

Aus dem Institut für Humangenetik  
der Universität Würzburg  
Vorstand: Professor Dr. med. Thomas Haaf

**DNA-Reparaturgene als Risikofaktoren für familiären  
Brustkrebs**

Inaugural - Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde der  
Medizinischen Fakultät  
der  
Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Simone Gerlinger  
aus Künzelsau

Würzburg, Juli 2010

**Referent:** Prof. Dr. med. Holger Höhn  
**Korreferent:** Prof. Dr. med. Tiemo Grimm  
**Dekan:** Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 04.August 2010

Die Promovendin ist Ärztin.

„Jede Gelegenheit, sich zu verändern,  
ist eine Gelegenheit, die Welt zu verändern.“

*Paulo Coelho*

---

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1. Epidemiologie und Klinik .....	1
1.2. Tumorgenese .....	2
1.3. Allgemeine Risikofaktoren.....	4
1.4. Familiäres Risiko.....	5
1.4.1. Aufrechterhaltung der genetischen Integrität .....	8
1.5. Reparatur-Strategien.....	9
1.5.1. Rekombinations-Reparatur (RKR).....	10
1.5.1.1. Nicht-homologe-End-zu-End-Verknüpfung (NHEJ).....	11
1.5.1.2. Homologe Rekombination (HR) .....	12
1.5.1.3. Single strand annealing (SSA) .....	13
1.6. Intention dieser Arbeit.....	13
<b>2. Ergebnis.....</b>	<b>14</b>
2.1. DNA-Reparaturgene mit hoher Penetranz.....	14
2.1.1. BRCA1 (Breast cancer susceptibility-Gen 1).....	14
2.1.1.1. Klinik.....	14
2.1.1.2. Genetik .....	15
2.1.1.3. Biologische Funktion.....	17
2.1.2. BRCA2 (Breast cancer susceptibility-Gen 2) .....	20
2.1.2.1. Klinik.....	20
2.1.2.2. Genetik .....	21
2.1.2.3. Biologische Funktion.....	23
2.1.3. TP53 (Tumorsuppressorgen 53) .....	24
2.1.3.1. Klinik.....	24
2.1.3.2. Genetik .....	25
2.1.3.3. Biologische Funktion.....	27

2.2.	DNA-Reparaturgene mit niedriger Penetranz .....	29
2.2.1.	CHEK2 (Checkpoint-Kinase 2).....	29
2.2.1.1.	Klinik.....	29
2.2.1.2.	Genetik .....	30
2.2.1.3.	Biologische Funktion.....	32
2.2.2.	ATM (Ataxia telangiectasia mutated) .....	34
2.2.2.1.	Klinik.....	34
2.2.2.2.	Genetik .....	34
2.2.2.3.	Biologische Funktion.....	37
2.2.3.	NBS1 (Nijmegen-Breakage-Syndrom-Gen 1).....	38
2.2.3.1.	Klinik.....	38
2.2.3.2.	Genetik .....	39
2.2.3.3.	Biologische Funktion.....	41
2.2.4.	Fanconi-Anämie-Gene.....	43
2.2.4.1.	Klinik.....	43
2.2.4.2.	FA-Gene der Gruppe I.....	45
2.2.4.3.	FA-Gene der Gruppe II.....	47
2.2.4.4.	FA-Gene der Gruppe III .....	50
2.2.5.	Polymorphismen.....	56
<b>3.</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>58</b>
3.1.	Modell eines DNA-Reparatur-Netzwerkes zur Brusttumorgenese .....	58
3.2.	Mutationen der DNA-Reparaturgene und der Einfluss von Polymorphismen...	60
3.3.	Weitere DNA-Reparaturgene mit Risikopotential für Brustkrebs .....	61
3.4.	Populationsgenetik .....	63
<b>4.</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>67</b>
<b>5.</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>68</b>

---

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AML	Akute myeloische Leukämie
APEX	Apurinische/apyrimidinische Endonuklease
ARM	Armadillo repeat
AS	Aminosäure
AT	Ataxia teleangiectatica
ATM	Ataxia telangiectasia mutated
ATR	ATM and Rad3 related
BACH1	BRCA1-associated C-terminal-Helikase
BARD1	BRCA1-associated ringdomain-1-Protein
BASC	BRCA1-associated surveillance complex
BAX	BCL-2-associated X
BCCIP $\alpha$	BRCA and CDKN1A interacting-Protein
BER	Basenexzisionsreparatur
BK	Brustkrebs
BLM	Bloom-Syndrom-Mutation
BRAF35	BRCA2-associated-Faktor 35
BRC	Hochkonservierte Bindungsregion für RAD51
BRC-repeats	BRC-Wiederholungssequenzen
BRCA1	Breast cancer susceptibility-Gen 1
BRCA2	Breast cancer susceptibility-Gen 2
BRCT	Breast cancer C-terminal-Domäne
BRIP1	BRCA-interacting-Protein 1
BUBR1	Budding uninhibited by benzimidazoles related 1
bZIP	Basic leucine zipper-Domäne
bzw.	Beziehungsweise
ca.	Circa
CASP8	Caspase 8
CC-Motiv	Coiled-coil-Motiv
CDC25C	Cell division cycle 25C

CDK	Cyclin-dependent-Kinase
CHEK1	Checkpoint-Kinase 1
CHEK2	Checkpoint-Kinase 2
CI	Confidenz-Intervall
DBD	DNA/DSS1-binding-Domäne
DCIS	Duktales Carzinoma in situ
DDB2	Damage-specific DNA binding-Protein 2
d.h.	Das heißt
DNA	Desoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
DNA-PKcs	DNA dependent protein kinase catalytic subunit
DSB	Doppelstrangbrüche
dsDNA	Double strand DNA (Doppelstrang-DNA)
DSS1	Deleted in split hand/split foot-Protein 1
ERCC	Excision repair cross-complementing-Gen 1
FAT/FATC	FRAP, ATM, and TRRAP C-terminal
FA	Fanconi-Anämie
FGFR2	Fibroblast growth factor-Rezeptor 2
FHA	Forkhead-assozierte Domäne
G1-Phase	Gap-Phase 1
GADD45	45 kDa growth arrest/DNA damage-Protein
GOF	Gain-of-function
HEAT	Huntingtin, elongation factor 3, protein phosphatase 2A, TOR1
Hef	Helicase-associated endonuclease for fork-Struktur
Her2	Human epidermal growth factor-Rezeptor 2
HR	Homologe Rekombination
IR	Ionizing radiation (Ionisierende Strahlung)
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
LFL	Li-Fraumeni-Like-Syndrom
LFS	Li-Fraumeni-Syndrom
LIG	Ligase

LOF	Loss-of-function
LOH	Loss-of-heterozygosity
LSP1	Lymphocyte-specific-Protein 1
MAP3K1	Mitogen-activated protein kinase kinase-Kinase 1
M-Phase	Mitose-Phase
MDM2	Mouse double minute 2
MLH1	MutL-Homolog 1
MMR	Mismatch-Reparatur
MRE11	Meiotic recombination 11-Homolog A
MRN	MRE11, RAD50, NBS1
MSH2	MutS-Homolog 2
NBS1	Nijmegen-Breakage-Syndrom-Gen 1
NER	Nukleotidexzisionsreparatur
NES	Nukleus-Export-Sequenz
NHEJ	Nicht-Homologe-End-zu-End-Verknüpfung
NLS	Nuclear localization-Signal
n.nwb.	Nicht nachweisbar
OCCR	Ovarian cancer cluster-Region
OCDDR	Other conserved DNA damage response-Gene
OD	Odds-Ratio
OG	Onkogen
p21	Tumorsuppressorprotein 21
p53	Tumorsuppressorprotein 53
P	Phosphorylierung
PALB2	Partner and localizer of BRCA2
P/CAF	p300/CBP-associated-Faktor
PCNA	Proliferatin cell nuclear-Antigen
PHD	Plant homeodomain
PIKK	PI3K-related protein-Kinase
PLK1	Polo-like-Kinase 1
PMS1	Postmeiotic segregation increased 1
POG	Protoonkogen

PTEN	Phosphatase and tensin-Homolog
RAD50	Radiation-Protein 50
RAD51	Radiation-Protein 51
RKR	Rekombinations-Reparatur
RNA	Ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
ROM	Prokaryotic RNA binding-Protein
ROS	Reactive oxygen species (Reaktive Sauerstoffradikale)
RPA	Einzelstrang bindendes Replikationsprotein A
RR	Relatives Risiko
RRM2B	Ribonukleotid-Reduktase M2 B
SCC	Plattenepithelkarzinom
SCD	SQ/TQ-Cluster-Domäne
SDDA	Sensitivity to DNA damaging-agents
S-Phase	Synthese-Phase
SQ/TQ-Cluster	Serin/Glutamin- und Threonin/Glutamin-reiche Region
SQ-Domäne	Serin/Glutamin-Domäne
SNP	Single nucleotide-Polymorphismus
SSA	Single strand annealing
ssDNA	Single strand DNA (Einzelstrang-DNA)
STK11	Serin-Threonin-Kinase 11
Tab.	Tabelle
TGFB1	Transforming growth-Faktor beta 1
TOPBP1	Topoisomerase II binding-Protein 1
TOX3	Thymocyte-selection associated high mobility group box-Gen
TP53	Tumorsuppressorgen 53
TPR	Tetratricopeptide-repeat
TSG	Tumorsuppressorgen
TWIST1	Twist-Homolog 1
Ub	Ubiquitinierung
UTR	Untranslatierte Region
UV	Ultraviolett

WD40	Protein-Bindungs-Motiv aus Trp-Asp-Sequenzen
WRN	Werner-Syndrom-Helikase
XPF	Xeroderma pigmentosum-Gen F
XRCC	X-ray repair cross complementing

