un altre model animal, basant-nos en estudis realitzats prèviament sobre l'ortòleg de BRCA2 en *C.elegans*. Els ortòlegs de BRCA2 i RAD51 en *C.elegans* (anomenats BRC-2 i RAD-51 respectivament), interaccionen físicament i regulen la HR [231]. Els mutants per *brc-2* presenten defectes en la localització RAD-51 en els llocs de DSB presents en la meiosi o induïts pels agents de dany del DNA [232]. D'aquesta manera, els mutants *brc-2* es caracteritzen per unes línies germinals que no presenten foci de RAD-51 però sí una acumulació anòmala de RPA-1, presumiblement als llocs de DSB. A més, els mutants de *brc-2* presenten anormalitats cromosòmiques durant la fase meiòtica de la diaquinesis i conseqüentment un increment en els cadàvers apoptòtics [232, 233]. RPA-1 és una de les primeres proteïnes que s'associen als DSB i té la funció d'estabilitzar la ssDNA. Posteriorment és reemplaçada per mediadors i RAD-51 per promoure la recombinació (**Figura 4**). *C. elegans* té una proteïna ortòloga a la proteïna humana MORF (anomenada MRG-1), que com la seva proteïna corresponent a mamífers, es troba associada a la cromatina i és necessària per la supervivència de l'embrió i la proliferació cel·lular [234, 235]. Segons aquesta evidència es va investigar la connexió funcional entre BRC-2 i MRG-1 mitjançant assajos de fenocòpia entre els mutants *brc-2* i *mrg-1* (mutants *tm1086* i *qa6200* respectivament).

De manera semblant als mutants de *brc-2*, els mutants de *mrg-1* presenten un increment notable del nombre de foci de RPA-1 en cèl·lules meiòtiques en contrast amb els animals wild-type (**Figura 28**). Mentre que els animals wild-type presenten un promig de 3-4 RPA-1 foci per nucli, els mutants *mrg-1* de forma comú exhibeixen nuclis amb més de 10 foci (**Figura 28**). S'han observat dos tincions diferents per RPA-1 en els mutants *mrg-1*: una consisteix en un foci discret similar al que s'observa en els mutants de *brc-2* (**Figura 28, fletxa**), mentre que l'altre mostra una tinció més intensa i difusa (**Figura 28, cap de la fletxa**). Referent a la tinció de RAD-51 és principalment intensa en el nucli i difusa en els mutants per *mrg-1*, contràriament als mutants *brc-2* on s'observa RAD-51 principalment en el citoplasma. En els animals wild-type tan sols s'observa un foci discret de RAD-51 i una tinció en general menys intensa. Finalment, els mutants *mrg-1* mostren una alta freqüència de compactacions aberrants dels cromosomes i, com és d'esperar, un increment en les cèl·lules mortes revelades mitjançant la tinció SYTO-12 (**Figura 28**).

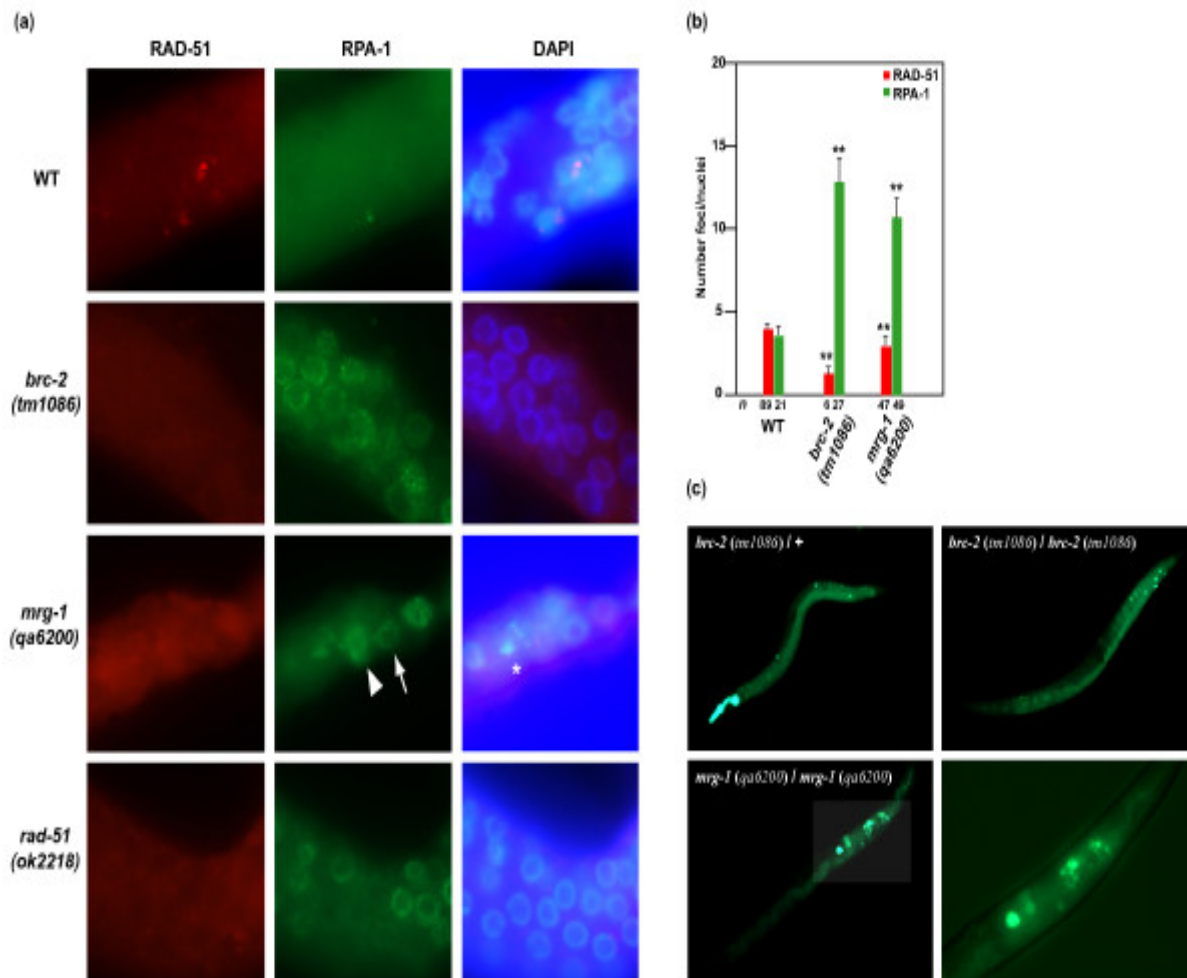


Figura 28. Estudi fenotípic dels mutants *brc-2* i *mrg-1* de *Caenorhabditis elegans*. (a) Imatges representatives de les cèl·lules meiotiques a la part distal, prop de la curva de la gònada. El foci de RAD-51 en els animals wild-type (WT) és brillant i nuclear mentre que en els mutants *brc-2* apareix menys intens i dèbilment difós en el citoplasma. En els mutants *mrg-1*, la tinció de RAD-51 apareix sovint dispers i intens en el nucli, mentre que és absent en els mutants *rad-51*. Hi ha més formació de foci nuclear de RPA-1 en cada un dels tres mutants que no pas en els animals WT. Els panells de 4,6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI) estan fusionats amb el canal vermell (pels WT i els mutants *brc-2*) i amb el canal verd (pels mutants *rad-51*). * Compactació anormal dels cromosomes. (b) Quantificació de foci per nucli de RAD-51 i RPA-1 en línies cel·lulars germinals dels animals WT i dels mutants *brc-2* i *mrg-1*. Número de cèl·lules comptabilitzades (n) i desviació estàndard de la mitjana. ** Diferències significatives en relació als animals WT (Mann-Whitney U test, $P < 0,001$). (c) Tinció de SYTO-12 en cucs adults sincronitzats. Al panell de dalt a l'esquerra: animal heterozigot per la mutació *brc-2* (segons l'expressió de la proteïna verda fluorescent a la faringe) presenta una tinció WT SYTO-12. Al panell de dalt a la dreta i de baix a l'esquerra: increment en cèl·lules positives SYTO-12 en els mutants germinals *brc-2* i *mrg-1* respectivament. Al panell de baix a la dreta: ampliació de la zona ressaltada en el panell de l'esquerra.

(Els estudis de fenocòpia en els diferents mutants de *C.elegans* que corresponen a la **Figura 28** han estat realitzats amb la col·laboració de Dr.Julian Cerón del Departament de Genètica de l'ICO-IDIBELL)

El conjunt d'aquests resultats recolzen la participació de MRG-1/MRG15 en el control de l'estabilitat genòmica de la mateixa manera que ho fa BRCA2. Aquests resultats també suggereixen que MRG15 està implicat en la reparació dels DSB per HR, ja que també presenta una lleugera disminució dels foci de RAD-51 fet que reforça que formi part del complex BRCA. En general, totes les dades presentades reforcen un paper de MRG15 en el complex BRCA i el la HR mitjançant la interacció directe de MRG15 amb PALB2.

6. MORF4L1 i el risc a BrCa

Una vegada identificada la relació molecular i funcional entre MRG15 i la reparació del DNA en els DSB, es va decidir avaluar l'existència d'alteracions o mutacions de MRG15/MORF4L1 entre els pacients amb BrCa. A rel de la identificació de mutacions bi-al·lèliques en el gen de susceptibilitat a càncer de mama *BRCA2* com a causant del grup de complementació FANCD2 i posteriorment de mutacions bi-al·lèliques de *PALB2* com a causant del grup de complementació FANCN, es va demostrar la relació entre la via de senyalització FA/BrCa i la susceptibilitat a BrCa.

Tenint en compte els resultats del nostre estudi que mostren la interacció de PALB2 amb MRG15/MORF4L1 i seguint la mateixa línia d'investigació, es va hipotetitzar que mutacions germinals o variants comunes en el gen *MORF4L1* podrien conferir un risc moderat/baix a BrCa i/o modificar el risc a càncer entre els portadors de mutacions en *BRCA1* i/o *BRCA2*. Així doncs, primerament es va seqüenciar directament els exons de *MORF4L1* i es va analitzar les seqüències en 300 pacients amb una forta agregació familiar a BrCa que no presenten mutacions en *BRCA1* o *BRCA2*, pertanyents a dos poblacions (United Kingdom, Institutet of Cancer Research i Institut Català d'Oncologia, Catalunya). En els resultats obtinguts no es va detectar cap canvi patogènic. Aquests resultats negatius, són consistents amb els descrits en un article recentment publicat per un altre grup [236]. No obstant, tenint en compte la baixa freqüència de mutacions de penetrància alta/moderada dels altres components de la via de senyalització FA/BrCa [125, 128, 237] i de la possible participació en altres tipus de càncer [238], es van realitzar altres investigacions per *MORF4L1*.

Seguidament, es va investigar si hi havia alguna variant genètica comuna en el gen *MORF4L1* associada al risc a BrCa. Aquest estudi es va realitzar a partir de resultats públics provinents de l'estudi del GWAS dut a terme pel projecte *Cancer Genetic Markers of Susceptibility* (CGEMS) [129], els quals tenen com a objectiu la identificació de variants genètiques comunes heretables associades amb el risc a BrCa i pròstata. Aquests resultats suggereixen variants comunes (rs7164529) i (rs10519219) situades dins el mateix bloc de desequilibri de lligament ($D'=1$) que conté el gen *MORF4L1* estan associades amb el risc a BrCa ($P_{2df} < 0.01$) (**Figura 29a**). Basant-nos en aquestes observacions es van genotipar aquests dos SNPs en les sèries de 9.573 portadors de mutacions en *BRCA1/BRCA2*. Aquests portadors procedien d'un conjunt de 18 centres que participen en el consorci de CIMBA. Com s'ha explicat anteriorment, aquest consorci recopila DNA i dades clíniques dels portadors per tal de generar suficient poder estadístic que identifiqui gens modificadors de *BRCA1* i/o *BRCA2*.

Un cop realitzat el control de qualitat i comprovat que aquests SNPs compleixen l'equilibri Hardy-Weinberg, es van realitzar els anàlisis de supervivència mitjançant el model de regressió de Cox. Aquests anàlisis van revelar que no hi ha associació significativa entre l'SNP (rs7164529) i el risc a BrCa entre els portadors de mutacions en *BRCA1* (rs7164529, $P_{\text{trend}} = 0.45$, $P_{2df} = 0.51$,). Mentre que en els portadors de mutacions en *BRCA2* els resultats suggereixen una associació d'aquest SNP amb el risc a BrCa (rs7164529, $P_{\text{trend}} = 0.05$, $P_{2df} = 0.14$). En canvi, per l'altre SNP (rs10519219) no s'observa cap associació significativa al risc a BrCa entre els portadors de mutacions en *BRCA1* (rs10519219, $P_{\text{trend}} = 0.92$, $P_{2df} = 0.76$) ni en portadors de mutacions en *BRCA2* ($P_{\text{trend}} = 0.72$, $P_{2df} = 0.07$) pels models additius i codominants respectivament (**Taula 8**). Tot i que si tenim en compte el model recessiu, hi ha algunes evidències d'associació amb el risc a BrCa pels portadors de mutacions en *BRCA2* per l'SNP rs10519219 ($P_{\text{recessive}} = 0.033$) (**Taula 8**). Si existeix algun efecte en la hazard ratio estimada pels portadors de mutacions en *BRCA2* degut al genotip menor de rs7164529 o rs10519219 s'observa en direcció contrària a aquelles obtingudes en la població general.

Taula 8. Associació entre les variants en el locus de *MORF4L1* i el risc a càncer de mama

Variant	Genotype	<i>BRCA1</i> mutation carriers			<i>BRCA2</i> mutation carriers			CGEMS		
		n	HR	95% CI	n	HR	95% CI	n	OR	95% CI
rs7164529	GG	2,437	1.00	-	1,587	1.00	-	833	1.00	-
	GA	2,998	1.04	0.97 to 1.13	1,813	1.07	0.98 to 1.17	1,087	1.23	1.02 to 1.47
	AA	928	1.02	0.92 to 1.14	568	1.12	0.99 to 1.27	366	0.83	0.65 to 1.06
	Trend		1.02	0.97 to 1.07		1.06	1.00 to 1.12		0.97	0.86 to 1.09
	P_{trend}			0.45			0.05			0.58
	P_{2df}			0.51			0.14			0.003
rs10519219	TT	4,366	1.00	-	2,760	1.00	-	1,766	1.00	-
	TC	1,331	0.99	0.91 to 1.08	866	0.96	0.86 to 1.06	500	0.78	0.64 to 0.96
	CC	95	1.10	0.84 to 1.43	78	1.39	1.02 to 1.88	21	0.38	0.14 to 0.97
	Trend		1.00	0.93 to 1.08		1.02	0.93 to 1.11		0.76	0.63 to 0.91
	P_{trend}			0.92			0.72			0.003
	P_{2df}			0.76			0.07			0.008
	$P_{\text{recessive}}$			0.49			0.033			0.045

Estudi d'associació entre les variants del locus MORF4L1 i el risc a càncer de mama entre els portadors de mutacions *BRCA1* i *BRCA2* i en la població general (resultats del CGEMS). n, número d'individus; HR, hazard ratio; CI, interval de confiança; OR, odds ratio

Posteriorment, es va realitzar l'anàlisi d'interacció entre l'efecte de l'SNP i cada un dels 18 centres que participen en el consorci CIMBA. Els resultats obtinguts tenint en compte els estudis de hazard ratio no mostren evidències d'heterogeneïtat per rs7164529 en portadors de mutacions *BRCA1* ($P=0.66$) ni pels portadors de mutacions en *BRCA2* ($P=0.21$). En canvi si que mostren algunes suggerències d'heterogeneïtat per l'SNP rs10519219 per centres, entre els portadors de mutacions en *BRCA2* ($P=0.041$) (**Figura 29b**).

S'han dut a terme estudis de susceptibilitat al càncer utilitzant com a models ratolins, els quals revelen efectes oposats de l'al·lel depenent del *background* genètic de cada ratolí [239]. En aquest context, l'efecte dels al·lells de *MORF4L1* en el risc a BrCa pot ser diferent depenent de l'estat genètic/funcional de *BRCA2/BRCA2*, ja que aquest està per sobre en la via de senyalització: la població general wild-type versus la població portadora de mutacions en *BRCA2*. Per altra banda, al·lells de predisposició comuna diferencialment associats amb el risc a BrCa entre els portadors de mutacions *BRCA1* i *BRCA2* [193, 240, 241], suggereixen diferències en la influència en els processos biològics que es duen a terme en la carcinogènesis entre els dos tipus de portadors.