## Aminosäuresymbole

C	Cys	Cystein	N	Asn	Aspartat
D	Asp	Aspartat	P	Pro	Prolin
E	Glu	Glutamat	Q	Gln	Glutamin
F	Phe	Phenylalanin	R	Arg	Arginin
G	Gly	Glycin	S	Ser	Serin
H	His	Histidin	T	Thr	Threonin
I	Ile	Isoleucin	V	Val	Valin
K	Lys	Lysin	W	Trp	Tryptophan
L	Leu	Leucin	Y	Tyr	Tyrosin
M	Met	Methionin	X		Stoppcodon

## Nukleotidsymbole

A	Adenin
C	Cytidin
G	Guanin
T	Thymin
U	Uracil

---

# 1. Einleitung

## 1.1. Epidemiologie und Klinik

Im Jahr 2007 wurden schätzungsweise 1,3 Millionen neue Brustkrebsfälle diagnostiziert. Damit ist das Mammakarzinom die häufigste weibliche Krebserkrankung weltweit. Mit einem Anteil von etwa 28% ist dieser Tumor auch in Deutschland die häufigste bösartige Neoplasie der Frau. Für Patientinnen unter 60 Jahren sind es sogar rund 40%. Aktuell erkranken jährlich ca. 57.000 Frauen und etwa 17.500 Frauen sterben daran. Das mittlere Lebenszeitrisko beträgt 9,2%. Dies bedeutet, dass durchschnittlich jede 11. Frau im Laufe ihres Lebens an Brustkrebs erkrankt. Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei 63 Jahren, etwa 6 Jahre unter dem anderer Malignome. Die Mortalitäts- sowie die Inzidenzraten weisen teilweise enorme ethnische und geographische Unterschiede auf. Im weltweiten Vergleich liegen die altersstandardisierten jährlichen Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner in Deutschland im unteren Drittel. Eine führende Rolle nehmen derzeit Frankreich und die USA ein, während Polen und Japan die geringsten Inzidenzraten haben. Generell nimmt die Mortalität seit Mitte der 90er Jahre leicht ab, während die Inzidenz seit 1980 stetig ansteigt (www.rki.de, 2005; www.cancer.org, 2007; www.gekid.de, 2008).

Brustkrebs, medizinisch Carcinoma mammae, ist ein Sammelbegriff für maligne Tumore der Brust. Das Leitsymptom des Mammakarzinoms ist ein derber tastbarer Knoten. Die mit 85% häufigste Form, das duktales Karzinom, betrifft die Milchgänge. Seltener sind lobuläre Tumore, die ihren Ursprung in den Drüsenläppchen haben. Eine weitere Einteilung der WHO unterscheidet das zur Invasion fähige Karzinom vom (nur per definitionem) nichtinvasiven Carcinoma in situ. Die Stadieneinteilung erfolgt anhand der Größe und Ausbreitung des Tumors. Ist das Karzinom bereits metastasiert, sind die Heilungschancen sehr gering. Die relativen 5-Jahresüberlebensraten betragen derzeit über alle Stadien betrachtet 81% (www.gekid.de, 2008). Zu den klassischen Prognosefaktoren des Mammakarzinoms zählen neben dem Tumortyp, der Tumorgroße, dem Lymphknotenstatus und der Fernmetastasierung auch das „Grading“, bei dem histologisch die Mitoserate, die Zellmorphologie und die Drüsenbildung beurteilt werden. Zu den neueren prognostischen Modulatoren zählen die Proliferationsrate

(Ki67-Index) und der Gehalt an Östrogen- und Progesteronrezeptoren (Arver et al., 2000). Neuere Untersuchungen konnten zeigen, dass auch Tumorsuppressorgene wie TP53, die für die genomische Stabilität einer Zelle notwendig sind, prognostisch relevant sein können (Rahko et al., 2003; Olivier et al., 2006).

### **1.2. Tumorgenese**

Für den Erhalt und die Entwicklung eines Organismus ist es notwendig, dass in der Zelle gespeicherte Informationen korrekt ausgeführt und sinnvoll auf die Tochterzellen transmittiert werden. Dies ist die Grundlage für die Steigerung unserer Fitness, sowohl individuell, als auch innerhalb einer Population. Wird die genomische Integrität gestört, können sich Schäden, genetisch fixiert in Form von Mutationen, in den nächsten Generationen als Tumorwachstum bemerkbar machen (Maki, 2002).

Man geht heute davon aus, dass die Tumorgenese ein mehrstufiger Evolutionsprozess ist, der über einen initialen Wachstumsvorteil hinaus über proliferationsstimulierende Veränderungen zu ungehemmtem und invasivem Wachstum führt. Dabei zeichnet sich eine Tumorzelle durch eine Dysregulation der zellulären Wachstumskontrolle aus. Es werden sowohl eine beschleunigte Zellteilung als auch eine verlängerte Lebenszeit der Zelle beobachtet. Einige bei der Krebsentstehung besonders häufig von Mutationen betroffenen Gene sind Protoonkogene und Tumorsuppressorgene, welche für Struktur- und Regulatorproteine kodieren, die diese Prozesse kontrollieren (Hanahan und Weinberg, 2000; Hahn und Weinberg, 2002; Massague, 2004).

Protoonkogene (POG) sind Gene, die auf die Zellvermehrung aktivierend einwirken. Sie kodieren beispielsweise für Zellzyklusfaktoren und Wachstumsfaktoren. Sind sie mutiert, werden sie Onkogene (OG) genannt. Da sie die Zellteilung beschleunigen können, werden die zugrunde liegenden Mutationen „gain-of-function“-Mutationen (GOF) genannt. Sie wirken in der Zelle dominant, so dass 1 mutiertes Allel für eine unkontrollierte Zellteilung ausreichend ist (siehe Abb.1).

Tumorsuppressorgene (TSG) hingegen sind wachstumshemmende Gene, die die Proliferation einer Zelle zur richtigen Zeit wieder beenden. Mutationen in diesen Genen können zu einer dauerhaften Teilungsfähigkeit der Zelle führen. Diese Gene können direkt an der Regulation der Zellteilung mitwirken oder sie wirken indirekt als DNA-Reparaturgene, indem sie dafür sorgen, dass die Zelle hinsichtlich Stoffwechsel und

Zellteilung möglichst korrekt funktionieren kann. Sie sind somit zur Aufrechterhaltung der genomischen Integrität verantwortlich. Diese krankheitsverursachenden Mutationen werden „loss-of-function“-Mutationen (LOF) genannt. Sie wirken auf zellulärer Ebene rezessiv, das heißt zur Krankheitsentstehung müssen beide Allele inaktiviert sein. Dieser Vorgang wird als „loss-of-heterozygosity“ (LOH) bezeichnet. Häufig liegt in einem Allel einer somatischen Zelle bereits eine vererbte Keimbahnmutation vor und es kommt erst im Laufe der Zeit zur Inaktivierung des zweiten Allels.

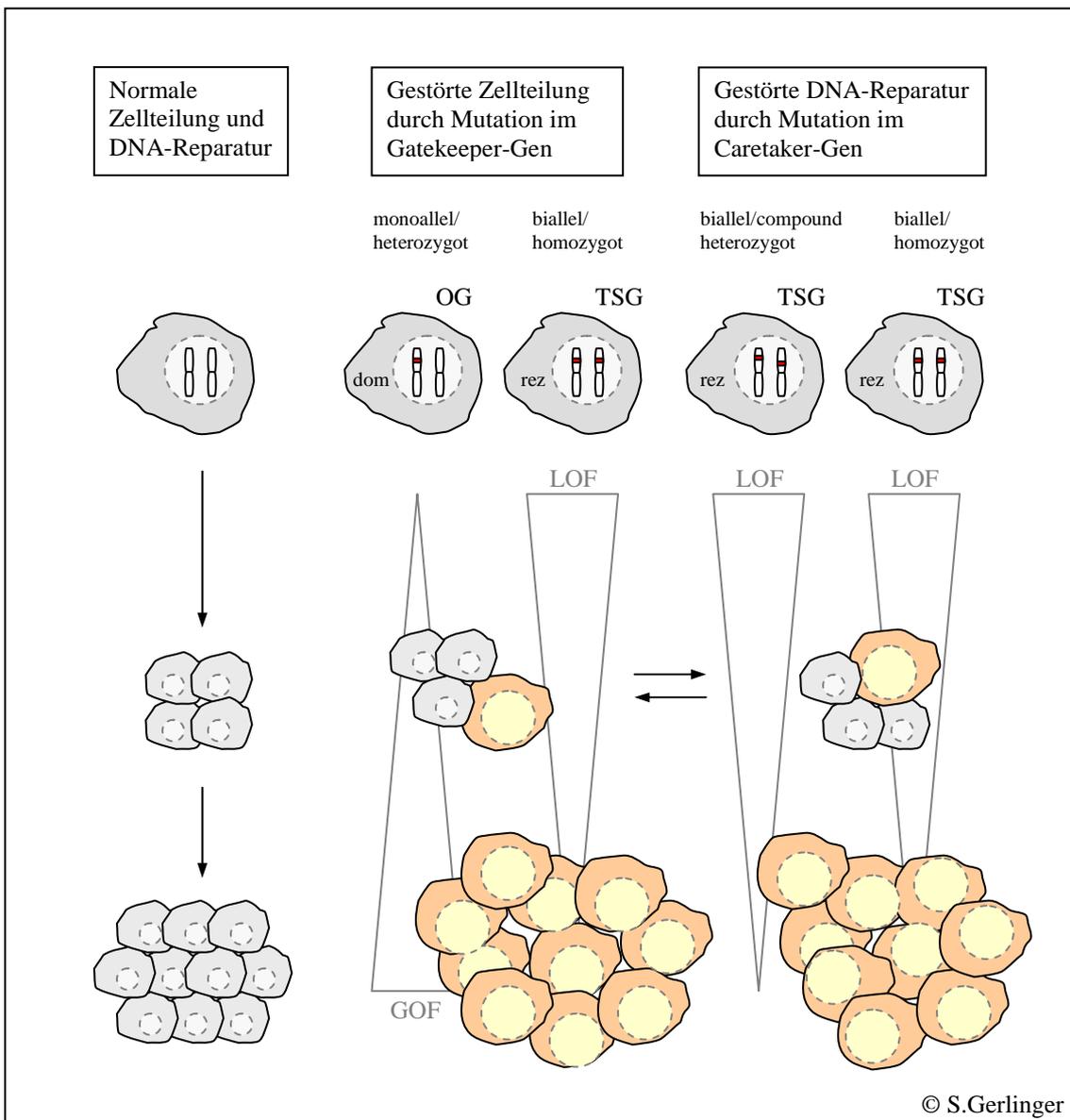


Abb.1: Schaubild eines Mehrstufenprozesses zur Zellentartung durch monoallele oder biallele Mutationen in Gatekeeper-Genen und Caretaker-Genen. Onkogene (OG) wirken auf zellulärer Ebene dominant (dom), Tumorsuppressorgene (TSG) wirken rezessiv (rez). GOF=gain-of-function, LOF=loss-of-function.

Mutationen in Tumorsuppressorgenen und in Protoonkogenen werden sowohl in sporadischen als auch in erblichen Tumorerkrankungen gefunden. In der „Two-Hit-Theorie“ von Knudson fällt zuerst das eine Allel aus, nachfolgend das zweite Allel. Es kommt zur unkontrollierten Teilung der Zelle, wenn beide Allele eines Tumorsuppressorgens inaktiviert sind. Bei sporadischen Krebserkrankungen sind beide Allele durch zufällige Ereignisse mutiert. Bei erblichen Krebsgeschehen besteht für das erste Allel eine genetische Prädisposition, während die Funktion des zweiten Allels nachfolgend verloren geht, oder durch Mutationen zu einem veränderten Protein führt (Knudson, 1971, 1977). In beiden Fällen nimmt die Mutationshäufigkeit mit steigendem Alter zu, die Erstmanifestation jedoch ist bei erblichen Krebsarten deutlich früher zu erwarten.

Das außerordentlich enge Zusammenspiel von Tumorsuppressorgenen und Protoonkogenen wird auch durch eine neuere Theorie beschrieben. In dieser wird nicht zwischen erblichen und sporadischen Tumorerkrankungen unterschieden. Tumorsuppressorgene und Protoonkogene, die an der Zellteilung beteiligt sind, werden als „gatekeeper“ bezeichnet und die Tumorsuppressorgene, die bei der DNA-Reparatur mitwirken, als „caretaker“. Tragen beide Kopien eines Caretaker-Gens LOF-Mutationen (homozygot oder compound heterozygot), kommt es zum Defekt der DNA-Reparatur und zum Zusammenbruch der genomischen Stabilität. Nicht behobene Defekte in Gatekeeper-Genen können dann anschließend die maligne Transformation der Zelle einleiten. Diese Fehlregulation lässt sich auch im umgekehrten Falle beobachten (Kinzler und Vogelstein, 1998) (siehe Abb.1).

### **1.3. Allgemeine Risikofaktoren**

Zahlreiche verschiedene Faktoren erhöhen die Gefahr, an Brustkrebs zu erkranken. Da dieser Tumor hormonabhängig ist, genügt bereits die Tatsache, weiblich zu sein. Das männliche Mammakarzinom, Carcinoma virile, wird etwa 100-mal seltener diagnostiziert als das der Frau (www.rki.de, 2005). Im Trend liegen Lifestyle-Einflüsse wie Kontrazeption, postmenopausale Hormontherapie, Alkohol, hohe Kalorien- und Fettzufuhr, Nulliparität, Späterstgebärende und stillende Mütter. Eine frühe Menarche und späte Menopause wurden ebenso wie hohe Bestrahlungsdosen und benigne

proliferative Brusterkrankungen als Risikofaktoren identifiziert (Ponz de Leon, 1994). Das Risiko steigt in diesen Fällen um das 1,5- bis 3-fache (Arver et al., 2000).

Ein großes Risiko birgt das Alter. Durch verschiedene Umwelteinflüsse können sich im Laufe der Zeit viele genetische Veränderungen in einer Zelle des Brustgewebes akkumulieren. Dementsprechend tritt eine Vielzahl der Brusttumore sporadisch auf und geht mit einem Anstieg der Inzidenz und der Mortalität einher. Diese genetischen Veränderung treten häufig als balancierte und unbalancierte Umlagerungen wie Translokationen, Inversionen, Duplikationen, Amplifikationen und Deletionen in Erscheinung (Albertson, 2003; Albertson et al., 2003).

### 1.4. Familiäres Risiko

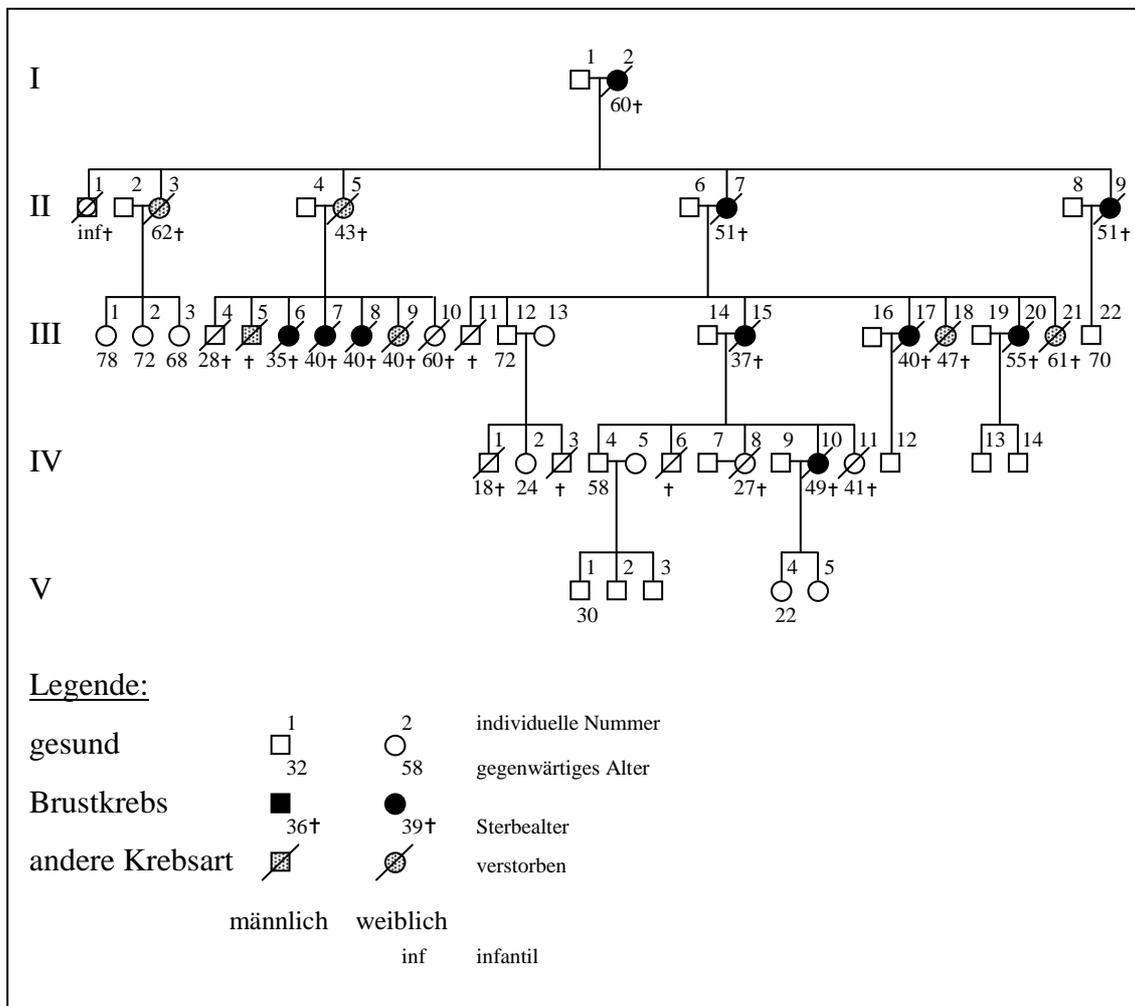


Abb.2: Stammbaum der Familie von Paul Broca's Frau aus dem Jahre 1860 über mehrere Generationen basierend auf der Originalpublikation (modifiziert nach Lynch et al., 2008).

Der größte Risikofaktor ist eine positive Familienanamnese (Lynch et al., 1981; Ottman et al., 1986). Bereits vor über 140 Jahren entstand eine der ersten Publikationen über eine betroffene Familie (siehe Abb.2).

Familienanalysen ergaben phänotypisch und genotypisch eine überproportional häufige Mitveranlagung zu Krebsarten wie Ovarialkarzinomen und seltenen Krebsyndromen wie dem Li-Fraumeni-Syndrom oder der Ataxia teleangiectatica (Narod, 1994; Go et al., 1983). Das am häufigsten auftretende Syndrom ist das hereditäre Brust- und Ovarialkrebsyndrom. Deren genotypische Basis sind monoallele Mutationen in BRCA1 oder BRCA2, die das Brust- und Ovarialkrebsrisiko um mindestens den Faktor 10 erhöhen (Rahman et al., 2007).

Die Prävalenz familiärer Mutationen korreliert mit einem frühen Diagnosealter, einem bilateralen Auftreten und der Anzahl und dem Grad erkrankter Verwandter (Claus et al., 1990; Slatterly und Kerber, 1993; Anglian Breast Cancer Study Group, 2000). Für Frauen mit einer betroffenen Verwandten ersten Grades in der Familie erhöht sich das Risiko beispielsweise bereits um mehr als das 2-fache (Roseman et al., 1990; Mettlin et al., 1990). Um die Frage zu klären, welche Familie genetisch ein erhöhtes Brustkrebsrisiko besitzt, wurde auf der Grundlage epidemiologischer und klinischer Beweise eine Richtlinie hierzu vorgeschlagen (Marsh und Zori, 2002) (siehe Tab.1).