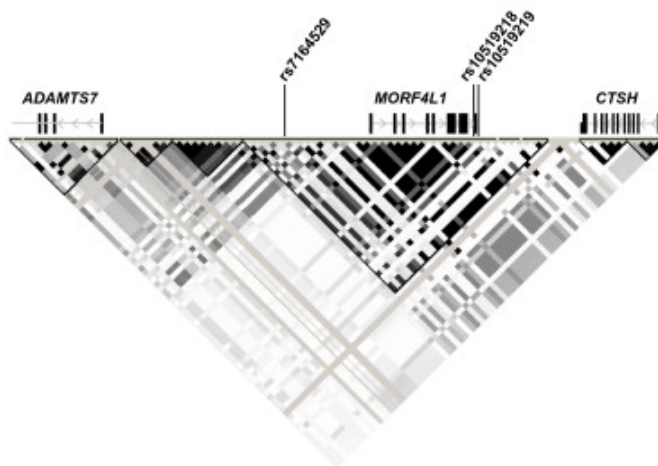
Per tal d'investigar la robustesa de la possible associació genètica entre *MORF4L1* i el risc a BrCa es van realitzar anàlisis de sensibilitat. En primer lloc, es va tractar la ooforectomia profilàctica (extracció d'un ovari o ambdós) com a una covariable depenent del temps. En els resultats obtinguts no s'observa associació entre la ooforectomia i les estimacions del risc a BrCa ($P_{\text{valor}} > 0.10$). En segon lloc, els anàlisis realitzats després d'excloure els casos prevalents, definits com aquells diagnosticats >5 anys abans del reclutament de dades, suggereixen algunes associacions. En el model additiu (rs7164529 *BRCA2* $n=2.803$, HR=1.09, CI 95% interval de confiança =1.00 a 1.18, $P=0.048$); en el model recessiu (rs10519219 *BRCA2* $n=2.633$, HR = 1.78, CI 95%=1.12 a 2.87, $P=0.027$), és a dir, en els resultats anteriors on s'observa associacions amb BrCa se segueix observant aquesta associació tot i excloure els casos prevalents, la qual cosa demostra la robustesa dels nostres resultats. Finalment, per prevenir un possible biaix en les nostres estimacions dels riscos a causa de la selecció d'individus en base al seu fenotip, es va repetir l'anàlisi utilitzant els pesos de la cohort. El que significa que els individus es ponderen d'acord amb certes probabilitats de mostreig, per tal de simular una veritable cohort de mostres afectades i no afectades dels portadors de mutacions [194]. Això va donar lloc a resultats similars mostrats en la **Taula 8** pel model additiu i el model codominant. Els anàlisis amb pesos (wHR) per rs7164529, *BRCA1* (wHR= 1,04 a 1,08) i per *BRCA2* (wHR=1,03 a 1,12); en el cas de l'SNP

(rs10519219, *BRCA1* wHR=0,98 a 1,08) i per *BRCA2* (wHR=0,95 a 1,59), però l'associació de rs10519219 segons el model recessiu no era estadísticament significativa (*BRCA2* wHR= 1,62, CI 95%=0'97 a 2,70, $P= 0,062$). En aquest anàlisi tampoc es van observar evidències d'heterogeneïtat en cap cas pels wHRs ($P>0.30$).

En conjunt podem dir que les dades obtingudes no mostren una associació significativa entre els SNPs (rs7164529 i rs10519219) en el locus de MORF4L1 i el risc a BrCa entre els portadors de mutacions *BRCA1/2*, però si que suggereixen una dèbil associació amb el risc a BrCa en el model additiu per l'SNP (rs7164529) i en el model recessiu per l'SNP (rs10519219) que no són explicats ni per altres factors de risc, ni per un biaix de selecció dels participants en l'estudi.

*(Els anàlisis estadístics representats a la **Taula 8** i **Figura 29** han estat realitzats amb col·laboració amb la Unitat de Biomarcadors i Susceptibilitat de l'ICO-IDIBELL)*

(a)



(b)

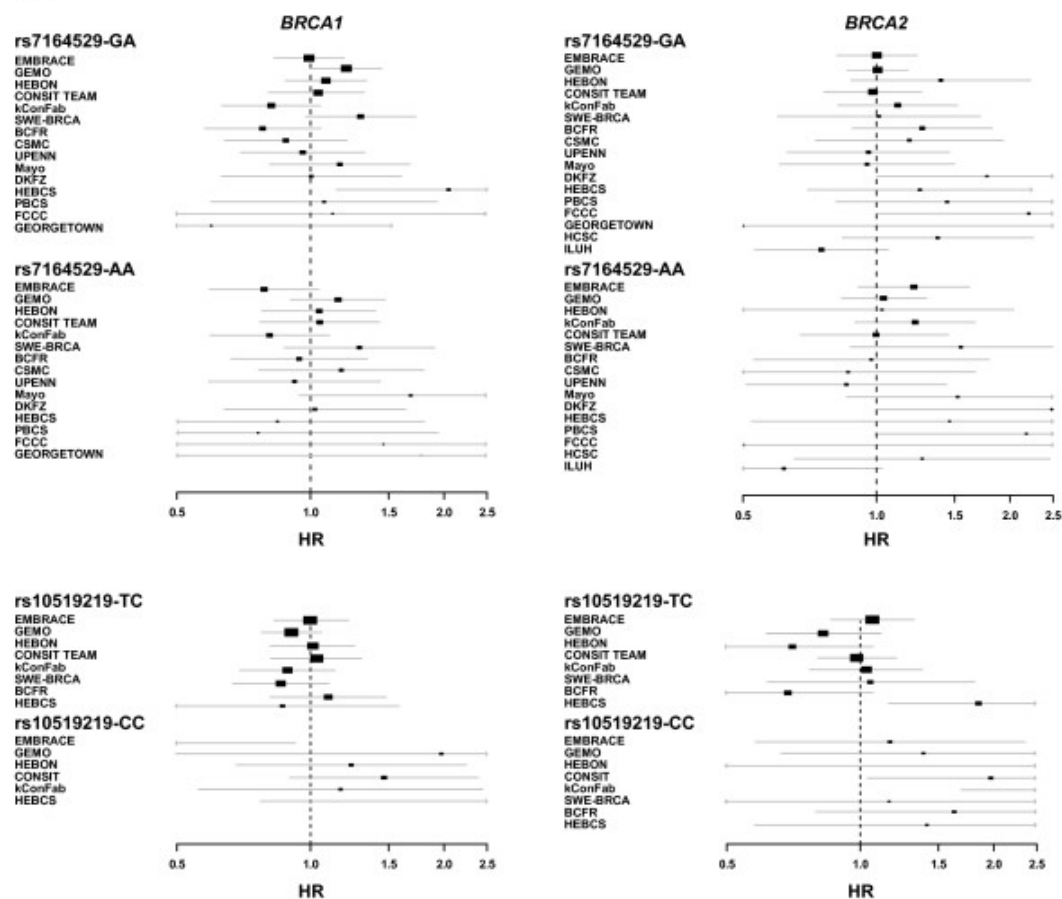


Figura 29. Variació del locus *MORF4L1* i el risc a càncer de mama. (a) SNPs amb prèvies evidències d'associació amb el risc a càncer de mama (BrCa) en la població general ($P_{2df} < 0,01$) [129], gens i l'estructura del bloc de disequilibrium de lligament que conté el gen *MORF4L1* en el HapMap Caucasians. (b) Hazard ratio (HR) i estimacions de l'associació de rs7164529 (panell de dalt) i rs10519219 (panell de baix) amb el risc a BrCa entre portadors de mutacions *BRCA1* (panell de l'esquerra) i portadors de mutacions *BRCA2* (panell de la dreta). La gràfica mostra HRs i el 95% d'interval de confiança (CI 95%) per tots els centres que han participat excepte per rs10519219 i grups relativament petits (menys de cinc individus amb el genotip minoritari). La mida del rectangle és proporcional a la precisió de l'estudi corresponent.



DISCUSSION

DISCUSSIÓ

FA és una malaltia genètica rara, caracteritzada per una disfunció al moll de l'ós, defectes congènits en el desenvolupament, anormalitats cromosòmiques i hipersensibilitat cel·lular del DNA als agents inductors de ICLs [2]. A més, els pacients FA tenen predisposició a desenvolupar càncer, principalment de tipus hematopoètics i carcinomes de cèl·lules escamoses de cap i coll [1]. Des del punt de vista genètic és una malaltia altament heterogènia. Fins al moment s'han descrit 15 gens *FANC*, les mutacions dels quals causen FA [242]. Tot i així, encara resten pacients diagnosticats clínicament com a FA que no presenten mutacions per cap d'aquests 15 gens coneguts. Aquest fet indica que encara falten nous gens *FANC* per identificar. Les proteïnes codificades per aquests 15 gens coneguts constitueixen una xarxa comuna de ubiquitinació-fosforilació anomenada via de senyalització de FA/BrCa [4, 55]. Aquestes proteïnes cooperen amb altres proteïnes involucrades en la reparació del DNA i el control del cicle cel·lular amb l'objectiu de reparar les lesions de ICLs en fase replicativa del DNA i mantenir l'estabilitat genòmica [4]. Malgrat tot encara no està del tot clar com la via de senyalització FA/BrCa regula la resolució dels DSBs intermediaris en el procés de reparació dels ICLs [55]. A més, s'ha demostrat l'estreta relació d'algunes d'aquestes proteïnes *FANC* amb la susceptibilitat al càncer de mama, en concret, mutacions monoal·lèliques en *FANCD1/BRCA2* o *FANCN/PALB2* incrementen el risc a desenvolupar càncer de mama.

Així doncs, en la present tesi doctoral, es va realitzar un estudi a gran escala amb el principal objectiu d'identificar nous gens causants de FA que alhora ens permetin arribar a una major comprensió de la via de senyalització FA/BrCa en el procés de reparació del dany al DNA i, al mateix temps, a la identificació de nous gens de susceptibilitat al càncer de mama. Els resultats del Y2H presentats en aquest treball pretenen identificar nous gens causants de FA a partir de la interacció física entre dominis de proteïnes involucrades en la via de senyalització FA/BrCa i contribuir en el coneixement molecular d'aquesta. Aquests dominis proteics es van dissenyar tenint en compte tres evidències obtingudes de diferents bases de dades: els dominis familiars predits pel Pfam, els algorismes del PONDOR i la seqüència completa de la proteïna. Aquests resultats, ens permeten aprofundir en les causes genètiques de FA i BrCa.

A partir del cribatge del Y2H es van obtenir 25 noves interaccions. Definim aquestes noves interaccions d'alta fiabilitat d'acord amb l'experiència del nostre grup en aquest sistema [206], i seguint criteris tècnics i biològics dels propis resultats. Per exemple, identificarem com a fiable una nova interacció si presenta

més d'una troballa (diferents colònies de llevat en un cribatge particular) o troballes que estiguin representades per diferents fragments de cDNA en un mateix *prey*. A més, la identificació de dues interaccions prèviament conegudes (BLM-MLH1 i ERCC1-ERCC4) reforcen els nostres resultats i donen fiabilitat al sistema utilitzat. D'aquestes noves interaccions es van caracteritzar amb major profunditat aquelles que tenien una implicació més directa en la reparació del DNA o en la progressió del cicle cel·lular per la seva possible relació amb la via de senyalització FA/BrCa. Així doncs, es van validar quatre interaccions mitjançant tècniques bioquímiques tals com les coIPs, que corroboren aquestes interaccions: CHEK2-NFKB1, PALB2-MRG15, TOP3A-TSNAX i USP1-KPNA1 (**Figura 19**). Actualment estem estudiant i caracteritzant una nova interacció entre BRCA2 i E6TP1. Aquesta interacció pot ser d'elevat interès ja que E6TP1 s'ha vist implicat en els càncers escamosos de cap i coll [243], un dels tipus de càncer més freqüents en pacients FA.

D'entre aquestes quatre interaccions esmentades, aquesta tesi posa èmfasi en la caracterització molecular i funcional de la interacció entre FANCN/PALB2-MRG15 [177]. La via de senyalització FA/BrCa s'ha vist implicada en la reparació de DSB mitjançant la HR. La depleció de gens FA provoca defectes en aquesta reparació. Es per aquest motiu, que ens vam centrar en aquesta interacció, ja que s'ha descrit que PALB2 és necessari pel reclutament de BRCA2 en els llocs de DSB i així iniciar la HR. Tenint en compte aquests coneixements es va hipotetitzar que MRG15 fos un possible gen FA. Aquesta interacció ha estat descrita per altres dos grups [176, 244] en el transcurs d'aquests estudis.

L'evidència més directa de la participació de la via de senyalització FA/BrCa en la HR prové de la identificació de BRCA2 com a subtipus FANCD1 de FA [36]. BRCA2 és un factor crític necessari per l'inici de la HR que facilita la formació del nucleofilament de RAD51 en el ssDNA [40, 76]. Posteriorment, es va identificar PALB2 com a factor que s'uneix i regula la localització de BRCA2 [173]. A més, mutacions germinals bial·lèliques de PALB2 causen FA del grup N, conegut com a FANCN [174, 218] mentre que mutacions germinals monoal·lèliques de PALB2 incrementen de manera moderada el risc a desenvolupar BrCa [128]. De manera semblant, mutacions monoal·lèliques de BRIP1 incrementen el risc de càncer de mama hereditari i mutacions bial·lèliques causen FA del subtipus FANCD1. BRIP1 és necessari per la reparació per HR [245] i interacciona amb BRCA1. *BRCA1* és un gen de susceptibilitat al càncer de mama i ovari, que tot i no ser un gen FA *per se*, està estretament relacionat amb la via de senyalització de FA. Cèl·lules deficientes en BRCA1 també presenten sensibilitat als agents inductors de ICLs, presenten trencaments cromosòmics i defectes en la HR [89, 246]. Estudis recents han demostrat la crítica interacció entre BRCA1, BRCA2 i PALB2 en la coordinació del

procés de la HR [179, 221, 222]. Aquestes tres proteïnes juntament amb d'altres com RPA-1 i RAD51 s'han vist implicades en la reparació del dany al DNA formant el complex BRCA [178, 179, 221, 222]. El conjunt d'aquestes característiques també mostren l'estreta relació entre les proteïnes de la via de senyalització FA/BrCa i la susceptibilitat a BrCa.

Tenint en compte tota la informació prèvia, es va realitzar simultàniament diferents estudis. Per una banda es va investigar el paper de MRG15 com a possible gen FA. Els productes dels gens *FANC* es divideixen en tres grups funcionals en la via de senyalització FA/BrCa. Un dels punts claus d'aquesta via, és la monoubiquitinació de FANCD2 per part del complex central. Mutacions en qualsevol d'aquests gens del complex central (*upstream*) impedeixen la monoubiquitinació de FANCD2 després de dany i en conseqüència, no s'activa la via de senyalització. Per contra, mutacions en els gens que actuen *downstream* de FANCD2 no alteren la seva monoubiquitinació, malgrat tot, presenten dificultats en la correcte reparació dels ICLs. Primerament es va avaluar si la depleció de la nova proteïna interactora de FANCN/PALB2, MRG15 alterava la monoubiquitinació de FANCD2 es resposta a dany al DNA. En els nostres resultats no s'observen deficiències en la monoubiquitinació. Aquest fet que conclou que MRG15 actua *downstream* de FANCD2 com la pròpia proteïna PALB2.

Posteriorment, degut a que les cèl·lules dels pacients FA presenten hipersensibilitat als agents inductors de ICL tals com la MMC, es va estudiar la sensibilitat de les cèl·lules deplecionades per MRG15 a la MMC. En el nostre estudi, les cèl·lules MEFs deficients per Mrg15 i les cèl·lules HeLa i MCF10A deplecionades per MRG15 no presenten un increment estadísticament significatiu de la mort cel·lular induïda per la MMC. En un dels articles publicats prèviament es va descriure sensibilitat intermèdia a MMC en els cultius cel·lulars deplecionats per MRG15 en contrast amb els cultius cel·lulars deplecionats per BRCA2 i PALB2 [175]. L'observació d'efectes intermedis i la utilització de diferents tipus cel·lulars entre els diferents estudis pot explicar la discrepància pel que fa a la sensibilitat a la MMC quan MRG15/Mrg15 és completament o parcialment deplecionat. En concordança amb aquests resultats, també es va avaluar l'impacte de la depleció de MRG15 en la parada del cicle cel·lular en fase G₂/M. Les cèl·lules dels pacients FA estan caracteritzades per una marcada parada del cicle cel·lular en fase G₂/M degut a la incapacitat de reparació dels ICLs al rebre dany. Aquestes característiques s'han utilitzat rutinàriament en el diagnòstic clínic dels pacients FA. En les cèl·lules deplecionades per MRG15 tractades amb MMC no s'observa la parada en G₂/M. Aquests resultats suggereixen que MRG15 no sigui un gen FA.

Per acabar d'aprofundir en l'estudi i descartar definitivament MRG15 com a gen FA, es van fer assajos de detecció per MRG15 a partir de 13 extractes cel·lulars provinents de línies cel·lulars de pacients FA no identificats per cap grup de complementació (cedits pel Dr. Detlev Schindler, Universitat d'Alemanya) i que presentaven una monoubiquitinació de FANCD2 positiva i on sis d'ells eren defectius per foci de RAD51. En l'anàlisi realitzat, no es va observar una reducció de l'expressió proteica de MRG15 en cap dels 13 extractes analitzats (**Figura 23**). Per tal de comprovar més detalladament si hi havia alguna mutació o variant comuna en els 13 pacients FA que no modifiqui l'expressió de la proteïna MRG15 però si la seva funcionalitat mitjançant un canvi conformacional o modificant els dominis d'interacció, es va seqüenciar *MORF4L1* en les línies cel·lulars. Els anàlisis de seqüenciació tan sols van detectar unes quantes substitucions de bases i delecions d'una sola base en els introns i variants comunes ja descrites en els exons. El conjunt d'aquests resultats ens porta a concloure que MRG15 no és un nou gen FA ja que les cèl·lules deplecionades per MRG15 no presenten sensibilitat a MMC, ni parada del cicle cel·lular en fase G₂/M. A més, es descarten mutacions tant d'expressió proteica com de funcionalitat de MRG15 en els 13 pacients FA amb mutació desconeguda.