Tab.1: Richtlinie zur Etablierung eines familiären Brustkrebsyndroms in Anlehnung an die Amsterdam-Bethesda-Kriterien (modifiziert nach Marsh und Zori, 2002).

1	Auftreten des Tumors in einem ungewöhnlich jungen Alter
2	Bilaterale Primärtumore
3	Auftreten multipler Malignome
4	Geschlechtsunabhängige Manifestation des Tumors
5	Familiäre Häufung derselben Krebsart
6	Kombination mit anderen Syndromen

Für das individuelle Risiko von besonderer Bedeutung ist die genetische Prädisposition, d.h. die durch die verschiedensten Umwelteinflüsse modulierbare erbliche Veranlagung (Nathanson et al., 2001). Genetische Veränderungen, die bereits in der Keimbahn

manifest sind, werden an die nächste Generation weitervererbt. Die daraus hervorgegangenen Tumorerkrankungen der Brust sind erbliche Mammakarzinome, die abhängig vom Vererbungsmuster als hereditär oder familiär bezeichnet werden (Bradbury und Olopade, 2007). Hereditäre Mammakarzinome betreffen etwa 4-10% der Brustkrebsfälle. Für ca. 2-4% sind Mutationen in den Tumorsuppressorgenen BRCA1 und BRCA2 verantwortlich (Weber und Garber, 1993; Arver et al., 2000; Wooster und Weber, 2003; Zhang und Powell, 2005; Lynch et al., 2008). Sie sind im Allgemeinen monogen und werden autosomal dominant mit hoher Penetranz vererbt (Newman et al., 1988). Einer familiären Krebshäufung liegt eine genetische Prädisposition ohne einen klaren monogenen Vererbungsmodus zugrunde. Deren Ursachen sind sehr komplex und epidemiologische Daten unterstützen ein Multifaktorenmodell, dem ein polygenes Vererbungsmuster zugrunde liegt (Peto und Mack, 2000). BRCA1 und BRCA2 sind die wichtigsten Risikofaktoren für etwa 10-25% aller Brustkrebsfälle, die familiär gehäuft zu beobachten sind (Szpirer und Szpirer, 2007) (siehe Abb.3).

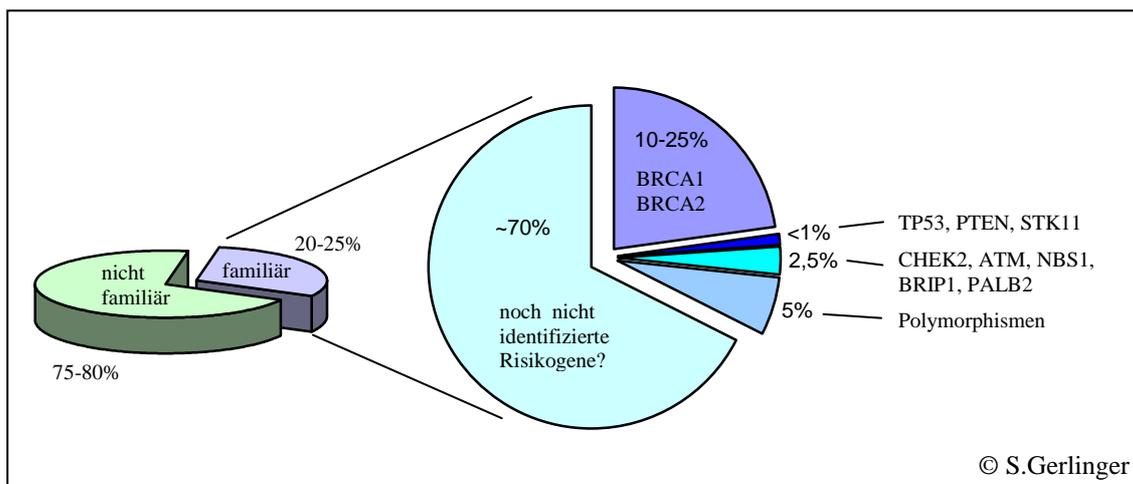


Abb.3: Verteilung der für familiären Brustkrebs prädisponierenden Risikogene. Etwa 20-25% aller Mammakarzinome haben einen familiären Hintergrund. Zusammen mit den Genen PTEN, STK11 und den Polymorphismen, die nicht als DNA-Reparaturgene klassifiziert werden, nehmen die bislang detektierten DNA-Reparaturgene BRCA1, BRCA2, TP53, CHEK2, ATM, NBS1 und die Fanconi-Anämie-Gene BRIP1 und PALB2 unter den familiären Brustkrebsfällen einen Anteil von etwa 30% ein (Daten aus Szpirer und Szpirer, 2007; Lynch et al., 2008).

Zusammengenommen sind alle bisher untersuchten familiären und hereditären Mutationen in BRCA1 und BRCA2 jedoch für weniger als 30% der Brustkrebsfälle mit

erblichem Hintergrund verantwortlich. Für die übrigen 70% konnten keine Mutationen in diesen beiden Genen nachgewiesen werden (Walsh et al., 2006; Lynch et al., 2008). Aus diesem Grund spielen zunehmend weitere als die oben beschriebenen Gene für die Entwicklungsgeschichte des Brustkrebses eine wichtige Rolle. Diese können in der normalen Population selten oder weit verbreitet sein. Die Risikogene fördern somit mit unterschiedlich hohem Potential die Entstehung von Mammakarzinomen (Ponder, 2001; Antoniou und Easton, 2006).

### 1.4.1. Aufrechterhaltung der genetischen Integrität

Obwohl das individuelle Risiko durch eine Reihe von Umweltfaktoren modifiziert wird, beschreiben die bislang veröffentlichten Publikationen immer mehr Gene als Risikofaktoren für die Entwicklung von Brustkrebs.

Tab.2: DNA-Reparaturgene und ihre assoziierten Krebs syndrome als Risikofaktoren für Brustkrebs.

In einer monoallelen Situation prädisponieren Mutationen in den betroffenen Genen für einen dominanten Brustkrebs-Phänotyp, in einer biallelen Konstellation für das jeweilige rezessive Syndrom (Kalb et al., 2004; Szpirer und Szpirer, 2007). TSG=Tumorsuppressorgen, POG=Protoonkogen, n.nwb. (nicht nachweisbar).

Krebssyndrom	Gene	Penetranz für Brustkrebs	Vererbungsmodus		Funktion
			monoallel	biallel	
<b>Hereditäre Brustkrebssyndrome</b>					
Hereditäres Brustkrebs- und Ovariakarzinom-Syndrom	BRCA1	hoch	dominant	n.nwb.	TSG
	BRCA2	hoch	dominant	rezessiv	TSG
Li-Fraumeni-Syndrom	TP53	hoch	dominant	?	TSG, POG?
	CHEK2	niedrig	dominant	n.nwb.	TSG
Ataxia teleangiectatica	ATM	niedrig	dominant	rezessiv	TSG
<b>Brustkrebs-assoziierte hereditäre Krebs syndrome</b>					
Nijmegen-Breakage-Syndrom	NBS1	niedrig	dominant	rezessiv	TSG?
Fanconi-Anämie	BRCA2	hoch	dominant	rezessiv	TSG
	BRIP1	niedrig	dominant	rezessiv	TSG
	PALP2	niedrig	dominant	rezessiv	TSG

Als starke Prädiktoren für die Entstehung von familiärem Brustkrebs werden seit einiger Zeit die DNA-Reparaturgene untersucht, die für die genomische Integrität einer Zelle unentbehrlich sind.

Die enorme Komplexität der genetischen Integrität wird durch eine außerordentlich große Anzahl der daran beteiligten Gene widerspiegelt. Bislang wurden mehr als 150 DNA-Reparaturgene klassifiziert, die in vielen, teilweise noch unbekannt, Reparaturwegen eine Rolle spielen ([www.cgal.icnet.uk/DNA\\_Repair\\_Genes.html](http://www.cgal.icnet.uk/DNA_Repair_Genes.html), 2008). Da sie dem Schutz der Zelle dienen, sind sie meist hoch konserviert. Treten dennoch Mutationen in den dafür relevanten Genen auf, kann dies zu verschiedenen, oft sehr spezifischen, Tumorerkrankungen führen. Die für die Entwicklung von Brustkrebs wichtigen DNA-Reparaturgene und ihre assoziierten Krebs syndrome sind in Tabelle 2 aufgeführt.

### **1.5. Reparatur-Strategien**

Im Laufe der Evolution hat die Zelle verschiedene Strategien entwickelt, um Schäden in der DNA zu detektieren, möglichst zu reparieren und zu verhindern, dass sie an die nächste Generation weitergegeben werden. Mit Hilfe von DNA-Reparaturgenen werden die Chromosomen permanent überwacht und mögliche Defekte korrigiert. Die Koordination dieses komplizierten Zusammenspiels beschrieben Zhou und Elledge 2000 in einem einfachen Signal-Transduktions-Weg. Die von einem Sensor erfassten Schäden werden über einen Koordinator zu verschiedenen Effektoren übermittelt und aufeinander abgestimmt (siehe Abb.4). Diese Art der genetischen Kontrolle wurde erstmals in Säugerzellen entdeckt, deren Proteinkinase ATM Defekte aufwies (Painter und Young, 1980).

Die DNA ist ein Makromolekül und somit äußerst empfindlich gegenüber endogenen und exogenen Einflüssen. UV-Strahlung, ionisierende Strahlung, Chemikalien und oxidativer oder thermischer Stress verändern die DNA permanent. Auch eine fehlerhafte Replikation oder eine ungenügende DNA-Reparatur können zu dauerhaften Veränderungen im Genom führen. Verschiedene Mausmodelle konnten zeigen, dass defekte Reparaturwege zu genomischer Instabilität führen (Ferguson und Alt, 2001). Fällt auch nur eines der beteiligten Proteine aus, kann das bereits zu folgenschweren Chromosomen-Translokationen führen (Ferguson et al., 2000). Um die Zahl der

Mutationsereignisse für den Organismus möglichst gering zu halten, induziert die Zelle entweder ihren Suizid (Apoptose) oder versucht, den Defekt zu beheben, bevor sie in die Mitose geht. Teilweise werden die Läsionen über sehr spezifische Reparaturwege behoben. Der für die Entstehung von Brustkrebs überwiegend relevante Mechanismus ist eine defekte DNA-Reparatur über Rekombination.

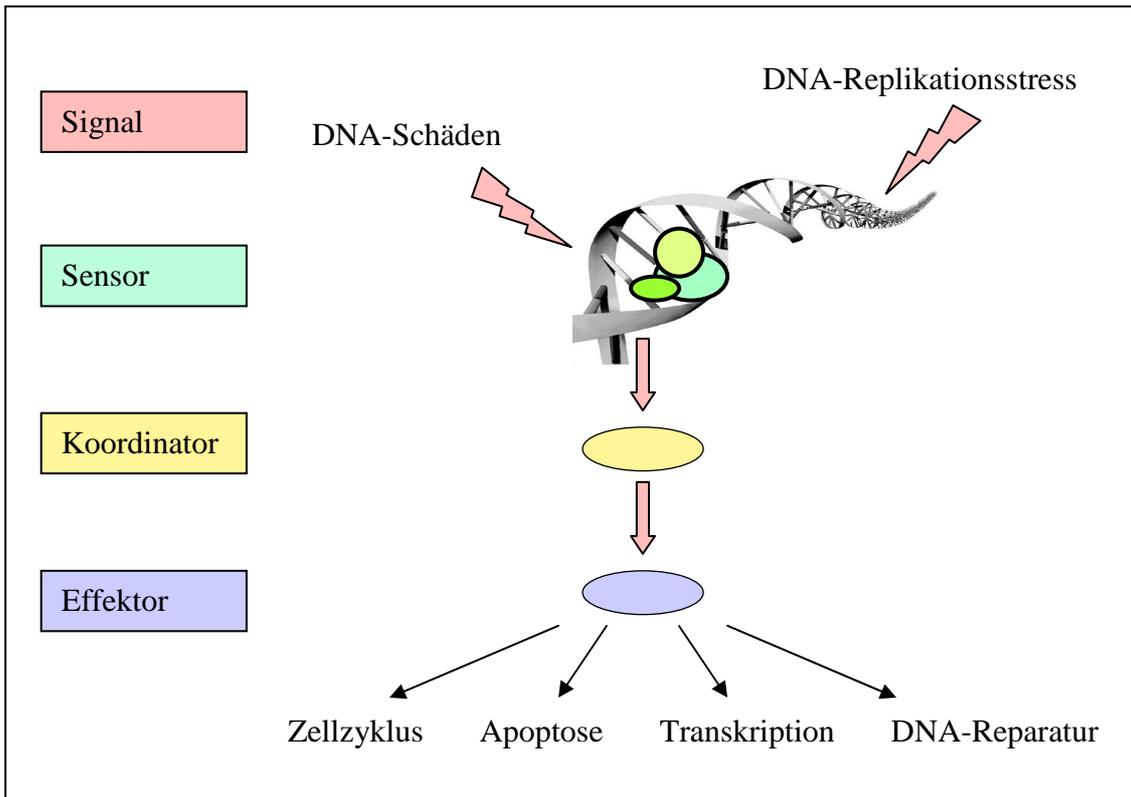


Abb.4: Signal-Transduktions-Weg zur DNA-Reparatur (modifiziert nach Zhou und Elledge, 2000).

### 1.5.1. Rekombinations-Reparatur (RKR)

Reaktive Sauerstoffradikale (ROS), Ionisierende Strahlung (IR) oder Fehler in der Replikation führen zum Replikationsblock, zu Interstrangvernetzungen und zu Brüchen in den Nukleinsäuresträngen (Stark et al., 2004). Brechen beide DNA-Stränge, ist das für die Zelle fatal, da in der Folge Chromosomenbruchstücke verloren gehen können und dies nicht selten zu ihrem Tod führt. In einer proliferierenden Zelle sind festgefahrene Replikationsgabeln der häufigste Grund für die Entstehung von Doppelstrangbrüchen (DSB) (Zhang und Powell, 2005). Die Reparatur von DSB und von Replikationsblockaden erfolgt über Mechanismen der Rekombination. Interstrang-

Vernetzungen („DNA-crosslinks“) werden ebenfalls auf diese Weise gelöst (Haber, 1999; Enomoto, 2001; Michel et al., 2001; Nakabeppu et al., 2006).

In eukaryotischen Zellen wurden bislang mindestens 3 übergeordnete Strategien zur Instandsetzung von DSB identifiziert: Nicht-homologe-End-zu-End-Verknüpfung („non-homologous-end-joining“, NHEJ), Homologe Rekombination (HR) und Einzelstrangverankerung („single strand annealing“, SSA).

### **1.5.1.1. Nicht-homologe-End-zu-End-Verknüpfung (NHEJ)**

NHEJ ist der bevorzugte Mechanismus zur Reparatur von DSB für Zellen, die sich in der G1-Phase oder in der frühen S-Phase befinden. Diese haben ihre DNA noch nicht repliziert und zur Reparatur eines DSB steht ihnen nur das homologe Chromosom zur Verfügung. Da keine Schwesterchromatide als Matrize dienen kann, werden die freien Enden der DNA auf direkte Weise miteinander verknüpft. Um größere Deletionsmutationen zu verhindern, muss die Zelle die beschädigte DNA vor weiterem Abbau schützen. Ebenso muss sie dafür sorgen, dass die richtigen DNA-Enden zusammengefügt werden (Takata et al., 1998; Lieber et al., 2003; Rothkamm et al., 2003).

Zur Reparatur werden kleine, die Bruchstellen flankierende, Mikrohomologien benötigt. Diese werden vermutlich durch einen Proteinkomplex geschaffen, dem MRN-Komplex, der sich aus den 3 Untereinheiten MRE11, RAD50 und NBS1 zusammensetzt (Ma et al., 2003; Zhang et al., 2004). Die freien DNA-Enden werden von einem Ku-Heterodimer, dem Ku70/Ku80-Komplex, sequenzunspezifisch erkannt, gebunden und für den nachfolgenden Reparaturkomplex positioniert und stabilisiert. Daran bindet DNA-PKcs, die Untereinheit einer DNA-abhängigen Proteinkinase, die die Fähigkeit zur Autophosphorylierung besitzt. Die Nuklease Artemis bildet mit DNA-PKcs einen Komplex, der durch seine Endonukleaseaktivität die DNA-Enden präpariert. Die so prozessierten DNA-Enden werden anschließend von dem Ligasekomplex XRCC4/LigaseIV zusammengefügt (Hefferin und Tomkinson, 2005; Cahill et al., 2006).

Diese Art der Reparatur ist äußerst fehleranfällig und kann den Verlust oder den Gewinn ganzer Nukleotidsequenzen zur Folge haben (Liang et al., 1998). Häufig resultieren daraus kleine Änderungen in der DNA-Sequenz, aber auch ganze

chromosomale Umlagerungen aufgrund falscher Verknüpfungen von unflankierten DNA-Enden, die primär nicht zusammengehören, sind möglich. Zunehmend werden Subtypen des NHEJ bekannt, die weniger fehlerbehaftet sind.

### **1.5.1.2. Homologe Rekombination (HR)**

Doppelstrangbrüche, die während und nach der DNA-Replikation in der S-Phase auftreten, können durch homologe Rekombination behoben werden, da der Zelle eine identische DNA-Kopie zur Verfügung steht. Die äußerst hohe Qualität der Reparatur wird dabei durch die große Sequenzhomologie der Schwesterchromatide gewährleistet (Pierce et al., 2001).

Der detaillierte Ablauf wird im Einzelnen noch erforscht. Erkannt werden die Schäden möglicherweise vom MRN-Komplex. Durch die Exonukleaseaktivität von MRE11 werden die DNA-Enden des zerstörten DNA-Doppelstrangs (dsDNA) so zurechtgeschnitten, dass an beiden Enden ein kurzes Stück eines 3'-überhängenden DNA-Einzelstrangs (ssDNA) entsteht. EXO1 ist eine Exonuklease, die diese Resektion ebenfalls katalysieren könnte (Moreau et al., 2001). Zum Schutz vor Nukleolyse werden die DNA-Enden von RPA's (Replikationsprotein A) eingehüllt. RPA ist ein Heterotrimer, das zellzyklusabhängig phosphoryliert wird und so die Bindung an die DNA moduliert und die Aktivität von RAD51 kontrolliert (Umezu et al., 1998; Gasior et al., 2001). Die Rekombinase RAD51 formiert unter Einbeziehung verschiedener Proteine wie BRCA2 und die RAD-Paraloge RAD51B-D sowie XRCC2 und XRCC3 den Aufbau eines RAD51-Nukleoproteinfilamentes, das in der Lage ist, homologe Sequenzen in der Schwesterchromatide zu suchen und zu identifizieren (Bhattacharyya et al., 2000; Kuschel, 2002; Cahill et al., 2006). Bei Erfolg kommt es zur Stranginvasion und Paarung der jeweiligen homologen DNA-Sequenzen mit Hilfe von Komplexen aus RAD52 und RAD54. Nach erfolgtem Strangaustausch des geschädigten DNA-Moleküls mit dem homologen intakten DNA-Molekül werden die noch fehlenden Nukleotide durch eine DNA-Polymerase ergänzt und durch eine Ligase verbunden. Die entstandene Heteroduplex-DNA enthält so genannte Holliday-Strukturen, die über Resolvasen aufgelöst werden können (Cahill et al., 2006). Durch Proteine wie RAD54 oder BRCA1 werden diese Prozesse unterstützt (van Gent et al., 2001; West, 2003). Obwohl diese Art

der Reparatur wenig mutationsanfällig ist, können doch durch eine extensive Genkonversion oder „crossover“-Ereignisse LOH induziert werden.