Paral·lelament i després de validar la interacció entre PALB2-MRG15 mitjançant assajos de co-IPs i co-AP (**Figura 19 i 21**) vam procedir a la caracterització funcional d'aquesta interacció. En concret ens vam centrar en el possible paper de MRG15/*MORF4L1* en la reparació dels DSB mitjançant la HR. Com s'ha esmentat anteriorment, tant BRCA2 com PALB2, es troben implicades en la reparació dels DSB mitjançant el mecanisme de reparació per HR juntament amb d'altres proteïnes com RAD51 i RPA-1. El conjunt d'aquestes proteïnes és el que anomenen el complex BRCA. Es descriu que la depleció de qualsevol d'elles en cèl·lules de mamífer compromet la reparació per HR [247] i provoca que aquestes siguin sensibles a agents inductors de DSB tals com la IR.

Per tal de validar si MRG15 forma part del complex BRCA es van realitzar assajos de sensibilitat en MEFs amb genotip *Morf4l1*^{-/-}. En aquest assaig es va utilitzar la IR com a agent inductor de DSBs i es va valorar la supervivència cel·lular de les línies WT i deficientes. Els nostres resultats mostren sensibilitat intermèdia a IR respecte al control positiu en MEFs *Atm*^{-/-} com es mostra a la **Figura 24**. Aquest resultat suggereix la participació de MRG15 en el complex BRCA.

Diferents estudis de caracterització del gen *MORF4L1* en MEFs indiquen que aquest està involucrat en la proliferació cel·lular i que la seva deficiència causa defectes en el desenvolupament provocant, fins i tot, la mort embrionària [183].

Altres estudis en MEFs van demostrar que MRG15 és necessari per la correcta reparació del dany al DNA després d'exposició a IR [182]. A més a més, aquesta proteïna també és necessària pel reclutament eficient de les proteïnes de reparació del DNA en els llocs de dany [182]. Addicionalment, es va observar que la pèrdua d'una còpia de MRG15 en MEF endarrereix la reparació del dany del DNA després de IR. Aquestes evidències reforcen els nostres resultats que suggereixen que MRG15/MORF4L1 és un possible gen essencial en la reparació del dany al DNA dins el complex BRCA mitjançant la reparació per HR.

Per aprofundir en l'estudi del paper de MRG15/MORF4L1 com a possible proteïna implicada en la reparació per HR es va avaluar l'impacte en la formació de foci de RAD51 en MEFs deficientes per MRG15. RAD51 és un element essencial per l'inici de la HR ja que promou la invasió de la ssDNA a la cromàtide homòloga i permet l'inici de la recombinació. Segons la literatura, els fibroblasts deficientes en PALB2 no són capaços de formar foci de RAD51 després de IR [173]. S'observa el mateix fenotip en les cèl·lules amb mutacions bial·lèliques de BRCA2. Aquest fet diferencia els subgrups FANCD1 i FANCN de la resta de subgrups FA [146]. Els nostres resultats mostren que les cèl·lules *Morf4l4*^{-/-} presenten un número més baix en la formació de foci nuclear de Rad51 després de irradiació- γ respecte el seu control en MEF^{wt} (mostres recollides en diferents temps post-irradiació i utilitzant clons i cultius cel·lulars no seleccionats) tal i com es mostra la **Figura 26**. Per tant, les cèl·lules *Morf4l4*^{-/-} presenten un fenotip molt semblant a les cèl·lules deficientes per PALB2 o BRCA2 en quant a la formació de foci de RAD51. Aquests resultats suggereixen la participació de MRG15 en el procés de reparació per HR. Si comparem els nostres resultats amb els publicats pels altres dos grups que van descriure prèviament la interacció entre MRG15-PALB2 trobem algunes controvèrsies respecte el paper de MRG15 en la HR i la seva posició dins el complex BRCA. Així per exemple, en els estudis realitzats per Hayakawa i col·laboradors [175] mitjançant assajos de reparació per HR de DR-GFP mostren que la depleció tan de BRCA2 com de PALB2 redueix l'eficiència de la reparació, mentre que s'observa un efecte intermedi amb la depleció de MRG15 (**Figura 13**). Aquests resultats estan en la mateixa línia que els publicats recentment pel nostre grup d'investigació [177]. L'estudi de Hayakawa suggereix que MRG15 és necessari per l'associació de BRCA2/PALB2/RAD51 a la cromatina i per la formació de foci nuclear després de irradiació- γ (**Figura 13**). Per contra, els treballs realitzats pel grup de Sy [176] suggereixen que el mutant de PALB2, el qual li manca el domini d'unió a MRG15, està associat a una hiper-recombinació i resistència a la MMC en aquestes cèl·lules (**Figura 13**). MRG15 forma part de tres tipus de complexos que inclouen, el complex Tip60 HAT, el complex Sin3-HDAC i el complex BRCA. És possible que la

depleció de MRG15 alteri la funció i/o estabilització del complex HAT i HDAC i addicionalment afecti al reclutament del complex BRCA. A la vegada, la deleció d'una porció de la proteïna, com han fet en els experiments de Sy i col·laboradors, podria juxtaposar dominis de les proteïnes que normalment no interactuen i alterar-ne la seva conformació. Aquestes diferències experimentals, podrien explicar les discrepàncies entre els nostres resultats i els de Sy. No obstant, els nostres resultats són consistents amb els resultats publicats per [175] i [182], els quals suggereixen que MRG15 està implicat en la reparació dels DSB mitjançant la HR.

Tenint en compte aquestes controvèrsies, es van realitzar altres estudis amb l'objectiu de comprovar la participació de MRG15 en el procés de reparació de DSB per HR i amb la finalitat de ubicar-lo dins la via de senyalització del complex BRCA. Per això, es van realitzar assajos de WB per la quantificació dels nivells tant de BRCA1 com de BRCA2. Estudis realitzats prèviament descriuen que la depleció de PALB2 produeix una disminució dels nivells de proteïna de BRCA2 al nucli [173]. Aquests resultats situen PALB2 com a proteïna necessària pel reclutament de BRCA2 i per tant, per la HR. Els nostres resultats en MEFs deplecionades per *Morf4l1*^{-/-} també mostren nivells inferiors de proteïna tan de Brca1 com de Brca2 (**Figura 27**). Els nivells de Palb2 no es van poder mesurar perquè els anticossos utilitzats no poden detectar la proteïna en extractes cel·lulars de ratolí. No obstant, aquests resultats són consistents amb els publicats per Hayakawa i col·laboradors, els quals mostren una reducció similar de BRCA2 quan MRG15 és deplecionat, però no per MRGX. Per contra, els anàlisis realitzats pel grup d'investigació de Sy en cèl·lules deplecionades per MRG15 no mostren una alteració dels nivell proteics de BRCA2, amb la qual cosa, seran necessàries futures investigacions per tal de resoldre la discrepància. Tot i així, els nostres resultats reforcen la possibilitat que MRG15 sigui necessari pel correcte funcionament de BRCA2 i que, per tant, tingui una implicació en la reparació dels DSB en el procés de reparació per HR.

Seguint les evidències anteriorment exposades i per aprofundir en l'estudi, es van extrapolar aquests resultats en un altre model animal. La recent identificació i caracterització dels homòlegs de FA en un organisme model com *C.elegans* pot ajudar a facilitar la comprensió de la funció de les proteïnes FA, proveint noves eines d'estudi [248]. Els nostres estudis es basen en altres treballs realitzats prèviament sobre l'ortòleg de BRCA2 en *C.elegans*, anomenat CeBRC-2 [232]. El nostre treball pretén doncs proporcionar majors evidències funcionals entre BRCA2 i MRG15. *C.elegans* té una proteïna ortòloga a la proteïna humana MORF anomenada MRG-1. La nostra investigació es basa en l'observació de les diferents fenocòpies presentades per cada mutant de *C.elegans* (*Cebrc-2*, *rad-51*, *mrg-1*) que ens proporcionin nous coneixement del paper de MRG15 en la reparació per HR. Així

doncs, els mutants *Cebr-2* presenten anomalies cromosòmiques durant la diaquinesis, una reducció de foci de RAD-51 en els llocs de DSB presents en la meiosi o induïts per agents de dany al DNA, una acumulació anòmala de foci per nucli de RPA-1 i conseqüentment un augment dels cadàvers apoptòtics [232, 233] (**Figura 28**). Aquests resultats suggereixen que BRC-2 és necessari pel reclutament de RAD-51 en el procés de reparació de DSB. Per contra, els mutants de *rad-51* presenten una localització de foci de BRC-2 després de irradiació, indicant que BRC-2 pot localitzar-se als llocs del dany independentment de RAD-51 [232]. Els mutants per *mrg-1* presenten una fenocòpia semblant al mutants *brc-2*, acumulació de foci de RPA-1 i una reducció dels foci de RAD-51 en les cèl·lules meiotiques, a més de presentar anomalies cromosòmiques. Mentre que els animals WT presenten una mitjana de tres o quatre foci per nucli de RPA-1, en els mutants per *mrg-1* s'observen nuclis amb més de deu foci (**Figura 28**). Aquests resultats suggereixen que tan MRG-1 com BRC-2 desenvolupen un paper semblant en la reparació dels DSB. Així, defectes en qualsevol d'aquestes dos proteïnes causa una disminució de foci de RAD-51 de manera de s'impedeix la reparació per HR; com a conseqüència s'observa una acumulació anòmala en foci de RPA-1 que no pot ser reemplaçat per RAD-51 als llocs de DSB.

El conjunt d'aquests resultats ens permeten dibuixar un possible model per, on suggerim que MRG15 està implicat en el procés de reparació per HR d'una manera semblant a BRCA2. Però no podem concloure si MRG15 depèn o no de PALB2 per la seva localització als DSB (**Figura 30**).

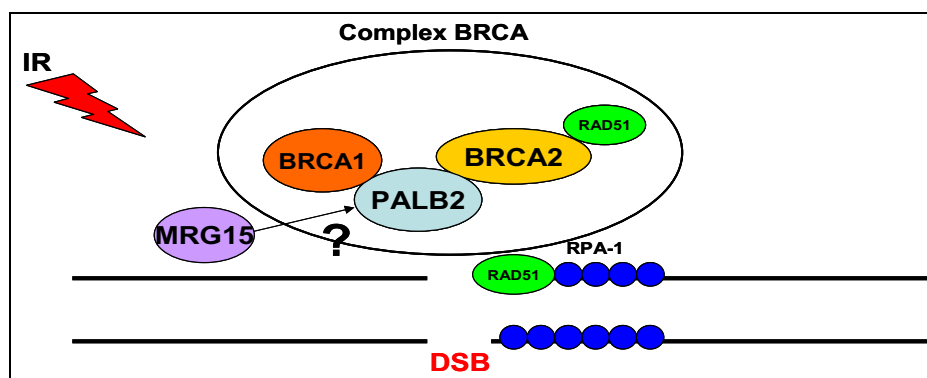


Figura 30. Possible model de participació de MRG15 en la reparació per HR dels DSB. BRCA1 i BRCA2 formen part del complex BRCA. Aquestes dos proteïnes interaccionen entre elles gràcies a la unió amb PALB2 que els condueix als llocs de dany del DNA, en concret als trencaments de doble cadena (DSBs). Un cop localitzats als llocs de dany, RAD51 reemplaça RPA-1 per iniciar la recombinació homòloga (HR). Els nostres resultats demostren la interacció entre MRG15 i PALB2, però no està del tot clar si MRG15 depèn de PALB2 per la seva localització als DSB o si per contra és PALB2 el que depèn de MRG15 per la seva localització als llocs de dany.

Recentment s'han identificat *RAD51C* [249] i *SLX4* [35, 41, 250, 251] com a nous gens causants de FA. *RAD51C* també és un nou gen de susceptibilitat a BrCa [237] i *SLX4* codifica per una proteïna que es troba *downstream* de FANCD2 i que actua com a plataforma de reclutament de diferents endonucleases per tal de resoldre i reparar correctament els ICLs. En aquest últim cas també s'estan duent a terme estudis que expliquin el seu possible rol en la susceptibilitat a BrCa [35]. Una característica ben coneguda que distingeix BRCA1, BRCA2/FANCD1, PALB2/FANCN, BPRIP/FANCI, RAD51C/FANCO i SLX4/FANCP de la resta de proteïnes FA, és que aquestes són prescindibles per la monoubiquitinació de FANCD2. A més, aquest grup de proteïnes FA són absolutament necessàries per la HR que no pas d'altres que actuen *upstream* del complex ID presenten un defecte intermedi [149]. Mutacions germinals en els gens que actuen *downstream* de FANCD2 incrementen el risc de BrCa i ovari [106, 252], suggerint que la reparació del DNA regulada per la HR és crítica com a mecanisme de supressió tumoral. Aquestes evidències demostren que la via de senyalització de FA i la susceptibilitat a BrCa estan entrelaçades, per tant, arribar a una millor comprensió d'aquesta important via de senyalització ens pot ajudar a identificar nous gens potencials involucrats en BrCa.

Els gens de susceptibilitat a BrCa amb mutacions d'alta penetrància són els coneguts *BRCA1* i *BRCA2*. Aquests dos gens són els que expliquen una proporció més alta dels casos d'agregació familiar entre un 20 i un 40% [107, 132]. Es postula que el percentatge restant de casos amb agregació familiar de BrCa és conseqüència d'efectes acumulatius d'al·lels de susceptibilitat a BrCa associats a penetrància baixa o moderada, d'acord amb el model poligènic d'herència [253]. Així doncs, en estudis posteriors es van identificar nous gens de predisposició a BrCa de penetrància moderada relacionats funcionalment amb la via de senyalització de *BRCA1* i *BRCA2* tals com *PALB2*, *CHEK2*, *ATM*, *BRIP1* i *RAD51C* [98]. Tal i com s'ha comentat anteriorment, la descoberta del gen *PALB2* com a gen de predisposició a BrCa, suggeria que les proteïnes que actuen *downstream* de la monoubiquitinació de FANCD2 i FANCI incrementen el risc de BrCa, mentre que aquelles que actuen *upstream* no modifiquen el risc [128, 254]. Aquesta evidència s'ha vist reforçada pels nou gen descoberts de FA (*RAD51C/FANCO*). Finalment, s'han descrit recentment els al·lels modificadors del risc de BrCa de baixa penetrància, que s'han conegut recentment gràcies als estudis de gens candidats i estudis GWAS [33, 129]. Seguint aquesta línia d'estudis i tenint en compte que MRG15 interacciona amb PALB2, el nostre grup va avaluar l'existència de mutacions germinals o variants comunes en el gen *MORF4L1*. Inicialment es va valorar si MORF4L1 era un gen de penetrància moderada de manera que mutacions en el gen

MORF4L1 puguin explicar una porció de casos amb agregació familiar de BrCa. Es van realitzar estudis de seqüenciació dels exons del gen *MORF4L1* en 300 pacients amb una forta agregació familiar de BrCa però que no presentaven mutacions ni en *BRCA1* ni en *BRCA2*. Els resultats de seqüenciació en els 300 pacients no van detectar cap canvi patogènic en *MORF4L1* de manera que es va descartar *MORF4L1* com a gen de penetrància moderada tot i la seva interacció amb PALB2. Aquests resultats són consistents amb els descrits en un article recentment publicat per un altre grup [236]. No obstant, tenint en compte la baixa freqüència de mutacions de penetrància alta/moderada dels altres components de la via de senyalització FA/BrCa [125, 128, 237] i de la possible participació en altres tipus de càncer [238] es va avaluar l'existència de variants comunes en el gen *MORF4L1*. Aquestes variants podrien conferir un risc moderat/baix de BrCa i/o modificar el risc a càncer entre els portadors de mutacions en *BRCA1* i/o *BRCA2*. Els resultats públics provinents de l'estudi del GWAS dirigit pel projecte del CGEMS suggereixen que les variants comunes (rs7164529) i (rs10519219) situades en el bloc de desequilibri de lligament que conté el gen *MORF4L1* estan associades al risc a BrCa ($P_{2df} < 0.01$). Basant-nos en aquestes observacions es va genotipar aquests dos SNPs en les sèries de 9.573 portadors de mutacions en *BRCA1/BRCA2* procedents d'un conjunt de 18 centres que participen dins el consorci de CIMBA. Els anàlisis de supervivència realitzats amb el model de Cox no van trobar cap associació significativa d'aquests SNPs amb el risc a BrCa. Tot i així, hi ha algunes evidències d'associació a BrCa en el cas dels portadors de *BRCA2* suposant un model d'herència recessiu per l'SNP rs10519219.

El estudis basats en el GWAS per descobrir variants de susceptibilitat a BrCa en la població general, i en menor mesura entre els gens candidats, ha permès la identificació de loci capaços de modificar el risc a BrCa entre els portadors de mutacions en *BRCA1* i *BRCA2*. No obstant, actualment aquests loci tan sols expliquen una petita porció de les variacions genètiques en el risc a BrCa entre les dones portadores de mutacions, en *BRCA1* representen un 2,2% i entre les dones amb mutacions en *BRCA2* un 5,2% [143]. Aquestes dades evidencien l'existència de més modificadors de risc que encara no han estat identificats. Les iniciatives com el consorci CIMBA, els quals recluten les dades de portadores de mutacions en *BRCA1* i *BRCA2*, ajudaran a la identificació de més variants de susceptibilitat. Els estudis realitzats en aquesta tesi doctoral pretenen contribuir en el coneixement de noves variants genètiques associades a la modificació del risc entre les dones portadores de mutacions i aprofundir en la predicció del risc entre aquestes dones en l'àmbit del consell genètic.