### **1.5.1.3. Single strand annealing (SSA)**

Das SSA wird wie die HR auch in der S/G2-Phase beobachtet (Elliott et al., 2005) und es werden ebenfalls homologe Sequenzen zur Reparatur von Doppelstrangbrüchen genutzt. Im Gegensatz zur HR ist die SSA unabhängig von RAD51. Nach dem Zurechtschneiden der Bruchenden, wahrscheinlich ebenfalls durch den MRN-Komplex, werden die ssDNA-Überhänge von RPA's und RAD52 besetzt. Nach dem Detektieren homologer Sequenzen werden die Überhänge verankert, durch die ERCC1/XPF-Endonuklease zurechtgetrimmt und die Lücken durch eine DNA-Polymerase aufgefüllt. Ein großer Teil des Mechanismus und dessen beteiligte Proteine ist immer noch unklar (Valerie und Povirk, 2003; Stark et al., 2004).

## **1.6. Intention dieser Arbeit**

Gene, die in die Reparatur beschädigter DNA involviert sind, werden in den letzten Jahren zunehmend mit der Entstehung von familiärem Brust- und Eierstockkrebs in Verbindung gebracht.

Ziel dieser Arbeit ist, anhand von neuester Literatur zu untersuchen, welche dieser DNA-Reparaturgene Einfluss auf die Entwicklung von familiärem Brustkrebs nehmen und welche Rolle sie dabei spielen.

In folgendem Ergebnisteil werden die Hochrisikogene BRCA1, BRCA2 und TP53, sowie die DNA-Reparaturgene mit einer niedrigeren Penetranz wie CHEK2, ATM, NBS1 und die Fanconi-Anämie-Gene der Gruppe I-III, molekulargenetisch vorgestellt und ihre biologische Funktion durchleuchtet. Die Zusammenhänge der zentralen DNA-Reparaturgene auf zellulärer Ebene, die modulierenden Einflüsse verschiedener Polymorphismen, weitere mögliche Risikogene und populationsgenetische Effekte werden in der anschließenden Diskussion weiter vertieft.

---

## **2. Ergebnis**

### **2.1. DNA-Reparaturgene mit hoher Penetranz**

Die Penetranz beschreibt die Wahrscheinlichkeit, mit der ein Allel phänotypisch in Erscheinung tritt. In der Literatur tritt häufig der Begriff des Lebenszeitriskos, bezogen auf ein definiertes Lebensalter, an dessen Stelle (Teng et al., 2008). Keimzellmutationen in Genen mit einer hohen Penetranz haben eine autosomal dominante Prädisposition als Grundlage. Die Mutationsfrequenz in diesen Genen ist gering. Träger/innen dieser genetischen Veränderungen entwickeln, in Abhängigkeit von der Population, in ungefähr 60-85% der Fälle familiären Brustkrebs (Szpirer und Szpirer, 2007).

#### **2.1.1. BRCA1 (Breast cancer susceptibility-Gen 1)**

##### **2.1.1.1. Klinik**

Mutationen in BRCA1 sind typisch für Familienmitglieder mit hereditärem Brust- und Ovarialkarzinom-Syndrom oder einer prämenopausalen Brustkrebserkrankung („early-onset“-Brustkrebs). Sie erhöhen das relative Risiko (RR) für Brusttumore um das 10- bis 22-fache. Das Lebenszeitrisiko, mit 70 Jahren an Brustkrebs erkrankt zu sein, beträgt je nach Population zwischen 46% und 87%, das Risiko für Ovarialkrebs liegt bei 16% bis 44% (Breast Cancer Linkage Consortium, 1993, 1994; Struewing et al., 1997; Satagopan et al., 2001; Stratton und Rahman, 2008). Weibliche BRCA1-Mutationsträgerinnen haben im Vergleich zur Normalbevölkerung ein erhöhtes statistisches Risiko für weitere Karzinome (Relatives Risiko  $RR=2,30$ ) wie beispielsweise für Cervix- ( $RR=3,72$ ), Blasen- ( $RR=2,65$ ) oder Pankreaskrebs ( $RR=2,26$ ). Männliche Träger über 65 Jahren weisen kein erhöhtes Risiko für Prostatakarzinome auf ( $RR=0,95$ ), jedoch sind Männer unter 65 Jahren mit einem relativen Risiko von  $RR=1,82$  gefährdet (Breast Cancer Linkage Consortium, 2002).

Die Entstehung von Brustkrebs durch BRCA1 hat einen überwiegend erblichen Hintergrund. Untersuchungen an Brustkrebspatientinnen ohne eine nachweisbare familiäre Belastung ergaben einen außerordentlich geringen Anteil somatischer Mutationen im BRCA1-Gen (Khoo et al., 1999; Honrado et al., 2005). Der Entwicklung von sporadischem Brustkrebs liegen vielmehr Ereignisse zugrunde, die zur

Inaktivierung von BRCA1 oder zur Fehlplatzierung des Proteins innerhalb der Zelle führen (Chen et al., 1995; Chen et al., 1996). Auch sind epigenetische Ursachen wie die Herunterregulierung des Promotors durch Hypermethylierung zu diskutieren (Catteau et al., 1999; Chan et al., 2002; Hilton et al., 2002; Turner et al., 2004).

Die familiären BRCA1-Tumore unterscheiden sich morphologisch und molekular von sporadischem Brustkrebs und von Tumoren ohne nachweisbare Mutationen in BRCA1 oder BRCA2 (BRCA1/2-negativ). Sie sind wenig differenziert und zeigen einen aggressiven Phänotyp mit dem schlechtesten „Grading“, Grad 3 mit hohem Mitoseindex. Sie sind überwiegend Östrogen-Rezeptor- und Her2-negativ, überexprimieren p53, Cyclin A, B1 und E und unterexprimieren p27 (Narod und Foulkes, 2004; Honrado et al., 2005). Niedrige Konzentrationen an BRCA1-mRNA begleiten die Transformation vom Tumor „in situ“ zum invasiven Karzinom (Thompson et al., 1995).

### **2.1.1.2. Genetik**

In der Literatur wurde der Begriff der „Susceptibility-Gene“ eingeführt, welcher das individuelle Risiko zur Entwicklung einer Tumorerkrankung umschreibt. BRCA1 war das erste Brustkrebs-Gen dieser Art. Es wurde 1990 auf dem Chromosom 17q21 lokalisiert (Hall et al., 1990) und 1994 sequenziert (Miki et al., 1994). BRCA1 ist über 80 kb groß und besteht aus 24 Exons, davon 22 kodierend, die über 100 kb genomischer DNA verteilt sind. Das 7,8 kb mRNA-Produkt kodiert für ein 1863 AS großes Protein (Miki et al., 1994) (siehe Abb.5).

In den Exons 2-5 am NH<sub>2</sub>-Terminus ist eine Ringfingerdomäne mit dem Charakter einer E3-Ubiquitin-Ligase gelegen. Es erlaubt dem Protein mit BARD1, einem strukturell ähnlichen Protein, ein Heterodimer zu formieren, welches in die Reparatur beschädigter DNA unmittelbar verwickelt ist (Wu et al., 1996; Hashizume et al., 2001). Solche Zinkfingerregionen, die der Protein-Protein-Bindung dienen, sind in zahlreichen regulatorischen Proteinen ein übliches Motiv (Lovering et al., 1993).

Am C-terminalen Ende sind 2 BRCT-Domänen zu finden, die charakteristisch für Proteine sind, die in der DNA-Reparatur eine Rolle spielen (Callebaut und Mornon, 1997) wie beispielsweise TP53 (Chai et al., 1999) und BRIP1 (Cantor et al., 2001). Dort befindet sich ebenfalls ein Bereich für eine Interaktion mit BRCA2 (Chen et al., 1998; Welch et al., 2000).

Ungefähr 60% der kodierenden Sequenz befinden sich in Exon 11 (Miki et al., 1994). Neben einer DNA-bindenden Domäne von AS 452 bis AS 1092 (Paull et al., 2001) befinden sich dort noch eine Bindungsdomäne für den MRN-Komplex (AS 341-748) (Zhong et al., 1999), eine weitere TP53-Bindungsstelle (AS 224-500) (Rajan et al., 1996; Bertwistle et al., 1997; Zhang et al., 1998a) und eine RAD51-Bindungsstelle (AS 758-1064). In dieser Region liegen auch verschiedene Phosphorylierungsstellen für die Proteinkinasen ATM, ATR und CHEK2. Diese sind entweder singularär an AS-Position 988 gelegen oder sie bilden einen Cluster aus AS 1387, 1423, 1457 und 1524 (Zhang und Powell, 2005) (siehe Abb.5).