Així doncs, el poder dels perfils d'SNPs per predir el risc a BrCa en la població general actualment encara és limitat, ja que els SNPs identificats fins al moment tan sols expliquen una proporció molt petita del total de variacions genètiques de risc [143]. Tot i així, els perfils de risc milloraran el poder predictiu com més loci de susceptibilitat siguin identificats. De moment però, l'aplicabilitat clínica dels SNPs encara és incert donat que el risc conegut per cada SNP és petit. No obstant, el risc relatiu combinat associat a un grup d'SNPs pot ser molt més gran i, per tant, pot tenir implicacions en la predicció del risc de BrCa. Per exemple, basant-nos amb la combinació de risc relatiu associat als polimorfismes de *FGFR2* i *TOX3/TNRC9*, el risc absolut de desenvolupar càncer de mama al llarg dels 80 anys per portadors de mutacions en *BRCA2* varia des del 54% per aquells que no tenen un al·lel de risc fins al 82% per aquells que tenen les dos còpies dels al·lels de risc [241]. Fins al moment, els estudis basats en el GWAS han confirmat divuit SNPs que confereixen risc relatiu de BrCa amb un odds ratio per al·lel entre 1.07 i 1.43 [106]. El conjunt d'aquests divuit SNPs actualment identificats explicaria un 8% dels casos d'agregació familiar de BrCa [255] suggerint l'existència de més SNPs que podrien explicar una alta proporció de susceptibilitat a BrCA [256].

Actualment, les dades proporcionades pels estudis del GWAS ens permeten agrupar diferents subtipus de tumors en funció dels SNPs. Per exemple, el GWAS pels portadors de mutacions en *BRCA1* pot identificar al·lels associats amb ER-negatius i/o rellevants pel desenvolupament del tumor basal. Les diferències d'associació dels polimorfismes modificadors entre els portadors de mutacions *BRCA1* i *BRCA2* reflexen les diferències en la biologia del desenvolupament del tumor en aquests dos grups de dones d'alt risc de càncer. La identificació d'aquests polimorfismes podria, per tant, permetre una millor comprensió de la etiologia dels tumors entre els portadors de mutacions com també en el desenvolupament de millors teràpies i més específiques pel càncer de mama. Això indica que els portadors de mutacions *BRCA1* i *BRCA2* podrien ser els dos primers grups d'individus per als quals es desenvolupi una aplicació clínica utilitzant les variants comunes de susceptibilitat al càncer.

El conjunt d'aquests resultats proposen un avanç important de les causes genètiques i mecanismes moleculars involucrats en FA i BrCA, no obstant, seran necessàries futures investigacions que ens permetin resoldre algunes discrepàncies en quan a la via de senyalització en el procés de reparació dels DSB. Els estudis de variants genètiques comunes en el loci de *MORF4L1* pretenen contribuir en la predicció del risc de BrCa entre els portadores de mutacions en *BRCA1* i *BRCA2*. En

aquest cas, també seria necessari futures investigacions en altres gens candidats obtinguts a partir dels resultats del Y2H. En resum, podríem dir que la biologia de sistemes ens permet obtenir una visió global a partir de l'estudi de relacions entre totes les molècules d'un organisme concret, per entendre'n el seu funcionament global. És a dir, no és suficient l'estudi d'un gen o proteïna, sinó que és necessari integrar tota la informació possible sobre el sistema biològic examinat. Així doncs, l'objecte d'estudi de la biologia dels sistemes són les xarxes d'interaccions proteiques.



ANNEX

E6TP1

El virus humà anomenat Papilomavirus Humà d'alt risc (HPVs) és l'agent etiològicament relacionat amb el càncer de cèrvix humà i amb altres càncers [257]. HPVs està classificat en genotips d'alt o baix risc segons la seva associació amb el càncer. La transformació oncogènica de la cèl·lula hoste pel HPVs recau, en part, per l'habilitat de la proteïna vírica E6 en la inducció de la degradació de p53, un activador de la transcripció que juga un paper crucial en la resposta cel·lular del dany al DNA [258, 259]. A més, E6 pot immortalitzar eficientment cèl·lules epitelials mamàries [260]. E6 interacciona amb un alt nombre de proteïnes cel·lulars, algunes de les quals contribueixen amb E6 per la inducció de la transformació cel·lular [261]. L'any 2002, es va identificar el HPVs d'alt risc tipus 16 (HPV16), que s'uneix a la proteïna E6 i que van anomenar E6TP1 (E6-targeted protein 1), també anomenat *Signal Induced Proliferation Associated protein 1 Like 1* (SIPA1L1) [262]. L'oncoproteïna d'alt risc HPV E6 dirigeix E6TP1 a la degradació via la ubiquitin lligasa E6AP, de fet, hi ha estudis que revelen una correlació estricta entre l'habilitat de degradar E6TP1 i l'habilitat d'immortalitzar cèl·lules epitelials mamàries [263].

E6TP1 és una proteïna d'activació a GTPasa (GAP) de la família de GTPases Rap petita. Les proteïnes amb el nivell més alt d'homologia amb E6TP1 inclouen Rap1GAP [264], SPA1 [265, 266] i tuberin [267].

Així doncs, el gen *E6TP1* es troba al cromosoma 14q23.2-14q24.3, un lloc de delecions en meningiomes malignes [268]. La proteïna consta d'un domini GAP entre el residu 240 i 945. Un domini PDZ localitzat a la regió C-terminal del domini GAP conservat en SPA1. Aquest domini no és necessari per l'activitat GAP, sinó que serveix de motiu d'interacció proteïna-proteïna i normalment és diana de proteïnes de senyalització de complexes submembrana. A més, també s'ha descrit un domini LZ a l'extrem C-terminal de la proteïna, com s'observa a la **Figura 31**.

E6TP1



Figura 31. Diagrama esquemàtic del gen *E6TP1*. A l'extrem C-terminal trobem el domini Leucine-zipper (LZ) i el domini PDZ.

Recentment s'ha publicat un nou interactor de la proteïna E6TP1 amb la Casein kinase I epsilon (CKIε) pel seu extrem C-terminal [269]. CKIε és una quinasa regulada per la via de Wnt que promou la fosforilació de E6TP1 i n'indueix la seva degradació. Aquesta interacció suggereix que CKIε pot regular la gastrulació, en part per l'activitat de la via Rap.

Fins al moment, no es coneix gaire informació sobre la proteïna E6TP1 i serà necessari la realització de més estudis per validar si E6TP1 està realment involucrat en la oncogènesis de HPV. Els nostres resultats provinents de l'estudi del Y2H pretenen contribuir una mica més, en la caracterització d'aquesta proteïna.

Interacció entre BRCA2-E6TP1

Com s'ha esmentat, els estudis realitzats fins al moment descriuen la correlació entre l'activitat transformadora d'E6 i l'habilitat d'E6 d'unir-se a E6TP1 promovent la seva degradació per la via regulada per la ubiquitinació de E6AP.

Els resultats del Y2H, suggereixen una nova interacció entre BRCA2 i E6TP1. En concret, mapen la regió d'interacció entre els aminoàcids 2479 i 2667 de BRCA2. Aquesta regió correspon a l'extrem C-terminal de BRCA2 que es caracteritza per la seva unió al ssDNA [65] i RAD51 [170]. Anteriorment es va descriure la interacció de BRCA2 amb DSS1 [171] per aquesta mateixa regió de BRCA2 i com la depleció de DSS1 comprometia la formació de foci de RAD51 [172]. És per aquest motiu hem hipotetitzat sobre una possible implicació de E6TP1 en el complex de reparació BRCA. Consistent amb aquesta idea, primerament es van realitzar tècniques alternatives bioquímiques com co-IPs endògenes i co-APs per tal de corroborar la interacció obtinguda en el Y2H. En primer lloc es van realitzar assajos de co-IPs endògenes a partir de diferents línies cel·lulars (HEK293, HeLa i U2OS) (**Figura 32**). En l'estudi de la interacció entre BRCA2-E6TP1, les cèl·lules van ser tractades amb IR com agent inductor de DSB i sense IR, per tal d'estudiar la possible implicació de E6TP1 en el complex de reparació BRCA després de dany al DNA. Malauradament, en cap dels casos es va aconseguir un resultat positiu que confirmés la interacció. Tampoc es va poder confirmar la interacció recíproca, com s'observa a la **Figura 32**.

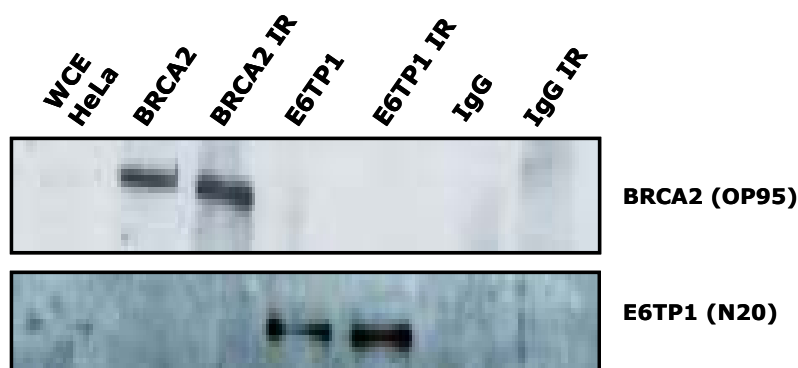


Figura 32. Co-immunoprecipitació (CO-IP) endògena de BRCA2 i E6TP1 en HeLa. El Western blot (WB) superior està revelat amb l'anticòs anti-BRCA2 (OP95). S'observa la banda únicament en els carrils on s'ha realitzat la IP per BRCA2. S'observa també molt dèbilment en el primer carril la banda corresponent a BRCA2 endogen de l'extracte cel·lular de HeLa (WCE). En el WB inferior s'observa el mateix per E6TP1. La co-IP es va realitzar 5 hores post irradiació (IR) o en cultius no tractats.

En segon lloc, amb el mateix objectiu de validar la interacció obtinguda en el Y2H, es van realitzar assajos de co-AP en cèl·lules HEK293 tal i com mostra la **Figura 33**. Per dur a terme les co-AP es van utilitzar diferents mutants de E6TP1 cedits per Gao et al, que presenten una deleció en l'extrem C-terminal (E6TP1(CΔ)), una deleció en l'extrem N-terminal (E6TP1(NΔ)) o sense delecions (E6TP1 (FL)), units al tag Myc, com mostra la **Figura 33 a**). La utilització d'aquests vectors mutats per diferents regions de E6TP1, ens van permetre acotar la regió d'interacció amb BRCA2. Aquests mutants van ser sobreexpressats en les cèl·lules HEK293 i posteriorment se'n va verificar la seva sobreexpressió en un WB. De la mateixa manera que en el cas anterior, no hem estat capaços de validar la interacció per cap dels mutants ni pel FL de E6TP1 (**Figura 33b**).

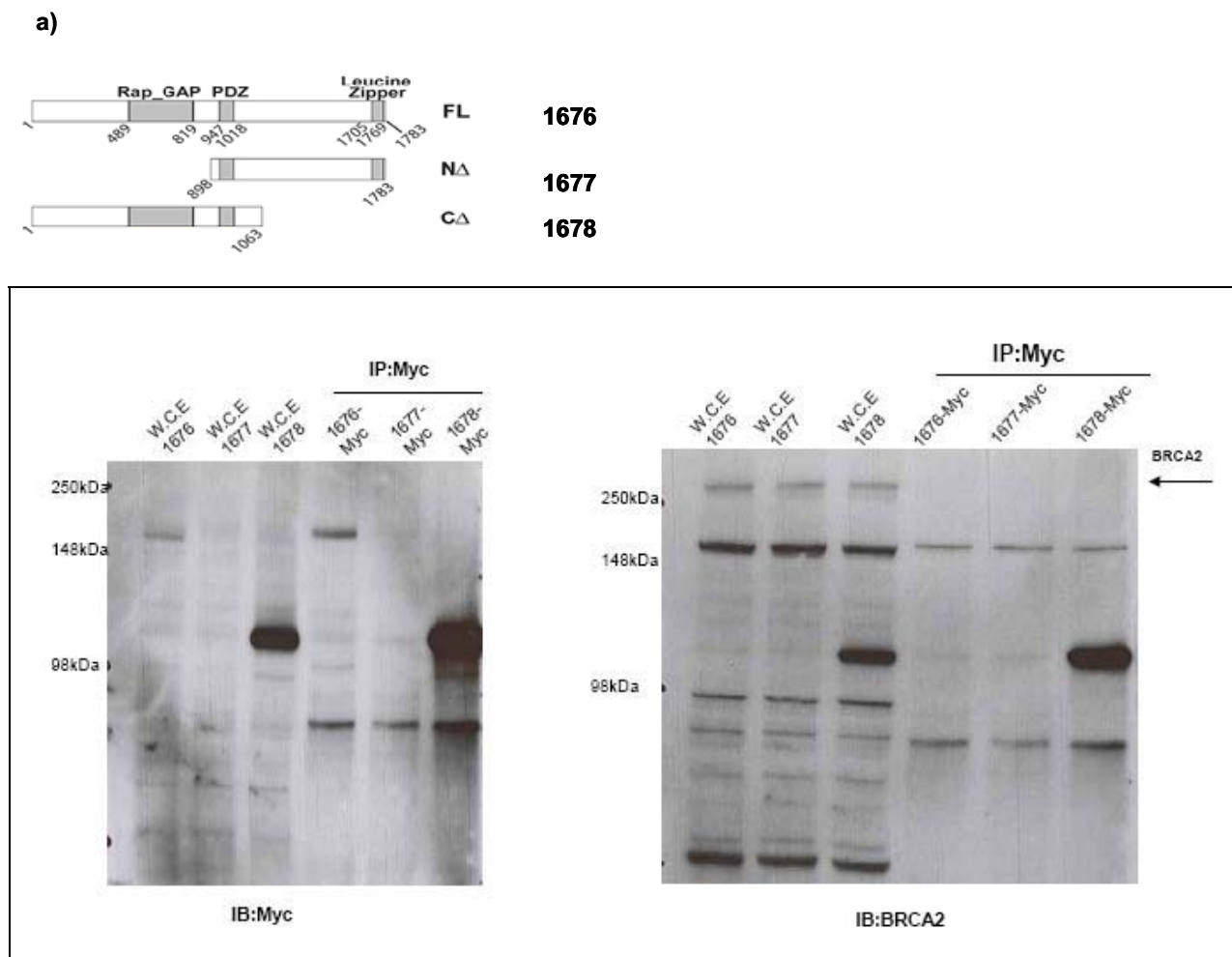


Figura 33. Co-affinity purification dels diferents constructes de E6TP1-Myc (co-AP). (a) Esquema dels diferents constructes de E6TP1 amb les mutacions corresponents. 1676-Myc correspon al FL-E6TP1, 1677-Myc correspon a E6TP1(NΔ) i 1678-Myc correspon a E6TP1(NΔ). (b) Western-Blot (WB) de les co-immunoprecipitacions dels diferents constructes de E6TP1. Al panell de l'esquerra el WB està revelat contra Myc, per tal de comprovar la transfecció i l'expressió correcta dels diferents constructes. Com s'observa, el constructe de 1677-Myc no s'expressa. Al panell de la dreta: No observem cap banda de BRCA2 en cap de les immunoprecipitacions.

La proteïna BRCA2 té un pes molecular molt elevat. És per aquest motiu que sovint és difícil veure la seva expressió mitjançant l'anàlisi per WB. Així doncs, amb l'objectiu d'intentar validar novament la interacció, es va sobreexpressar la regió concreta de BRCA2 que interacciona amb E6TP1 en la línia cel·lular HEK293. Aquesta regió d'interacció de BRCA2 és la que es va utilitzar en el cribatge del Y2H com a *bait*. Per la realització de l'anàlisi per co-AP, es va unir un tag GST a la regió de BRCA2. Les cèl·lules es van tractar amb IR (10Gy) i sense. Novament, els resultats obtinguts van ser negatius (**Figura 34**) i no hem estat capaços de validar aquesta interacció.

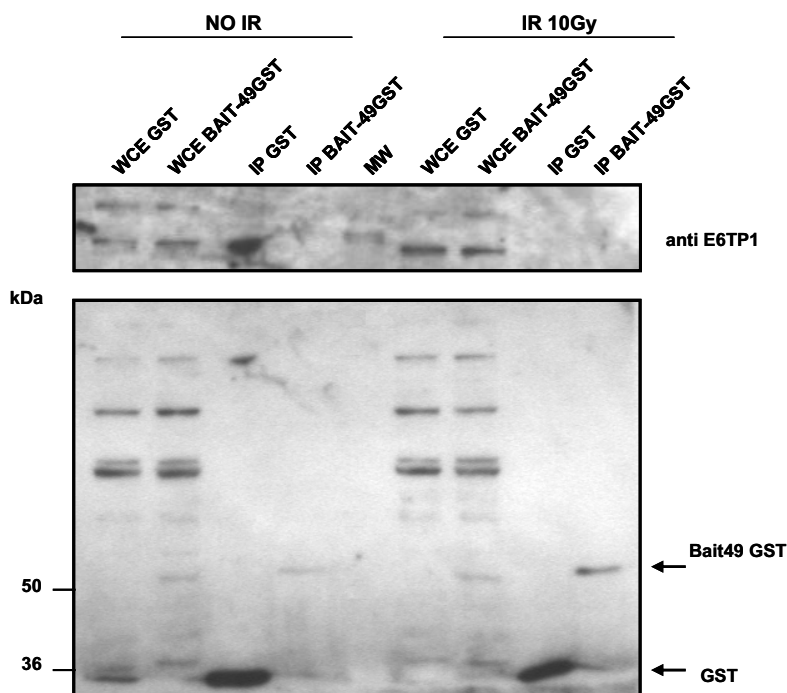


Figura 34 Co-affinity purification del bait 49 GST de BRCA2. Hem utilitzat la regió de BRCA2 que interacciona amb E6TP1 (el bait 49 utilitzat en el sistema del doble híbrid (Y2H) que correspon al domini helicasa de BRCA2). No observem banda de E6TP1 en cap de les dos condicions. NT, no tractat amb irradiació ionitzant, IR, irradiació ionitzant a 10 Gy. Mostres preses després de 5 hores post-tractament.

No obstant, per tal de caracteritzar la possible funció de E6TP1 en relació amb BRCA2 es va realitzar un assaig de fraccionament en cèl·lules HeLa deplecionades per BRCA2 mitjançant shRNA. Pel correcte fraccionament de la línia cel·lular HeLa es va utilitzar el kit Subcellular Protein Fraction (Thermo scientific) i es va verificar el seu correcte fraccionament mitjançant anticossos específics de nucli (Nup62) i de citoplasma (EGFR). Tan la línia cel·lular HeLa, com les HeLa deplecionades per BRCA2 (shBRCA2) es van tractar amb IR o sense per tal de veure si E6TP1 modificava la seva localització cel·lular en funció del dany i/o en funció de BRCA2. En aquest cas, el que s'observa és una isoforma més petita en els extractes nuclears (nucli i cromatina) de E6TP1, mentre que en els extractes citoplasmàtics i de membrana s'observa el pes molecular esperat. En cap dels casos, s'observa diferència respecta a la radiació (**Figura 35**).

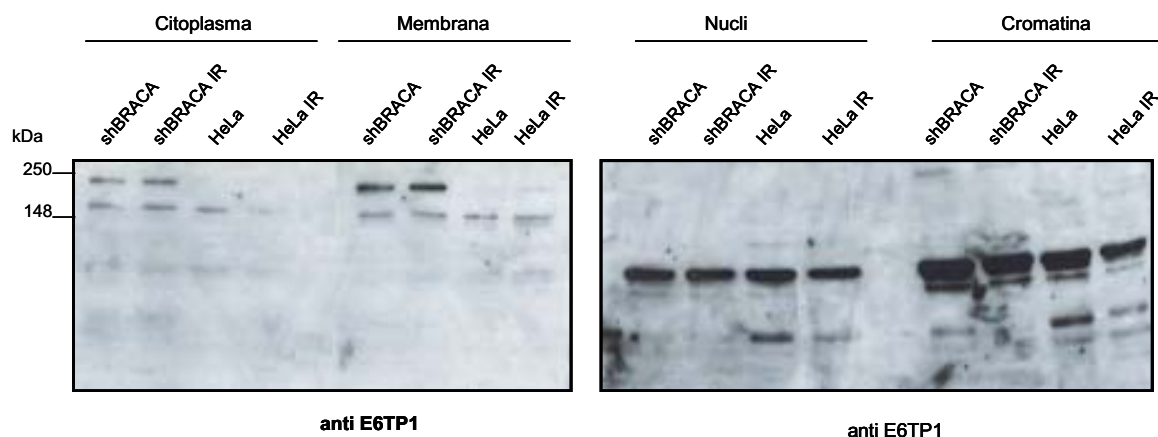


Figura 35. Fraccionament de la línia cel·lular HeLa. Hem fraccionat línia cel·lular HeLa deplecionada per BRCA2 (shBRCA2) i les cèl·lules HeLa control. No s'observa modificació E6TP1 en la seva localització. Observem una banda de mida inferior en el nucli i cromatina.

No hem pogut deplecionar el gen *E6TP1* i en conseqüència no hem pogut observar si la seva depleció comprometia la formació de foci de RAD51 de la mateixa manera que ho fa DSS1. Fins al moment no s'ha publicat cap estudi on s'hagi realitzat la seva depleció, per tant, aquesta s'hauria de fer a partir d'altres proteïnes que provoquin la seva degradació, com per exemple a partir de la sobreexpressió de CK1ε.

Els pacients FA són altament susceptibles a carcinomes cel·lulars esquamosos (SCCs) que sorgeixen en múltiples llocs anatòmics, bàsicament en la regió del cap i coll. El HPV particularment el tipus 16, està associat amb el 20% dels carcinomes cel·lulars esquamosos de cap i coll (HNSCCs) en la població general. Alguns investigadors han informat que els HNSCCs en els pacients FA estan associats a un 81% dels casos a HPV. En concret, HPV16 causa un 90-95% dels casos de càncer relacionats amb HPV [270, 271], és per això que els clínics recomanen la vacuna contra HPV dels subtipus 16, 18, 7 i 11 entre els pacients FA. La freqüència de HNSCC en el pacients FA és comparativament més elevada que en la població general [1, 272-274]. Fins i tot després del trasplantament de medul·la òssia, els pacients FA presenten una alta incidència de HNSCC, segurament degut a defectes en la reparació del dany al DNA i el conseqüent augment de la inestabilitat genòmica en les cèl·lules epitelials de cap i coll. Park i col·laboradors suggereixen que la via de senyalització de FA contribueix en la reparació del dany al DNA provocat per HPV16 E7, la qual cosa podria donar una explicació de perquè els pacients FA estan predisposats a HPV associat a HNSCCs [243].

HPV16 codifica per tres oncògens, *E5*, *E6* i *E7*. Entre *E6* i *E7*, HPV16 *E7* té un

millor potencial de causar càncer de cap i coll en els models animals [275] amb la contribució d'E6 en l'augment d'incidència amb combinació amb E7 [276].

La unió entre HPVs i SCC dels pacients FA és interessant pel que fa a l'àmbit de la clínica i la recerca. En estudis previs de pacients FA s'observen discrepàncies entre la hipotètica relació entre el desenvolupament d'aquests càncers i l'expressió dels oncògens [277, 278]. Alguns investigadors han demostrat correlacions més clares entre l'activitat oncogènica de HPVs i la deficiència en la via de senyalització de FA *in vitro* [279, 280]. Segons l'acumulació de diferents estudis s'ha hipotetitzat que la via de senyalització de FA reprimeix l'activitat oncogènica de HPV16 E7 [243].

Tenint en compte els diferents resultats publicats referents a l'oncoproteïna E7 i a la implicació d'aquesta en el HPV i el HNSCC en els pacients FA, podem suggerir que E6TP1 també podria tenir una implicació en l'augment substancial de HNSCC entre els pacients FA. Els resultats del Y2H suggereixen una nova interacció per part de E6TP1, en concret, interacciona amb BRCA2. BRCA2 està involucrat de manera directa amb la reparació del dany al DNA. Per tant, suggerim que E6TP1 podria ajudar en la comprensió de la relació entre l'augment de HNSCCs en els pacients FA i la reparació ineficient que pateixen els pacients FA. Actualment aquests resultats no han pogut ser validats. Tot i així, a partir dels estudis realitzats per altres grups, podríem suggerir la realització de diferents estudis per tal de comprovar la seva possible implicació en el desenvolupament de HNSCC i contribuir d'aquesta manera a una major comprensió de la via de senyalització de FA i la seva relació amb el HPV. Addicionalment, també s'hauria d'investigar la seva relació amb la HR i la susceptibilitat al càncer de mama, ja que la regió d'interacció de BRCA2 amb E6TP1 és la mateixa regió d'interacció que amb DSS1. Aquesta regió de BRCA2 és una zona en la que s'han descrit varies mutacions relacionades amb el risc a BrCa. És per aquest motiu, que calen futures investigacions per confirmar la interacció i el seu possible paper en la reparació dels DSB per HR i com a possible gen de contribució al desenvolupament de HNSCC entre els pacients FA.



CONCLUSIONS

1. Identificació de 25 noves interaccions segons criteris tècnics i biològics mitjançant el sistema del Y2H, les quals poden contribuir a una major comprensió de la via de senyalització FA/BrCa.
2. Validació de quatre d'aquestes 25 noves interaccions: CHEK2-NFKB1, PALB2-MRG15, TOP3A-TSNAX, USP1-KPNA1, les quals s'han vist involucrades en processos de reparació del dany al DNA.
3. MRG15 interacciona per l'extrem N-terminal amb PALB2. MRG15 està involucrat en la reparació dels DSB a través de la relació entre BRCA2, PALB2, RAD51 i RPA1. Aquestes evidències es veuen reforçades en altres models animals com en ratolins i *C.elegans*.
4. MRGX necessita la regió HLH per interaccionar amb PALB2. No presenta fenotips sensibles a la IR.
5. *MORF4L1*/MRG15 no és un nou gen FA. Els pacients FA amb mutació desconeguda no presenten una reducció proteica de MRG15, com tampoc mutacions en el seu gen *MORF4L1*.
6. No s'observen mutacions del gen *MORF4L1* en la sèrie de 300 pacients amb agregació familiar tipus "BRCAx".
7. No hi ha una associació significativa entre els SNPs (rs7164529 i rs10519219) en el locus de *MORF4L1* i el risc a BrCa segons les sèries de 9.573 portadors de mutacions *BRCA1/2*. Però si algunes evidències d'associació amb el risc a BrCa pels portadors de mutacions *BRCA2* per l'SNP rs10519219, suggerint la necessitat de sèries més grans.

BIBLIOGRAFIA

1. Kutler, D.I., et al., *High incidence of head and neck squamous cell carcinoma in patients with Fanconi anemia*. Arch Otolaryngol Head Neck Surg, 2003. **129**(1): p. 106-12.
2. Joenje, H. and K.J. Patel, *The emerging genetic and molecular basis of Fanconi anaemia*. Nat Rev Genet, 2001. **2**(6): p. 446-57.
3. Niedernhofer, L.J., A.S. Lalai, and J.H. Hoeijmakers, *Fanconi anemia (cross)linked to DNA repair*. Cell, 2005. **123**(7): p. 1191-8.
4. Kitao, H. and M. Takata, *Fanconi anemia: a disorder defective in the DNA damage response*. Int J Hematol. **93**(4): p. 417-24.
5. Heinrich, M.C., et al., *DNA cross-linker-induced G2/M arrest in group C Fanconi anemia lymphoblasts reflects normal checkpoint function*. Blood, 1998. **91**(1): p. 275-87.
6. Meetei, A.R., et al., *X-linked inheritance of Fanconi anemia complementation group B*. Nat Genet, 2004. **36**(11): p. 1219-24.
7. Macdougall, L.G., et al., *Fanconi anemia in black African children*. Am J Med Genet, 1990. **36**(4): p. 408-13.
8. Kutler, D.I. and A.D. Auerbach, *Fanconi anemia in Ashkenazi Jews*. Fam Cancer, 2004. **3**(3-4): p. 241-8.
9. Callen, E., et al., *A common founder mutation in FANCA underlies the world's highest prevalence of Fanconi anemia in Gypsy families from Spain*. Blood, 2005. **105**(5): p. 1946-9.
10. Finkel, T. and N.J. Holbrook, *Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing*. Nature, 2000. **408**(6809): p. 239-47.
11. Deans, A.J. and S.C. West, *DNA interstrand crosslink repair and cancer*. Nat Rev Cancer. **11**(7): p. 467-80.
12. Wang, W., *Emergence of a DNA-damage response network consisting of Fanconi anaemia and BRCA proteins*. Nat Rev Genet, 2007. **8**(10): p. 735-48.
13. Meetei, A.R., et al., *A multiprotein nuclear complex connects Fanconi anemia and Bloom syndrome*. Mol Cell Biol, 2003. **23**(10): p. 3417-26.
14. Ciccia, A., et al., *Identification of FAAP24, a Fanconi anemia core complex protein that interacts with FANCM*. Mol Cell, 2007. **25**(3): p. 331-43.
15. Komori, K., et al., *Cooperation of the N-terminal Helicase and C-terminal endonuclease activities of Archaeal Hef protein in processing stalled replication forks*. J Biol Chem, 2004. **279**(51): p. 53175-85.
16. Meetei, A.R., et al., *A human ortholog of archaeal DNA repair protein Hef is defective in Fanconi anemia complementation group M*. Nat Genet, 2005. **37**(9): p. 958-63.
17. Schwab, R.A., A.N. Blackford, and W. Niedzwiedz, *ATR activation and replication fork restart are defective in FANCM-deficient cells*. EMBO J. **29**(4): p. 806-18.
18. Collis, S.J., et al., *FANCM and FAAP24 function in ATR-mediated checkpoint signaling independently of the Fanconi anemia core complex*. Mol Cell, 2008. **32**(3): p. 313-24.
19. Matsuoka, S., et al., *ATM and ATR substrate analysis reveals extensive protein networks responsive to DNA damage*. Science, 2007. **316**(5828): p. 1160-6.
20. Castillo, V., et al., *Molecular cloning of the Drosophila Fanconi anaemia gene FANCD2 cDNA*. DNA Repair (Amst), 2003. **2**(6): p. 751-8.
21. Matsushita, N., et al., *A FancD2-monoubiquitin fusion reveals hidden functions of Fanconi anemia core complex in DNA repair*. Mol Cell, 2005. **19**(6): p. 841-7.

22. Montes de Oca, R., et al., *Regulated interaction of the Fanconi anemia protein, FANCD2, with chromatin*. Blood, 2005. **105**(3): p. 1003-9.
23. Garcia-Higuera, I., et al., *Interaction of the Fanconi anemia proteins and BRCA1 in a common pathway*. Mol Cell, 2001. **7**(2): p. 249-62.
24. Andreassen, P.R., A.D. D'Andrea, and T. Taniguchi, *ATR couples FANCD2 monoubiquitination to the DNA-damage response*. Genes Dev, 2004. **18**(16): p. 1958-63.
25. Bogliolo, M., et al., *Histone H2AX and Fanconi anemia FANCD2 function in the same pathway to maintain chromosome stability*. EMBO J, 2007. **26**(5): p. 1340-51.
26. Kinner, A., et al., *Gamma-H2AX in recognition and signaling of DNA double-strand breaks in the context of chromatin*. Nucleic Acids Res, 2008. **36**(17): p. 5678-94.
27. Lyakhovich, A. and J. Surrallés, *New roads to FA/BRCA pathway: H2AX*. Cell Cycle, 2007. **6**(9): p. 1019-23.
28. Kalb, R., et al., *Hypomorphic mutations in the gene encoding a key Fanconi anemia protein, FANCD2, sustain a significant group of FA-D2 patients with severe phenotype*. Am J Hum Genet, 2007. **80**(5): p. 895-910.
29. Castella, M., et al., *Origin, functional role, and clinical impact of Fanconi anemia FANCA mutations*. Blood. **117**(14): p. 3759-69.
30. Taniguchi, T., et al., *Convergence of the fanconi anemia and ataxia telangiectasia signaling pathways*. Cell, 2002. **109**(4): p. 459-72.
31. Castillo, P., M. Bogliolo, and J. Surrallés, *Coordinated action of the Fanconi anemia and ataxia telangiectasia pathways in response to oxidative damage*. DNA Repair (Amst). **10**(5): p. 518-25.
32. Wooster, R., et al., *Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA2*. Nature, 1995. **378**(6559): p. 789-92.
33. Easton, D.F., et al., *Genome-wide association study identifies novel breast cancer susceptibility loci*. Nature, 2007. **447**(7148): p. 1087-93.
34. Song, H., et al., *Tagging single nucleotide polymorphisms in the BRIP1 gene and susceptibility to breast and ovarian cancer*. PLoS One, 2007. **2**(3): p. e268.
35. Landwehr, R., et al., *Mutation analysis of the SLX4/FANCP gene in hereditary breast cancer*. Breast Cancer Res Treat.
36. Howlett, N.G., et al., *Biallelic inactivation of BRCA2 in Fanconi anemia*. Science, 2002. **297**(5581): p. 606-9.
37. Somyajit, K., S. Subramanya, and G. Nagaraju, *RAD51C: a novel cancer susceptibility gene is linked to Fanconi anemia and breast cancer*. Carcinogenesis. **31**(12): p. 2031-8.
38. Pellegrini, L., et al., *Insights into DNA recombination from the structure of a RAD51-BRCA2 complex*. Nature, 2002. **420**(6913): p. 287-93.
39. Levitus, M., et al., *The DNA helicase BRIP1 is defective in Fanconi anemia complementation group J*. Nat Genet, 2005. **37**(9): p. 934-5.
40. Litman, R., et al., *BACH1 is critical for homologous recombination and appears to be the Fanconi anemia gene product FANCF*. Cancer Cell, 2005. **8**(3): p. 255-65.
41. Stoepker, C., et al., *SLX4, a coordinator of structure-specific endonucleases, is mutated in a new Fanconi anemia subtype*. Nat Genet. **43**(2): p. 138-41.
42. Svendsen, J.M. and J.W. Harper, *GEN1/Yen1 and the SLX4 complex: Solutions to the problem of Holliday junction resolution*. Genes Dev. **24**(6): p. 521-36.
43. Yamamoto, K.N., et al., *Involvement of SLX4 in interstrand cross-link repair is*