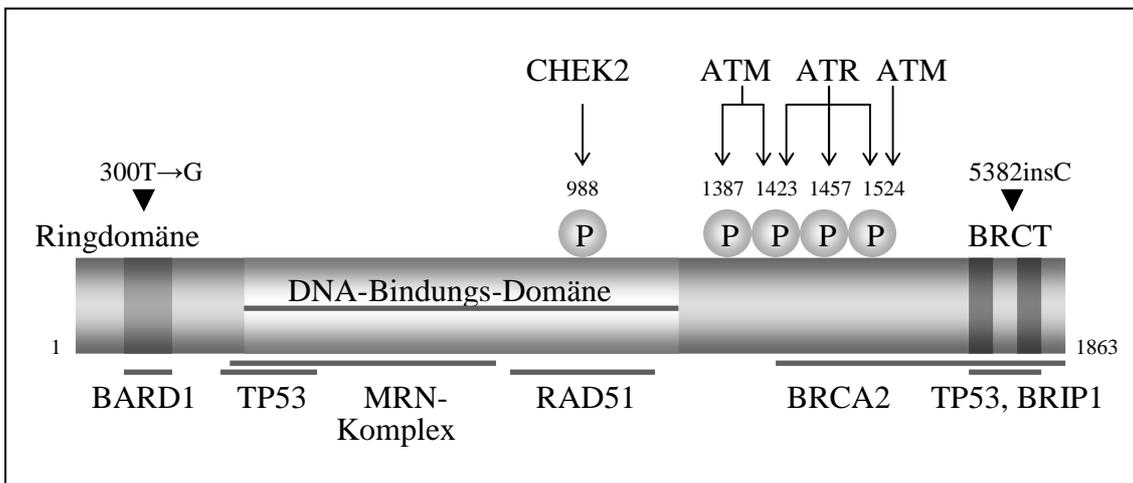


Abb.5: Für die DNA-Reparatur wichtige funktionelle Domänen in BRCA1. Die Mutationen 300T→G und 5382insC sind in deutschen Brustkrebsfamilien am häufigsten vertreten. BARD1 (BRCA1-associated ringdomain-1-Protein), BRCT (breast cancer C-terminal-Domäne) (Daten aus Chen et al., 1998; Zhang et al., 1998a; Chai et al., 1999; Cantor et al., 2001; Hashizume et al., 2001; Zhang und Powell, 2005).

Keimbahnmutationen in BRCA1 beinhalten häufig genetische Veränderungen wie Punktmutationen, Insertionen oder Deletionen. In BRCA1-veränderten Familien findet man überwiegend deletäre Mutationen (Friedman et al., 1994; Serova et al., 1996). Zu 85% führen sie zu Leserastermutationen („frameshift“-Mutationen) oder zu Unsinnmutationen („nonsense“-Mutationen), deren Ergebnis ein trunkiertes Protein ist (Struewing et al., 1995). In der Zwischenzeit sind mehr als 1000 unterschiedliche Mutationen für BRCA1 bekannt, jede für sich ausgesprochen selten. Die Deletionen und Duplikationen variieren in der Größe zwischen 1 kb und mehr als 100 kb Länge und finden sich in allen Regionen des jeweiligen Gens (Walsh et al., 2006).

Genetische Veränderungen in BRCA1 treten in verschiedenen Populationen mit unterschiedlicher Häufigkeit auf. Beispielsweise wird die Insertionsmutation 3171ins5 in schwedischen Hochrisikofamilien besonders häufig gefunden (Einbeigi et al., 2001). Die innerhalb der ethnischen Gruppe der Ashkenazi-Juden anzutreffende Deletionsmutation 185delAG ist bereits über 46 Generationen hinweg nachweisbar (Bar-Sade et al., 1998). Werden in Schweden in 7% der Brustkrebsfälle BRCA1-Mutationen nachgewiesen, sind es in Finnland nur 0,4% (Zelada-Hedman et al., 1997; Syrjäkoski et al., 2000). Die geschätzte Prävalenz an BRCA1-Mutationsträger zum Zeitpunkt ihrer Geburt beträgt, ebenfalls populationsabhängig, etwa 0,08% und steigert sich bis zum 55. Lebensjahr um den Faktor 9 auf 0,7% (Anglian Breast Cancer Study Group, 2000).

In den Brustkrebsfamilien der deutschen Bevölkerung sind die beiden trunkierenden Mutationen 5382insC im Exon 20 mit 4,7% und die in der Ringdomäne gelegene missense-Mutation 300T→G mit etwa 1,7% die am häufigsten vertretenen Mutationen. Innerhalb BRCA1-mutierten Familien nehmen sie zusammen einen Anteil von etwa 30% ein. Die Transversion 300T→G führt zu einem Austausch von Cystin durch Glycin an Position 61 (C61G) und die „frameshift“-Mutation 5382insC führt zum vorzeitigen Kettenabbruch (1829X) (German Consortium for Hereditary Breast and Ovarian Cancer, 2002). Die Mutationsfrequenz von 5382insC beträgt 1,0%, demgegenüber wird BRCA1-5382insC in der Ashkenazi-Juden-Population nur zu 0,4% gefunden (Backe et al., 1999).

### **2.1.1.3. Biologische Funktion**

BRCA1 nimmt in der Zelle eine Schlüsselposition zur Aufrechterhaltung der genomischen Integrität ein (Paull et al., 2001). Bislang sind mehr als 20 Proteine bekannt, die mit BRCA1 auf direkte Weise interagieren können (Breast Cancer Linkage Consortium, 2002).

Bereits kurze Zeit nach der Entdeckung von BRCA1 wurde seine Funktion als typisches Tumorsuppressorgen beschrieben (Breast Cancer Linkage Consortium, 1995; Holt et al., 1996), das als „caretaker“ in der DNA-Reparatur fungiert (Scully et al., 1997; Zhong et al., 2002). Seitdem wird versucht genauer zu durchleuchten, wie und auf welcher Ebene der Tumorgenese BRCA1 die Entstehung von Brustkrebs verhindern kann.

Immer noch sind die genauen Mechanismen nicht bekannt oder werden kontrovers diskutiert.

BRCA1 ist möglicherweise bereits am ersten Schritt zur Bearbeitung eines DNA-Schadens, in der Rolle eines Sensors, beteiligt. Es hat sich gezeigt, dass es *in vitro* mit seiner DNA-Bindungsdomäne in der Lage ist, unselektiv mit verzweigten DNA-Strukturen Protein-DNA-Komplexe zu bilden (Paull et al., 2001). BRCA1 ist auch fester integraler Bestandteil des BASC-Komplexes (BRCA1-associated genome surveillance complex), deren beteiligte Proteine allesamt wichtige Aufgaben im Erkennen abnormaler oder zerstörter DNA-Strukturen oder eine Funktion in der DNA-Replikationsreparatur übernehmen (Wang et al., 2000).

Eine außerordentlich komplexe Funktion übernimmt BRCA1 mit der Aufgabe eines Koordinators. Oft fungiert das Protein dabei als Signalübersetzer und -vermittler an die verschiedenen Effektoren. In Abhängigkeit von der Art des DNA-Schadens modulieren Sensoren wie die Proteinkinasen ATM (Cortez et al., 1999; Gatei et al., 2000), ATR (Tibbets et al., 2000) und CHEK2 (Lee et al., 2000) durch Phosphorylierungsreaktionen die Funktion von BRCA1. Das Ergebnis ist die Koordination des Zellzyklus und die Regelung der Genauigkeit, mit der die DNA repariert wird.

Wenn DNA-Schäden zum Beginn der Mitose nicht repariert wurden, wird die Zelle arretiert und geht zugrunde. Hierfür muss sichergestellt sein, dass die DNA-Reparatur mit dem Zellzyklus koordiniert ist (Lisby et al., 2004; Kim et al., 2006). Der Zellzyklus kann über die Kontrollpunkte G1/S, Intra-S-Phase und G2/M beeinflusst werden. Ein Zyklusarrest in G1/S wird über eine Stimulation der p21-Genexpression erreicht. BRCA1 übernimmt hierfür die Rolle eines Transkriptionsfaktors. Es kann in Kooperation mit dem Tumorsuppressorprotein p53 die Apoptose einleiten (Zhang et al., 1998a) oder ohne dessen Zusammenarbeit den Übergang in die S-Phase verhindern (Somasundaram et al., 1997). BRCA1 stimuliert ebenfalls die Transkription von p27, was den Arrest in der S-Phase induziert (Williamson et al., 2002; Xu et al., 2002). Die Regulation des G2/M-Kontrollpunkts findet auf unterschiedlichen Ebenen statt. Eine Wee1-Kinase, wie auch die CDC25C-Phosphatase, inhibieren eine Cdk2-Kinase-Aktivität, die in phosphoryliertem Zustand den G2/M-Kontrollpunkt arretiert hält. CDC25C kann die Cdk2 dephosphorylieren und aktiviert so den Cdk2/CyklinB-

Komplex, der die Mitose schließlich initiiert. DNA-Schäden führen entweder durch CHEK1- bzw. CHEK2-vermittelte Phosphorylierung direkt zur Hemmung von CDC25C, oder sie führen zur Bindung von CDC25C an das 14-3-3-Protein, das den Übertritt von CDC25C in den Zellkern verhindert. Somit wird die Cdk2 nicht dephosphoryliert und der Zellzyklus bleibt arretiert (siehe Abb.11). BRCA1 ist dabei essentiell für die Aktivierung der CHEK1 und induziert die Expression des 14-3-3-Proteins und der Wee1-Kinase (Yarden et al., 2002).

Recht selten wurde BRCA1 im Zusammenhang mit anderen Reparaturmechanismen wie der Nukleotidexzisionsreparatur beschrieben. Im Subtyp der globalen Genomreparatur fungiert BRCA1, unabhängig von p53, als Transkriptionsfaktor zur Steigerung der Expression der Gene XPC, DDB2 und GADD45 (Harkin et al., 1999; Hartman und Ford, 2002).

Die wohl wichtigste Aufgabe von BRCA1 besteht in der Reparatur von Doppelstrangbrüchen durch Rekombinationsreparatur (RKR). Erste Hinweise darauf ergab die beobachtete Kolo-kalisation von BRCA1 mit RAD51 während der Mitose (Scully et al., 1997). In vitro untersuchte BRCA1-defiziente Stammzellen von Mausembryonen verloren die Fähigkeit, Doppelstrangbrüche korrekt zu reparieren (Moynahan et al., 1999, 2001).