- regulated by the Fanconi anemia pathway*. Proc Natl Acad Sci U S A. **108**(16): p. 6492-6.
44. Lindahl, T., *Instability and decay of the primary structure of DNA*. Nature, 1993. **362**(6422): p. 709-15.
 45. Hoeijmakers, J.H., *Genome maintenance mechanisms for preventing cancer*. Nature, 2001. **411**(6835): p. 366-74.
 46. Harper, J.W. and S.J. Elledge, *The DNA damage response: ten years after*. Mol Cell, 2007. **28**(5): p. 739-45.
 47. Morris, S.M., Jr. and T.R. Billiar, *New insights into the regulation of inducible nitric oxide synthesis*. Am J Physiol, 1994. **266**(6 Pt 1): p. E829-39.
 48. Durocher, D. and S.P. Jackson, *DNA-PK, ATM and ATR as sensors of DNA damage: variations on a theme?* Curr Opin Cell Biol, 2001. **13**(2): p. 225-31.
 49. Jackson, S.P. and J. Bartek, *The DNA-damage response in human biology and disease*. Nature, 2009. **461**(7267): p. 1071-8.
 50. Hiom, K., *Coping with DNA double strand breaks*. DNA Repair (Amst), 2010. **9**(12): p. 1256-63.
 51. Kass, E.M. and M. Jasin, *Collaboration and competition between DNA double-strand break repair pathways*. FEBS Lett. **584**(17): p. 3703-8.
 52. Moynahan, M.E. and M. Jasin, *Mitotic homologous recombination maintains genomic stability and suppresses tumorigenesis*. Nat Rev Mol Cell Biol. **11**(3): p. 196-207.
 53. Lieber, M.R., *The mechanism of human nonhomologous DNA end joining*. J Biol Chem, 2008. **283**(1): p. 1-5.
 54. Lin, F.L., K. Sperle, and N. Sternberg, *Model for homologous recombination during transfer of DNA into mouse L cells: role for DNA ends in the recombination process*. Mol Cell Biol, 1984. **4**(6): p. 1020-34.
 55. Kee, Y. and A.D. D'Andrea, *Expanded roles of the Fanconi anemia pathway in preserving genomic stability*. Genes Dev. **24**(16): p. 1680-94.
 56. Li, X. and W.D. Heyer, *Homologous recombination in DNA repair and DNA damage tolerance*. Cell Res, 2008. **18**(1): p. 99-113.
 57. Schwartz, E.K. and W.D. Heyer, *Processing of joint molecule intermediates by structure-selective endonucleases during homologous recombination in eukaryotes*. Chromosoma. **120**(2): p. 109-27.
 58. West, S.C., *Molecular views of recombination proteins and their control*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2003. **4**(6): p. 435-45.
 59. Holthausen, J.T., C. Wyman, and R. Kanaar, *Regulation of DNA strand exchange in homologous recombination*. DNA Repair (Amst). **9**(12): p. 1264-72.
 60. San Filippo, J., P. Sung, and H. Klein, *Mechanism of eukaryotic homologous recombination*. Annu Rev Biochem, 2008. **77**: p. 229-57.
 61. Holloman, W.K., *Unraveling the mechanism of BRCA2 in homologous recombination*. Nat Struct Mol Biol. **18**(7): p. 748-54.
 62. Yuan, S.S., et al., *BRCA2 is required for ionizing radiation-induced assembly of Rad51 complex in vivo*. Cancer Res, 1999. **59**(15): p. 3547-51.
 63. Shivji, M.K., et al., *The BRC repeats of human BRCA2 differentially regulate RAD51 binding on single- versus double-stranded DNA to stimulate strand exchange*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(32): p. 13254-9.
 64. Carreira, A., et al., *The BRC repeats of BRCA2 modulate the DNA-binding selectivity of RAD51*. Cell, 2009. **136**(6): p. 1032-43.
 65. Yang, H., et al., *BRCA2 function in DNA binding and recombination from a*

- BRCA2-DSS1-ssDNA structure*. Science, 2002. **297**(5588): p. 1837-48.
66. Powell, S.N. and L.A. Kachnic, *Roles of BRCA1 and BRCA2 in homologous recombination, DNA replication fidelity and the cellular response to ionizing radiation*. Oncogene, 2003. **22**(37): p. 5784-91.
 67. Mimitou, E.P. and L.S. Symington, *Nucleases and helicases take center stage in homologous recombination*. Trends Biochem Sci, 2009. **34**(5): p. 264-72.
 68. Cole, F., S. Keeney, and M. Jasin, *Evolutionary conservation of meiotic DSB proteins: more than just Spo11*. Genes Dev. **24**(12): p. 1201-7.
 69. Chu, W.K. and I.D. Hickson, *RecQ helicases: multifunctional genome caretakers*. Nat Rev Cancer, 2009. **9**(9): p. 644-54.
 70. Heller, R.C. and K.J. Marians, *Replisome assembly and the direct restart of stalled replication forks*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2006. **7**(12): p. 932-43.
 71. Szostak, J.W., et al., *The double-strand-break repair model for recombination*. Cell, 1983. **33**(1): p. 25-35.
 72. Goggins, M., et al., *Germline BRCA2 gene mutations in patients with apparently sporadic pancreatic carcinomas*. Cancer Res, 1996. **56**(23): p. 5360-4.
 73. Chen, P.L., et al., *The BRC repeats in BRCA2 are critical for RAD51 binding and resistance to methyl methanesulfonate treatment*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(9): p. 5287-92.
 74. Chen, J., et al., *Stable interaction between the products of the BRCA1 and BRCA2 tumor suppressor genes in mitotic and meiotic cells*. Mol Cell, 1998. **2**(3): p. 317-28.
 75. Moynahan, M.E., et al., *Brcal controls homology-directed DNA repair*. Mol Cell, 1999. **4**(4): p. 511-8.
 76. Moynahan, M.E., A.J. Pierce, and M. Jasin, *BRCA2 is required for homology-directed repair of chromosomal breaks*. Mol Cell, 2001. **7**(2): p. 263-72.
 77. DeFazio, L.G., et al., *Synapsis of DNA ends by DNA-dependent protein kinase*. EMBO J, 2002. **21**(12): p. 3192-200.
 78. Critchlow, S.E. and S.P. Jackson, *DNA end-joining: from yeast to man*. Trends Biochem Sci, 1998. **23**(10): p. 394-8.
 79. Doherty, A.J. and S.P. Jackson, *DNA repair: how Ku makes ends meet*. Curr Biol, 2001. **11**(22): p. R920-4.
 80. Stark, J.M., et al., *Genetic steps of mammalian homologous repair with distinct mutagenic consequences*. Mol Cell Biol, 2004. **24**(21): p. 9305-16.
 81. Mortensen, U.H., et al., *DNA strand annealing is promoted by the yeast Rad52 protein*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(20): p. 10729-34.
 82. Fishman-Lobell, J. and J.E. Haber, *Removal of nonhomologous DNA ends in double-strand break recombination: the role of the yeast ultraviolet repair gene RAD1*. Science, 1992. **258**(5081): p. 480-4.
 83. Rothkamm, K., et al., *Pathways of DNA double-strand break repair during the mammalian cell cycle*. Mol Cell Biol, 2003. **23**(16): p. 5706-15.
 84. Pierce, A.J., et al., *Double-strand breaks and tumorigenesis*. Trends Cell Biol, 2001. **11**(11): p. S52-9.
 85. Mills, K.D., et al., *Rad54 and DNA Ligase IV cooperate to maintain mammalian chromatid stability*. Genes Dev, 2004. **18**(11): p. 1283-92.
 86. Couedel, C., et al., *Collaboration of homologous recombination and nonhomologous end-joining factors for the survival and integrity of mice and cells*. Genes Dev, 2004. **18**(11): p. 1293-304.
 87. Ceccaldi, R., et al., *Spontaneous abrogation of the G2DNA damage checkpoint has clinical benefits but promotes leukemogenesis in Fanconi anemia patients*. J

- Clin Invest. **121**(1): p. 184-94.
88. Wilke, C.M., et al., *FRA3B extends over a broad region and contains a spontaneous HPV16 integration site: direct evidence for the coincidence of viral integration sites and fragile sites*. Hum Mol Genet, 1996. **5**(2): p. 187-95.
 89. Kennedy, R.D. and A.D. D'Andrea, *The Fanconi Anemia/BRCA pathway: new faces in the crowd*. Genes Dev, 2005. **19**(24): p. 2925-40.
 90. Moldovan, G.L. and A.D. D'Andrea, *How the fanconi anemia pathway guards the genome*. Annu Rev Genet, 2009. **43**: p. 223-49.
 91. De Silva, I.U., et al., *Defining the roles of nucleotide excision repair and recombination in the repair of DNA interstrand cross-links in mammalian cells*. Mol Cell Biol, 2000. **20**(21): p. 7980-90.
 92. Dronkert, M.L. and R. Kanaar, *Repair of DNA interstrand cross-links*. Mutat Res, 2001. **486**(4): p. 217-47.
 93. Takata, M., M. Ishiai, and H. Kitao, *The Fanconi anemia pathway: insights from somatic cell genetics using DT40 cell line*. Mutat Res, 2009. **668**(1-2): p. 92-102.
 94. Su, X. and J. Huang, *The Fanconi anemia pathway and DNA interstrand cross-link repair*. Protein Cell. **2**(9): p. 704-11.
 95. Bunting, S.F. and A. Nussenzweig, *Dangerous liaisons: Fanconi anemia and toxic nonhomologous end joining in DNA crosslink repair*. Mol Cell. **39**(2): p. 164-6.
 96. Adamo, A., et al., *Preventing nonhomologous end joining suppresses DNA repair defects of Fanconi anemia*. Mol Cell. **39**(1): p. 25-35.
 97. Robson, M. and K. Offit, *Clinical practice. Management of an inherited predisposition to breast cancer*. N Engl J Med, 2007. **357**(2): p. 154-62.
 98. Ripperger, T., et al., *Breast cancer susceptibility: current knowledge and implications for genetic counselling*. Eur J Hum Genet, 2009. **17**(6): p. 722-31.
 99. Easton, D.F., D. Ford, and D.T. Bishop, *Breast and ovarian cancer incidence in BRCA1-mutation carriers*. Breast Cancer Linkage Consortium. Am J Hum Genet, 1995. **56**(1): p. 265-71.
 100. Ford, D., et al., *Genetic heterogeneity and penetrance analysis of the BRCA1 and BRCA2 genes in breast cancer families*. The Breast Cancer Linkage Consortium. Am J Hum Genet, 1998. **62**(3): p. 676-89.
 101. Antoniou, A., et al., *Average risks of breast and ovarian cancer associated with BRCA1 or BRCA2 mutations detected in case Series unselected for family history: a combined analysis of 22 studies*. Am J Hum Genet, 2003. **72**(5): p. 1117-30.
 102. Begg, C.B., et al., *Variation of breast cancer risk among BRCA1/2 carriers*. JAMA, 2008. **299**(2): p. 194-201.
 103. Simchoni, S., et al., *Familial clustering of site-specific cancer risks associated with BRCA1 and BRCA2 mutations in the Ashkenazi Jewish population*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(10): p. 3770-4.
 104. Nathanson, K.L., R. Wooster, and B.L. Weber, *Breast cancer genetics: what we know and what we need*. Nat Med, 2001. **7**(5): p. 552-6.
 105. Meindl, A., *Comprehensive analysis of 989 patients with breast or ovarian cancer provides BRCA1 and BRCA2 mutation profiles and frequencies for the German population*. Int J Cancer, 2002. **97**(4): p. 472-80.
 106. Turnbull, C. and N. Rahman, *Genetic predisposition to breast cancer: past, present, and future*. Annu Rev Genomics Hum Genet, 2008. **9**: p. 321-45.
 107. Balmain, A., J. Gray, and B. Ponder, *The genetics and genomics of cancer*. Nat

- Genet, 2003. **33 Suppl**: p. 238-44.
108. Narod, S.A., *Modifiers of risk of hereditary breast and ovarian cancer*. Nat Rev Cancer, 2002. **2**(2): p. 113-23.
109. Narod, S.A. and W.D. Foulkes, *BRCA1 and BRCA2: 1994 and beyond*. Nat Rev Cancer, 2004. **4**(9): p. 665-76.
110. Turner, N., A. Tutt, and A. Ashworth, *Hallmarks of 'BRCAness' in sporadic cancers*. Nat Rev Cancer, 2004. **4**(10): p. 814-9.
111. Whittemore, A.S., R. Harris, and J. Itnyre, *Characteristics relating to ovarian cancer risk: collaborative analysis of 12 US case-control studies. IV. The pathogenesis of epithelial ovarian cancer. Collaborative Ovarian Cancer Group*. Am J Epidemiol, 1992. **136**(10): p. 1212-20.
112. van den Brandt, P.A., et al., *Pooled analysis of prospective cohort studies on height, weight, and breast cancer risk*. Am J Epidemiol, 2000. **152**(6): p. 514-27.
113. Gwinn, M.L., et al., *Pregnancy, breast feeding, and oral contraceptives and the risk of epithelial ovarian cancer*. J Clin Epidemiol, 1990. **43**(6): p. 559-68.
114. Elmasry, K. and S.A. Gayther, *Ovarian cancer aetiology: facts and fiction*. J Fam Plann Reprod Health Care, 2006. **32**(2): p. 82-6.
115. Hamajima, N., et al., *Alcohol, tobacco and breast cancer--collaborative reanalysis of individual data from 53 epidemiological studies, including 58,515 women with breast cancer and 95,067 women without the disease*. Br J Cancer, 2002. **87**(11): p. 1234-45.
116. Kelsey, J.L., M.D. Gammon, and E.M. John, *Reproductive factors and breast cancer*. Epidemiol Rev, 1993. **15**(1): p. 36-47.
117. *Breast cancer and hormonal contraceptives: collaborative reanalysis of individual data on 53 297 women with breast cancer and 100 239 women without breast cancer from 54 epidemiological studies. Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer*. Lancet, 1996. **347**(9017): p. 1713-27.
118. *Breast cancer and hormone replacement therapy: collaborative reanalysis of data from 51 epidemiological studies of 52,705 women with breast cancer and 108,411 women without breast cancer. Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer*. Lancet, 1997. **350**(9084): p. 1047-59.
119. *Breast cancer and breastfeeding: collaborative reanalysis of individual data from 47 epidemiological studies in 30 countries, including 50302 women with breast cancer and 96973 women without the disease*. Lancet, 2002. **360**(9328): p. 187-95.
120. *Familial breast cancer: collaborative reanalysis of individual data from 52 epidemiological studies including 58,209 women with breast cancer and 101,986 women without the disease*. Lancet, 2001. **358**(9291): p. 1389-99.
121. Beggs, A.D. and S.V. Hodgson, *Genomics and breast cancer: the different levels of inherited susceptibility*. Eur J Hum Genet, 2009. **17**(7): p. 855-6.
122. Futreal, P.A., et al., *BRCA1 mutations in primary breast and ovarian carcinomas*. Science, 1994. **266**(5182): p. 120-2.
123. Miki, Y., et al., *A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1*. Science, 1994. **266**(5182): p. 66-71.
124. Renwick, A., et al., *ATM mutations that cause ataxia-telangiectasia are breast cancer susceptibility alleles*. Nat Genet, 2006. **38**(8): p. 873-5.
125. Seal, S., et al., *Truncating mutations in the Fanconi anemia J gene BRIP1 are low-penetrance breast cancer susceptibility alleles*. Nat Genet, 2006. **38**(11): p. 1239-41.

126. Nevanlinna, H. and J. Bartek, *The CHEK2 gene and inherited breast cancer susceptibility*. *Oncogene*, 2006. **25**(43): p. 5912-9.
127. Meijers-Heijboer, H., et al., *Low-penetrance susceptibility to breast cancer due to CHEK2(*)1100delC in noncarriers of BRCA1 or BRCA2 mutations*. *Nat Genet*, 2002. **31**(1): p. 55-9.
128. Rahman, N., et al., *PALB2, which encodes a BRCA2-interacting protein, is a breast cancer susceptibility gene*. *Nat Genet*, 2007. **39**(2): p. 165-7.
129. Hunter, D.J., et al., *A genome-wide association study identifies alleles in FGFR2 associated with risk of sporadic postmenopausal breast cancer*. *Nat Genet*, 2007. **39**(7): p. 870-4.
130. Cox, A., et al., *A common coding variant in CASP8 is associated with breast cancer risk*. *Nat Genet*, 2007. **39**(3): p. 352-8.
131. Stacey, S.N., et al., *Common variants on chromosomes 2q35 and 16q12 confer susceptibility to estrogen receptor-positive breast cancer*. *Nat Genet*, 2007. **39**(7): p. 865-9.
132. Hall, J.M., et al., *Linkage of early-onset familial breast cancer to chromosome 17q21*. *Science*, 1990. **250**(4988): p. 1684-9.
133. Baynes, C., et al., *Common variants in the ATM, BRCA1, BRCA2, CHEK2 and TP53 cancer susceptibility genes are unlikely to increase breast cancer risk*. *Breast Cancer Res*, 2007. **9**(2): p. R27.
134. Howlett, N.G., *Fanconi anemia: Fanconi anemia, breast and embryonal cancer risk revisited*. *Eur J Hum Genet*, 2007. **15**(7): p. 715-7.
135. Thomas, G., et al., *A multistage genome-wide association study in breast cancer identifies two new risk alleles at 1p11.2 and 14q24.1 (RAD51L1)*. *Nat Genet*, 2009. **41**(5): p. 579-84.
136. Kruglyak, L., *The road to genome-wide association studies*. *Nat Rev Genet*, 2008. **9**(4): p. 314-8.
137. Antoniou, A.C. and D.F. Easton, *Models of genetic susceptibility to breast cancer*. *Oncogene*, 2006. **25**(43): p. 5898-905.
138. Smith, A., et al., *Phenocopies in BRCA1 and BRCA2 families: evidence for modifier genes and implications for screening*. *J Med Genet*, 2007. **44**(1): p. 10-15.
139. Chenevix-Trench, G., et al., *An international initiative to identify genetic modifiers of cancer risk in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: the Consortium of Investigators of Modifiers of BRCA1 and BRCA2 (CIMBA)*. *Breast Cancer Res*, 2007. **9**(2): p. 104.
140. Levy-Lahad, E., et al., *A single nucleotide polymorphism in the RAD51 gene modifies cancer risk in BRCA2 but not BRCA1 carriers*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. **98**(6): p. 3232-6.
141. Boyd, N.F., et al., *Heritability of mammographic density, a risk factor for breast cancer*. *N Engl J Med*, 2002. **347**(12): p. 886-94.
142. Mitchell, G., et al., *Mammographic density and breast cancer risk in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers*. *Cancer Res*, 2006. **66**(3): p. 1866-72.
143. Milne, R.L. and A.C. Antoniou, *Genetic modifiers of cancer risk for BRCA1 and BRCA2 mutation carriers*. *Ann Oncol*. **22 Suppl 1**: p. i11-7.
144. Garcia-Closas, M. and S. Chanock, *Genetic susceptibility loci for breast cancer by estrogen receptor status*. *Clin Cancer Res*, 2008. **14**(24): p. 8000-9.
145. Lakhani, S.R., et al., *The pathology of familial breast cancer: predictive value of immunohistochemical markers estrogen receptor, progesterone receptor, HER-2, and p53 in patients with mutations in BRCA1 and BRCA2*. *J Clin Oncol*,

2002. **20**(9): p. 2310-8.
146. Godthelp, B.C., et al., *Inducibility of nuclear Rad51 foci after DNA damage distinguishes all Fanconi anemia complementation groups from D1/BRCA2*. *Mutat Res*, 2006. **594**(1-2): p. 39-48.
147. Greenberg, R.A., et al., *Multifactorial contributions to an acute DNA damage response by BRCA1/BARD1-containing complexes*. *Genes Dev*, 2006. **20**(1): p. 34-46.
148. Hussain, S., et al., *Direct interaction of FANCD2 with BRCA2 in DNA damage response pathways*. *Hum Mol Genet*, 2004. **13**(12): p. 1241-8.
149. Nakanishi, K., et al., *Human Fanconi anemia monoubiquitination pathway promotes homologous DNA repair*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. **102**(4): p. 1110-5.
150. Yamamoto, K., et al., *Fanconi anemia FANCG protein in mitigating radiation- and enzyme-induced DNA double-strand breaks by homologous recombination in vertebrate cells*. *Mol Cell Biol*, 2003. **23**(15): p. 5421-30.
151. Offit, K., et al., *Shared genetic susceptibility to breast cancer, brain tumors, and Fanconi anemia*. *J Natl Cancer Inst*, 2003. **95**(20): p. 1548-51.
152. Wooster, R., et al., *Localization of a breast cancer susceptibility gene, BRCA2, to chromosome 13q12-13*. *Science*, 1994. **265**(5181): p. 2088-90.
153. Boulton, S.J., *Cellular functions of the BRCA tumour-suppressor proteins*. *Biochem Soc Trans*, 2006. **34**(Pt 5): p. 633-45.
154. Jasin, M., *Homologous repair of DNA damage and tumorigenesis: the BRCA connection*. *Oncogene*, 2002. **21**(58): p. 8981-93.
155. Venkitaraman, A.R., *Cancer susceptibility and the functions of BRCA1 and BRCA2*. *Cell*, 2002. **108**(2): p. 171-82.
156. Mankouri, H.W. and I.D. Hickson, *Understanding the roles of RecQ helicases in the maintenance of genome integrity and suppression of tumorigenesis*. *Biochem Soc Trans*, 2004. **32**(Pt 6): p. 957-8.
157. Scully, R., et al., *Association of BRCA1 with Rad51 in mitotic and meiotic cells*. *Cell*, 1997. **88**(2): p. 265-75.
158. Scully, R., et al., *Dynamic changes of BRCA1 subnuclear location and phosphorylation state are initiated by DNA damage*. *Cell*, 1997. **90**(3): p. 425-35.
159. Scully, R. and D.M. Livingston, *In search of the tumour-suppressor functions of BRCA1 and BRCA2*. *Nature*, 2000. **408**(6811): p. 429-32.
160. Zhang, J. and S.N. Powell, *The role of the BRCA1 tumor suppressor in DNA double-strand break repair*. *Mol Cancer Res*, 2005. **3**(10): p. 531-9.
161. Lim, E., et al., *Aberrant luminal progenitors as the candidate target population for basal tumor development in BRCA1 mutation carriers*. *Nat Med*, 2009. **15**(8): p. 907-13.
162. Tischkowitz, M.D. and W.D. Foulkes, *The basal phenotype of BRCA1-related breast cancer: past, present and future*. *Cell Cycle*, 2006. **5**(9): p. 963-7.
163. Foulkes, W.D., *BRCA1 functions as a breast stem cell regulator*. *J Med Genet*, 2004. **41**(1): p. 1-5.
164. Maxwell, C.A., et al., *Interplay between BRCA1 and RHAMM Regulates Epithelial Apicobasal Polarization and May Influence Risk of Breast Cancer*. *PLoS Biol*. **9**(11): p. e1001199.
165. Chen, J.J., et al., *BRCA1, BRCA2, and Rad51 operate in a common DNA damage response pathway*. *Cancer Res*, 1999. **59**(7 Suppl): p. 1752s-1756s.
166. Wong, A.K., et al., *RAD51 interacts with the evolutionarily conserved BRC*

- motifs in the human breast cancer susceptibility gene brca2*. J Biol Chem, 1997. **272**(51): p. 31941-4.
167. Patel, K.J., et al., *Involvement of Brca2 in DNA repair*. Mol Cell, 1998. **1**(3): p. 347-57.
168. Ludwig, T., et al., *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, 1997. **11**(10): p. 1226-41.
169. Tsuzuki, T., et al., *Targeted disruption of the Rad51 gene leads to lethality in embryonic mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(13): p. 6236-40.
170. Sharan, S.K., et al., *Embryonic lethality and radiation hypersensitivity mediated by Rad51 in mice lacking Brca2*. Nature, 1997. **386**(6627): p. 804-10.
171. Marston, N.J., et al., *Interaction between the product of the breast cancer susceptibility gene BRCA2 and DSS1, a protein functionally conserved from yeast to mammals*. Mol Cell Biol, 1999. **19**(7): p. 4633-42.
172. Gudmundsdottir, K., et al., *DSS1 is required for RAD51 focus formation and genomic stability in mammalian cells*. EMBO Rep, 2004. **5**(10): p. 989-93.
173. Xia, B., et al., *Control of BRCA2 cellular and clinical functions by a nuclear partner, PALB2*. Mol Cell, 2006. **22**(6): p. 719-29.
174. Reid, S., et al., *Biallelic mutations in PALB2 cause Fanconi anemia subtype FA-N and predispose to childhood cancer*. Nat Genet, 2007. **39**(2): p. 162-4.
175. Hayakawa, T., et al., *MRG15 binds directly to PALB2 and stimulates homology-directed repair of chromosomal breaks*. J Cell Sci. **123**(Pt 7): p. 1124-30.
176. Sy, S.M., M.S. Huen, and J. Chen, *MRG15 is a novel PALB2-interacting factor involved in homologous recombination*. J Biol Chem, 2009. **284**(32): p. 21127-31.
177. Martrat, G., et al., *Exploring the link between MORF4L1 and risk of breast cancer*. Breast Cancer Res. **13**(2): p. R40.
178. Stark, J.M., et al., *ATP hydrolysis by mammalian RAD51 has a key role during homology-directed DNA repair*. J Biol Chem, 2002. **277**(23): p. 20185-94.
179. Sy, S.M., M.S. Huen, and J. Chen, *PALB2 is an integral component of the BRCA complex required for homologous recombination repair*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(17): p. 7155-60.
180. Garner, E. and A. Smogorzewska, *Ubiquitylation and the Fanconi anemia pathway*. FEBS Lett. **585**(18): p. 2853-60.
181. Chen, M., et al., *MRG15, a component of HAT and HDAC complexes, is essential for proliferation and differentiation of neural precursor cells*. J Neurosci Res, 2009. **87**(7): p. 1522-31.
182. Garcia, S.N., et al., *Mrg15 null and heterozygous mouse embryonic fibroblasts exhibit DNA-repair defects post exposure to gamma ionizing radiation*. FEBS Lett, 2007. **581**(27): p. 5275-81.
183. Tominaga, K., et al., *MRG15 regulates embryonic development and cell proliferation*. Mol Cell Biol, 2005. **25**(8): p. 2924-37.
184. Pardo, P.S., et al., *MRG15, a novel chromodomain protein, is present in two distinct multiprotein complexes involved in transcriptional activation*. J Biol Chem, 2002. **277**(52): p. 50860-6.
185. Fields, S. and O. Song, *A novel genetic system to detect protein-protein interactions*. Nature, 1989. **340**(6230): p. 245-6.
186. Walhout, A.J. and M. Vidal, *High-throughput yeast two-hybrid assays for large-scale protein interaction mapping*. Methods, 2001. **24**(3): p. 297-306.
187. Vidalain, P.O., et al., *Increasing specificity in high-throughput yeast two-hybrid*

- experiments*. Methods, 2004. **32**(4): p. 363-70.
188. Finn, R.D., et al., *The Pfam protein families database*. Nucleic Acids Res, 2008. **36**(Database issue): p. D281-8.
 189. Romero, P., Z. Obradovic, and A.K. Dunker, *Natively disordered proteins: functions and predictions*. Appl Bioinformatics, 2004. **3**(2-3): p. 105-13.
 190. Su, A.I., et al., *A gene atlas of the mouse and human protein-encoding transcriptomes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(16): p. 6062-7.
 191. Stiernagle, T., *Maintenance of C. elegans*. WormBook, 2006: p. 1-11.
 192. Rozen, S. and H. Skaletsky, *Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers*. Methods Mol Biol, 2000. **132**: p. 365-86.
 193. Antoniou, A.C., et al., *Common variants in LSP1, 2q35 and 8q24 and breast cancer risk for BRCA1 and BRCA2 mutation carriers*. Hum Mol Genet, 2009. **18**(22): p. 4442-56.
 194. Antoniou, A.C., et al., *A weighted cohort approach for analysing factors modifying disease risks in carriers of high-risk susceptibility genes*. Genet Epidemiol, 2005. **29**(1): p. 1-11.
 195. Abraham, R.T., *Cell cycle checkpoint signaling through the ATM and ATR kinases*. Genes Dev, 2001. **15**(17): p. 2177-96.
 196. Matsuoka, S., M. Huang, and S.J. Elledge, *Linkage of ATM to cell cycle regulation by the Chk2 protein kinase*. Science, 1998. **282**(5395): p. 1893-7.
 197. Lee, J.S., et al., *hCds1-mediated phosphorylation of BRCA1 regulates the DNA damage response*. Nature, 2000. **404**(6774): p. 201-4.
 198. Bartek, J. and J. Lukas, *Chk1 and Chk2 kinases in checkpoint control and cancer*. Cancer Cell, 2003. **3**(5): p. 421-9.
 199. Bell, D.W., et al., *Heterozygous germ line hCHK2 mutations in Li-Fraumeni syndrome*. Science, 1999. **286**(5449): p. 2528-31.
 200. Gregg, S.Q., A.R. Robinson, and L.J. Niedernhofer, *Physiological consequences of defects in ERCC1-XPF DNA repair endonuclease*. DNA Repair (Amst). **10**(7): p. 781-91.
 201. Ahmad, A., et al., *ERCC1-XPF endonuclease facilitates DNA double-strand break repair*. Mol Cell Biol, 2008. **28**(16): p. 5082-92.
 202. Suhasini, A.N. and R.M. Brosh, Jr., *Fanconi anemia and Bloom's syndrome crosstalk through FANCD1-BLM helicase interaction*. Trends Genet.
 203. Ward, J.J., et al., *Prediction and functional analysis of native disorder in proteins from the three kingdoms of life*. J Mol Biol, 2004. **337**(3): p. 635-45.
 204. Lobley, A., et al., *Inferring function using patterns of native disorder in proteins*. PLoS Comput Biol, 2007. **3**(8): p. e162.
 205. Rual, J.F., et al., *Towards a proteome-scale map of the human protein-protein interaction network*. Nature, 2005. **437**(7062): p. 1173-8.
 206. Pujana, M.A., et al., *Network modeling links breast cancer susceptibility and centrosome dysfunction*. Nat Genet, 2007. **39**(11): p. 1338-49.
 207. Langland, G., et al., *The Bloom's syndrome protein (BLM) interacts with MLH1 but is not required for DNA mismatch repair*. J Biol Chem, 2001. **276**(32): p. 30031-5.
 208. Park, C.H. and A. Sancar, *Formation of a ternary complex by human XPA, ERCC1, and ERCC4(XPF) excision repair proteins*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(11): p. 5017-21.
 209. Sowa, M.E., et al., *Defining the human deubiquitinating enzyme interaction landscape*. Cell, 2009. **138**(2): p. 389-403.
 210. Bertram, M.J., et al., *Identification of a gene that reverses the immortal*

- phenotype of a subset of cells and is a member of a novel family of transcription factor-like genes. Mol Cell Biol, 1999. 19(2): p. 1479-85.*
211. Bertram, M.J. and O.M. Pereira-Smith, *Conservation of the MORF4 related gene family: identification of a new chromo domain subfamily and novel protein motif. Gene, 2001. 266(1-2): p. 111-21.*
 212. Pena, A.N. and O.M. Pereira-Smith, *The role of the MORF/MRG family of genes in cell growth, differentiation, DNA repair, and thereby aging. Ann N Y Acad Sci, 2007. 1100: p. 299-305.*
 213. Chen, M., K. Tominaga, and O.M. Pereira-Smith, *Emerging role of the MORF/MRG gene family in various biological processes, including aging. Ann N Y Acad Sci. 1197: p. 134-41.*
 214. Morrison, A.J. and X. Shen, *Chromatin modifications in DNA repair. Results Probl Cell Differ, 2006. 41: p. 109-25.*
 215. Moshkin, Y.M., et al., *Histone chaperones ASF1 and NAP1 differentially modulate removal of active histone marks by LID-RPD3 complexes during NOTCH silencing. Mol Cell, 2009. 35(6): p. 782-93.*
 216. Collins, S.R., et al., *Functional dissection of protein complexes involved in yeast chromosome biology using a genetic interaction map. Nature, 2007. 446(7137): p. 806-10.*
 217. Zhang, P., et al., *The MRG domain of human MRG15 uses a shallow hydrophobic pocket to interact with the N-terminal region of PAM14. Protein Sci, 2006. 15(10): p. 2423-34.*
 218. Xia, B., et al., *Fanconi anemia is associated with a defect in the BRCA2 partner PALB2. Nat Genet, 2007. 39(2): p. 159-61.*
 219. Niedzwiedz, W., et al., *The Fanconi anaemia gene FANCC promotes homologous recombination and error-prone DNA repair. Mol Cell, 2004. 15(4): p. 607-20.*
 220. Hinz, J.M., et al., *The Fanconi anemia pathway limits the severity of mutagenesis. DNA Repair (Amst), 2006. 5(8): p. 875-84.*
 221. Zhang, F., et al., *PALB2 functionally connects the breast cancer susceptibility proteins BRCA1 and BRCA2. Mol Cancer Res, 2009. 7(7): p. 1110-8.*
 222. Zhang, F., et al., *PALB2 links BRCA1 and BRCA2 in the DNA-damage response. Curr Biol, 2009. 19(6): p. 524-9.*
 223. Temime-Smaali, N., et al., *Topoisomerase IIIalpha is required for normal proliferation and telomere stability in alternative lengthening of telomeres. EMBO J, 2008. 27(10): p. 1513-24.*
 224. Leteurtre, F., et al., *Accelerated telomere shortening and telomerase activation in Fanconi's anaemia. Br J Haematol, 1999. 105(4): p. 883-93.*
 225. Ball, S.E., et al., *Progressive telomere shortening in aplastic anemia. Blood, 1998. 91(10): p. 3582-92.*
 226. Callen, E., et al., *Breaks at telomeres and TRF2-independent end fusions in Fanconi anemia. Hum Mol Genet, 2002. 11(4): p. 439-44.*
 227. Fan, Q., et al., *A role for monoubiquitinated FANCD2 at telomeres in ALT cells. Nucleic Acids Res, 2009. 37(6): p. 1740-54.*
 228. Franco, S., et al., *Telomere dynamics in Fancg-deficient mouse and human cells. Blood, 2004. 104(13): p. 3927-35.*
 229. Rhee, D.B., et al., *FANCC suppresses short telomere-initiated telomere sister chromatid exchange. Hum Mol Genet. 19(5): p. 879-87.*
 230. Venkitaraman, A.R., *Functions of BRCA1 and BRCA2 in the biological response to DNA damage. J Cell Sci, 2001. 114(Pt 20): p. 3591-8.*

231. Petalcorin, M.I., et al., *Stabilization of RAD-51-DNA filaments via an interaction domain in Caenorhabditis elegans BRCA2*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(20): p. 8299-304.
232. Martin, J.S., et al., *RAD-51-dependent and -independent roles of a Caenorhabditis elegans BRCA2-related protein during DNA double-strand break repair*. Mol Cell Biol, 2005. **25**(8): p. 3127-39.
233. Ko, E., J. Lee, and H. Lee, *Essential role of brc-2 in chromosome integrity of germ cells in C. elegans*. Mol Cells, 2008. **26**(6): p. 590-4.
234. Fujita, M., et al., *MRG-1, a mortality factor-related chromodomain protein, is required maternally for primordial germ cells to initiate mitotic proliferation in C. elegans*. Mech Dev, 2002. **114**(1-2): p. 61-9.
235. Takasaki, T., et al., *MRG-1, an autosome-associated protein, silences X-linked genes and protects germline immortality in Caenorhabditis elegans*. Development, 2007. **134**(4): p. 757-67.
236. Rio Frio, T., et al., *Mutation analysis of the gene encoding the PALB2-binding protein MRG15 in BRCA1/2-negative breast cancer families*. J Hum Genet. **55**(12): p. 842-3.
237. Meindl, A., et al., *Germline mutations in breast and ovarian cancer pedigrees establish RAD51C as a human cancer susceptibility gene*. Nat Genet. **42**(5): p. 410-4.
238. Jones, S., et al., *Exomic sequencing identifies PALB2 as a pancreatic cancer susceptibility gene*. Science, 2009. **324**(5924): p. 217.
239. Jorgenson, T.C., et al., *Identification of susceptibility loci in a mouse model of KRASG12D-driven pancreatic cancer*. Cancer Res. **70**(21): p. 8398-406.
240. Antoniou, A.C., et al., *RAD51 135G-->C modifies breast cancer risk among BRCA2 mutation carriers: results from a combined analysis of 19 studies*. Am J Hum Genet, 2007. **81**(6): p. 1186-200.
241. Antoniou, A.C., et al., *Common breast cancer-predisposition alleles are associated with breast cancer risk in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers*. Am J Hum Genet, 2008. **82**(4): p. 937-48.
242. Levitus, M., H. Joenje, and J.P. de Winter, *The Fanconi anemia pathway of genomic maintenance*. Cell Oncol, 2006. **28**(1-2): p. 3-29.
243. Park, J.W., et al., *Deficiencies in the Fanconi anemia DNA damage response pathway increase sensitivity to HPV-associated head and neck cancer*. Cancer Res. **70**(23): p. 9959-68.
244. Hayakawa, T., et al., *RBP2 is an MRG15 complex component and down-regulates intragenic histone H3 lysine 4 methylation*. Genes Cells, 2007. **12**(6): p. 811-26.
245. Bridge, W.L., et al., *The BRIP1 helicase functions independently of BRCA1 in the Fanconi anemia pathway for DNA crosslink repair*. Nat Genet, 2005. **37**(9): p. 953-7.
246. Moynahan, M.E., T.Y. Cui, and M. Jasin, *Homology-directed dna repair, mitomycin-c resistance, and chromosome stability is restored with correction of a Brca1 mutation*. Cancer Res, 2001. **61**(12): p. 4842-50.
247. Zhang, N., et al., *Double-strand breaks induce homologous recombinational repair of interstrand cross-links via cooperation of MSH2, ERCC1-XPF, REV3, and the Fanconi anemia pathway*. DNA Repair (Amst), 2007. **6**(11): p. 1670-8.
248. Youds, J.L., L.J. Barber, and S.J. Boulton, *C. elegans: a model of Fanconi anemia and ICL repair*. Mutat Res, 2009. **668**(1-2): p. 103-16.
249. Vaz, F., et al., *Mutation of the RAD51C gene in a Fanconi anemia-like disorder*.

- Nat Genet. **42**(5): p. 406-9.
250. Kim, Y., et al., *Mutations of the SLX4 gene in Fanconi anemia*. Nat Genet. **43**(2): p. 142-6.
251. Crossan, G.P., et al., *Disruption of mouse Slx4, a regulator of structure-specific nucleases, phenocopies Fanconi anemia*. Nat Genet. **43**(2): p. 147-52.
252. Wooster, R. and B.L. Weber, *Breast and ovarian cancer*. N Engl J Med, 2003. **348**(23): p. 2339-47.
253. Shuen, A.Y. and W.D. Foulkes, *Inherited mutations in breast cancer genes--risk and response*. J Mammary Gland Biol Neoplasia. **16**(1): p. 3-15.
254. Erkkö, H., et al., *A recurrent mutation in PALB2 in Finnish cancer families*. Nature, 2007. **446**(7133): p. 316-9.
255. Turnbull, C., et al., *Genome-wide association study identifies five new breast cancer susceptibility loci*. Nat Genet. **42**(6): p. 504-7.
256. Kraft, P. and D.J. Hunter, *Genetic risk prediction--are we there yet?* N Engl J Med, 2009. **360**(17): p. 1701-3.
257. Mesplede, T., et al., *P53-degradation activity, Expression and Subcellular Localization of E6 Proteins from 29 Human Papillomavirus Genotypes*. J Virol.
258. Levine, A.J., *p53, the cellular gatekeeper for growth and division*. Cell, 1997. **88**(3): p. 323-31.
259. Werness, B.A., A.J. Levine, and P.M. Howley, *Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53*. Science, 1990. **248**(4951): p. 76-9.
260. Band, V., et al., *Loss of p53 protein in human papillomavirus type 16 E6-immortalized human mammary epithelial cells*. J Virol, 1991. **65**(12): p. 6671-6.
261. Kumar, A., et al., *Human papillomavirus oncoprotein E6 inactivates the transcriptional coactivator human ADA3*. Mol Cell Biol, 2002. **22**(16): p. 5801-12.
262. Gao, Q., et al., *The E6 oncoproteins of high-risk papillomaviruses bind to a novel putative GAP protein, E6TP1, and target it for degradation*. Mol Cell Biol, 1999. **19**(1): p. 733-44.
263. Gao, Q., et al., *Human papillomavirus type 16 E6-induced degradation of E6TP1 correlates with its ability to immortalize human mammary epithelial cells*. J Virol, 2001. **75**(9): p. 4459-66.
264. Brinkmann, T., et al., *Rap-specific GTPase activating protein follows an alternative mechanism*. J Biol Chem, 2002. **277**(15): p. 12525-31.
265. Hattori, M., et al., *Molecular cloning of a novel mitogen-inducible nuclear protein with a Ran GTPase-activating domain that affects cell cycle progression*. Mol Cell Biol, 1995. **15**(1): p. 552-60.
266. Kurachi, H., et al., *Human SPA-1 gene product selectively expressed in lymphoid tissues is a specific GTPase-activating protein for Rap1 and Rap2. Segregate expression profiles from a rap1GAP gene product*. J Biol Chem, 1997. **272**(44): p. 28081-8.
267. *Identification and characterization of the tuberous sclerosis gene on chromosome 16*. Cell, 1993. **75**(7): p. 1305-15.
268. Menon, A.G., et al., *Frequent loss of chromosome 14 in atypical and malignant meningioma: identification of a putative 'tumor progression' locus*. Oncogene, 1997. **14**(5): p. 611-6.
269. Singh, L., et al., *The high-risk human papillomavirus type 16 E6 counters the GAP function of E6TP1 toward small Rap G proteins*. J Virol, 2003. **77**(2): p. 1614-20.

270. Gillison, M.L., et al., *Evidence for a causal association between human papillomavirus and a subset of head and neck cancers*. J Natl Cancer Inst, 2000. **92**(9): p. 709-20.
271. Ragin, C.C., F. Modugno, and S.M. Gollin, *The epidemiology and risk factors of head and neck cancer: a focus on human papillomavirus*. J Dent Res, 2007. **86**(2): p. 104-14.
272. Kutler, D.I., et al., *A 20-year perspective on the International Fanconi Anemia Registry (IFAR)*. Blood, 2003. **101**(4): p. 1249-56.
273. Lowy, D.R. and M.L. Gillison, *A new link between Fanconi anemia and human papillomavirus-associated malignancies*. J Natl Cancer Inst, 2003. **95**(22): p. 1648-50.
274. Rosenberg, P.S., M.H. Greene, and B.P. Alter, *Cancer incidence in persons with Fanconi anemia*. Blood, 2003. **101**(3): p. 822-6.
275. Strati, K. and P.F. Lambert, *Role of Rb-dependent and Rb-independent functions of papillomavirus E7 oncogene in head and neck cancer*. Cancer Res, 2007. **67**(24): p. 11585-93.
276. Jabbar, S., et al., *Human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncoproteins act synergistically to cause head and neck cancer in mice*. Virology. **407**(1): p. 60-7.
277. Kutler, D.I., et al., *Human papillomavirus DNA and p53 polymorphisms in squamous cell carcinomas from Fanconi anemia patients*. J Natl Cancer Inst, 2003. **95**(22): p. 1718-21.
278. van Zeeburg, H.J., et al., *Clinical and molecular characteristics of squamous cell carcinomas from Fanconi anemia patients*. J Natl Cancer Inst, 2008. **100**(22): p. 1649-53.
279. Spardy, N., et al., *The human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein activates the Fanconi anemia (FA) pathway and causes accelerated chromosomal instability in FA cells*. J Virol, 2007. **81**(23): p. 13265-70.
280. Hoskins, E.E., et al., *Fanconi anemia deficiency stimulates HPV-associated hyperplastic growth in organotypic epithelial raft culture*. Oncogene, 2009. **28**(5): p. 674-85.



JUNTS FORMEM UN GRAN EQUIP

AGRAÏMENTS

Al Miquel Àngel, per donar-me la oportunitat d'entendre de primera mà que vol dir ser investigador. Al **Victor**, per acceptar ser el meu tutor i deixar-me un espai a la UBS.

Als meus pares, per educar-me amb un esperit crític i inconformista de manera senzilla i coherent. Per ensenyar-me a respectar els valors. **Al meu germà, l'Arnau**, per transmetre'm les il·lusions d'un jugador d'equip, l'orgull i el respecte. Per estimar la terra on viu i compartir-ho. **A les meves iaies** per transmetre'm felicitat, tendresa i força.

A les meves amiguetes de la guarderia, **Iona i Sara**, fer-se gran al vostre costat és meravellós i tot un orgull. Gràcies per tots els moments viscuts, pasats, presents i futurs.

A les **Vakees**, per transmetre'm l'esperit de lluita, orgull i competició. Per actuar com a un EQUIP, totes amb una filosofia comuna: les alegries compartides es multipliquen i les angoixes es divideixen. Gràcies Ari, Di, Mire, Sara, Saray, Marta, Lidia, Ray, Ramón, Sil, Xemi, Pagés, More, Xavi i Cris, per transmetre'm tanta vitalitat.

Als amics de Vilanova per tantes nits de diversió i per l'esperit necessari d'inconsciència. **A la Sarita**, per la teva sinceritat, humor i complicitat.

A la **Silvi** per tots els detalls, per l'energia incombustible i per la tendresa. A la **Mimi**, per acceptar-me tal com sóc i per la coherència. A tots aquells amb els qui varem caminar plegats durant la màgica època universitària, gràcies per transmetre'm els valors de l'amistat, l'alegria i d'il·lusió.

A tots els que formeu part del meravellós món de la investigació. Gràcies a tot **LRT1 i LRT2 i, en especial, a tots el doctorands** per aportar els vostres coneixements, pels consells i per lluitar plegats per una recerca més justa i digne, d'una manera altruista per un benefici social que tan poc valoren els nostres polítics.

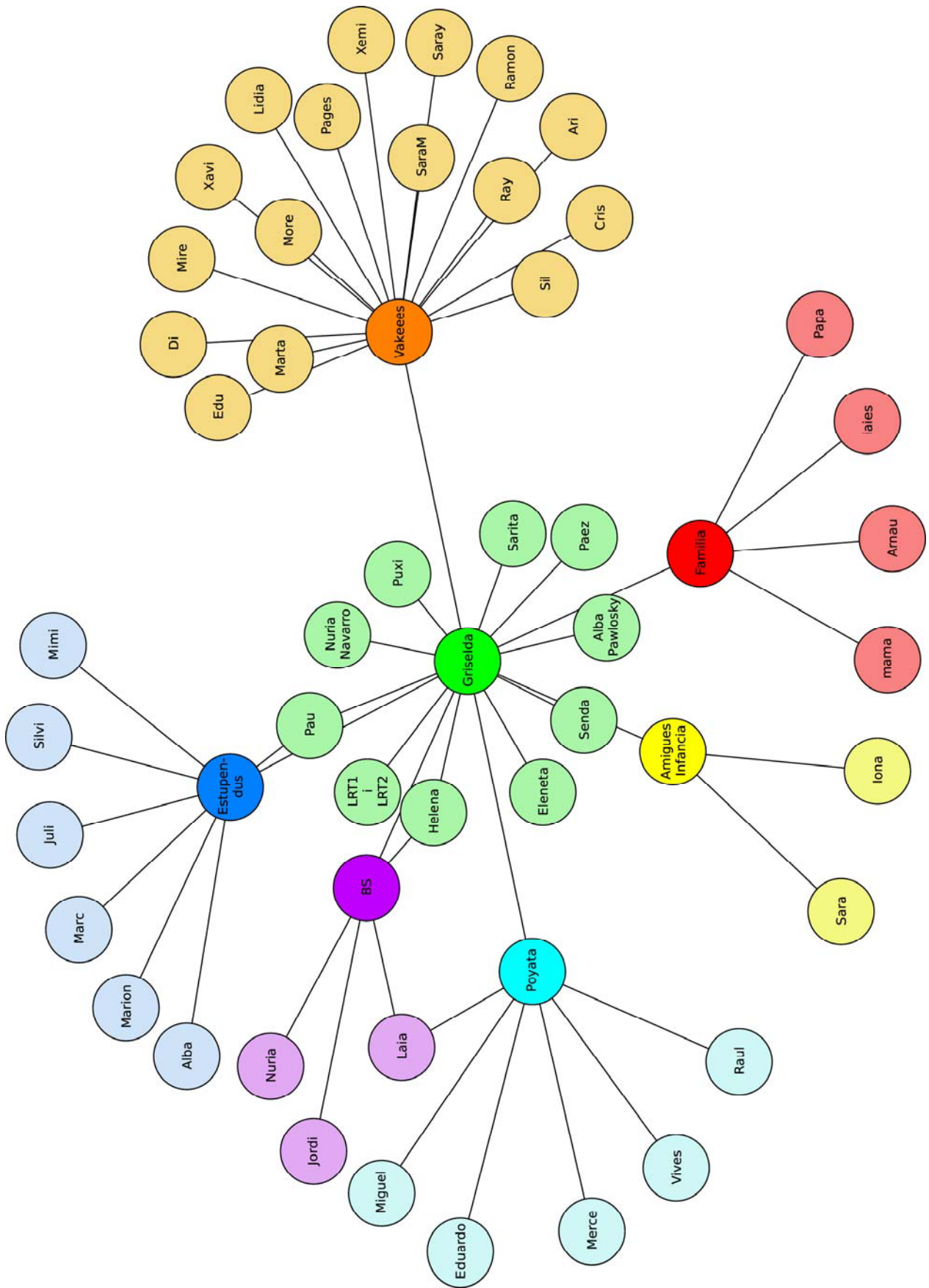
Aquells **representats de becaris** que van lluitar per unes condicions més justes per tots nosaltres. I a **la Marga**, per ajudar a fer-ho possible. A la **Jéssica i l'Olga**, per fer més senzilla la meva feina.

Als components del **grup Systems Biology**, Chris, Laia, Núria, Jordi i Helena, per la vostra ajuda sempre que ho he necessitat i per explicar-me amb paciència tot allò que no entenc, sobretot en el camp de la bioinformàtica, eh Núria. Gràcies **Toni** per les teves aportacions en estadística.

A l'Aguilar, la meva guia espiritual. Gràcies per omplir de bons moments aquests quatre anys, pels savis consells, per discutir i criticar resultats, per deixar-me formar part de la teva història, per l'exigència i absoluta sinceritat. En definitiva, gràcies per fer d'aquests quatre anys un bon record.

Als amics d'erasmus, My Inma, Vane, Zoè, Martiña i Anita, per compartir aquesta aventura plegats lluny de casa nostra i fer que fos increïble! Gràcies per ensenyar-me a conviure d'una manera tan fàcil i divertida.

Al Pau, per la felicitat del dia a dia, per creure amb el nen que tots portem a dins i per permetre'm somiar plegats amb un món més lliure. Per la infinita paciència amb mi, per ajudar-me al llarg d'aquests quatre anys i pel disseny de la portada.



Al Jordi, per ajudar-me en el disseny del meu interactoma mitjançant la ciberxarxa i per fer-me entendre la utilitat de les matemàtiques.