In der Homologen Rekombination interagiert BRCA1 mit RAD51 und BRCA2 (Jasin, 2002). Es ist indirekt erforderlich für die Formation des RAD51-Filaments (Bhattacharyya et al., 2000), indem es dazu vorübergehend BRCA2 rekrutiert (Powell et al., 2002; Valerie und Povirk, 2003).

Der MRN-Komplex könnte eine Rolle spielen, um festgefahrene Replikationsgabeln zu lösen (Pichierri und Franchitto, 2004). BRCA1 wurde zusammen mit MRE11 an DNA-Bruchstellen lokalisiert. Es ist in der Lage, die Nuklease zu inhibieren und somit indirekt Einfluss darauf zu nehmen, welchen Weg die Zelle nach einer Beschädigung einschlagen wird (Zhong et al., 1999; Wang et al., 2000; Paull et al., 2001; Zhang et al., 2004). Interessanterweise wurde BRCA1 ebenso mit RAD50, einem zweiten Protein des MRN-Komplexes, assoziiert aufgefunden. Es scheint, als rekrutiere BRCA1 den MRN-Komplex unabhängig von RAD51 an die gebrochene DNA-Stelle (Maser et al., 1997). Dies deckt sich mit der Beobachtung, dass bei Fehlern in der RAD51-

vermittelten HR die Reparatur von Doppelstrangbrüchen über den RAD51-unabhängigen und äußerst fehleranfälligen Weg des SSA geht ( Stark et al., 2004).

Das SSA wird nicht sehr häufig in G1-arretierten Zellen gefunden (Al-Minawi et al., 2008). Die dafür benötigten komplementären Einzelstränge machen diesen Weg sehr mutationsanfällig, da das Säugergenom ungefähr zur Hälfte aus sich wiederholenden Sequenzen besteht (International Human Genome Sequencing Consortium, 2001; Elliott et al., 2005). BRCA1 scheint auch in Zusammenarbeit mit BARD1 in einem frühen gemeinsamen Schritt der HR und der SSA die Resektion der Einzelstränge zu unterstützen (Stark et al., 2004).

Für eine Beteiligung von BRCA1 bei der NHEJ ergeben sich widersprüchliche Aussagen. Manche Autoren halten es für sehr unwahrscheinlich, dass BRCA1, wie auch BRCA2, darin eine Funktion übernimmt (Wang et al., 2001) oder es wird bezweifelt, dass dieser Reparaturweg in erblichem sowie in sporadischem Brustkrebs defekt ist (Mérel et al., 2002). Möglicherweise ist die Aufgabe des Proteins von verschiedenen Subtypen des NHEJ abhängig. Dann präzisiert BRCA1 den Ablauf des NHEJ durch die Wahl des Subtyps, indem der gewöhnlich fehleranfällige mikrohomologieabhängige NHEJ zu Gunsten weniger anfälliger NHEJ unterdrückt wird (Wang et al., 2006; Zhuang et al., 2006). Die Idee mehrerer NHEJ wurde untermauert durch die Entdeckung verschiedener biochemischer Muster in verschiedenen menschlichen Zellen in Abhängigkeit von der Komplexität der Doppelstrangbrüche (Smith et al., 2001).

### **2.1.2. BRCA2 (Breast cancer susceptibility-Gen 2)**

#### **2.1.2.1. Klinik**

Monoallele Mutationen in BRCA2 führen wie bei BRCA1 durch LOH zu einem hohen Risiko für die Entstehung von Brustkrebs und/oder Ovarialkarzinomen, jedoch mit einem überrepräsentierten Anteil an männlichen Erkrankten und an Malignomen der Prostata (RR=7,33 für Männer jünger als 65 Jahre, RR=4,65 für Männer älter als 64 Jahre). Das relative Risiko für Mammakarzinome schwankt um etwa das 3- oder 10- bis 20-fache. Ein meist geringeres Risiko besteht für andere assoziierte Krebsarten wie die der Gallenblase und der Gallengänge (RR=4,97), des Pankreas (RR=3,51), des Magens (RR=2,59) und des malignen Melanoms (RR=2,58). Das Lebenszeitrisiko, mit 70 Lebensjahren erkrankt zu sein, ist stark abhängig von der Population und beträgt

zwischen 26% und 84% für Frauen und 6,3% für Männer. Das Risiko für Ovarialkrebs liegt bei 20-27% (Easton et al., 1997; Breast Cancer Linkage Consortium, 1994, 1998, 1999; Satagopan et al., 2001; Stratton und Rahman, 2008).

In erblichen BRCA1/2-assoziierten Tumoren werden fast immer LOH in BRCA1 und BRCA2 gefunden (Honrado et al., 2005). In sporadischen Brustkrebsfällen ist BRCA2 wie BRCA1 sehr selten mutiert (Teng et al., 1996).

Ähnlich wie in BRCA1-assoziierten Mammakarzinomen unterscheiden sich diese Tumore morphologisch und molekular von sporadischem Brustkrebs und von BRCA1/2-negativen Tumoren. Sie haben für gewöhnlich im „Grading“ Grad 2/3, neigen jedoch dazu, Östrogen- und Progesteronrezeptoren zu exprimieren. Cyclin D1 und p27 wird ebenfalls vermehrt gebildet. BRCA1/2-negative Tumore ähneln phänotypisch denen von BRCA2, haben jedoch noch ein geringeres „Grading“ (Honrado et al., 2005).

### **2.1.2.2. Genetik**

BRCA2 ist das zweite Gen, das hauptsächlich für familiären Brustkrebs prädisponiert. Es wurde kurz nach BRCA1 auf Chromosom 13q12-13 lokalisiert (Wooster et al., 1994). Es ist 10,254 kb lang und beinhaltet 27 Exons, wobei Exon 10 und 11 zusammen etwa 60% der kodierenden Region bilden (Welch et al., 2000). BRCA2 kodiert für ein 3418 AS großes nukleäres Protein (siehe Abb.6). Es wird in vielen Geweben exprimiert und in der S-Phase des Zellzyklus akkumuliert (Zhang et al., 1998b).

Exon 3 des N-Terminus enthält 2 Regionen, die in die Transkriptions-Aktivierung involviert sind (AS 290-453) (Fuks et al., 1998). BRCA2 reguliert die Transkription, indem es mit dem Koaktivator-Protein P/CAF interagiert. Durch dessen Acetyltransferaseaktivität können dementsprechend Histon-Proteine modifiziert werden (Fuks et al., 1998). N-terminal befinden sich auch 5 Phosphorylierungsstellen für die Polo-like-Kinase 1 (PLK1). Diese sind in der Mitose hyperphosphoryliert und beim Übertritt in die Interphase hypophosphoryliert. In Zellen, die mit DNA-schädigenden Agentien behandelt wurden, sind diese Phosphorylierungsreaktionen nicht zu beobachten (Lin et al., 2003).

Im Exon 11 sind 8 hochkonservierte BRC-„repeats“ enthalten, davon interagieren BRC1-4, BRC7 und BRC8 direkt mit RAD51 (Bignell et al., 1997; Wong et al., 1997). BRC3 und BRC4 sind in die Formation des RAD51-Nukleoproteinfilamentes nach Einzelstrangbrüchen involviert (Davies et al., 2001). In dieser Region befindet sich auch ein 3,3 kb langer Bereich, der „ovarian cancer cluster“-Region (OCCR) genannt wurde. Mutationen in OCCR sind assoziiert mit einem signifikant höheren Risiko für Ovarialkrebs (RR=1,88) und einem geringeren Risiko für Brustkrebs (RR=0,63) (Breast Cancer Linkage Consortium, 2001).

C-terminal im Exon 26 befindet sich eine weitere RAD51-Bindungsstelle (AS 3273-3309) und eine NLS (Morimatsu et al., 1998). Ebenfalls über C-terminale Stellen in den Exons 14-24 interagiert BRCA2 mit BCCIP $\alpha$ , einem Protein, das Brustkrebszellen am Wachstum hindern kann und BRCA2 als Kofaktor dient (Liu et al., 2001).

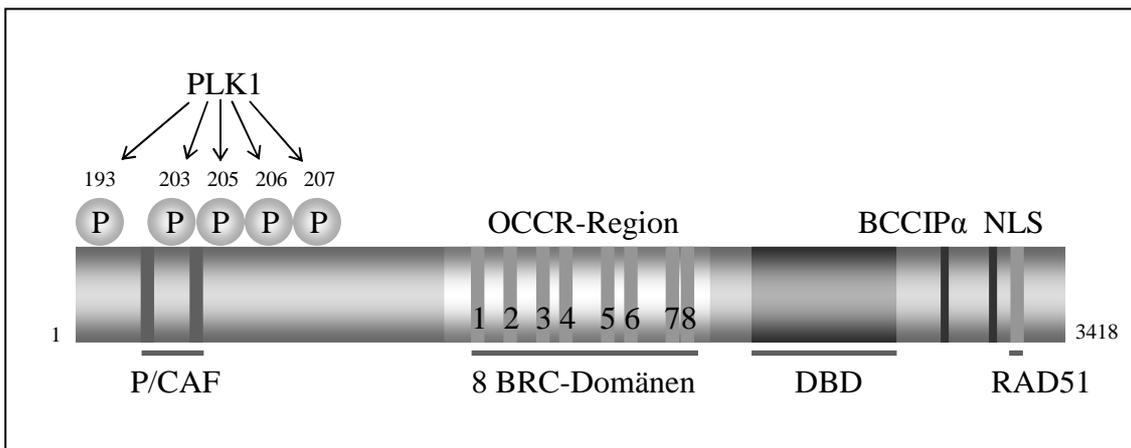


Abb.6: Für die DNA-Reparatur wichtige funktionelle Domänen in BRCA2. BCCIP $\alpha$  (BRCA and CDKN1A interacting-Protein), DBD (DNA/DSS1-binding-Domäne), NLS (nuclear localization-Signal), OCCR (ovarian cancer cluster-Region), P/CAF (p300/CBP-associated-Faktor), PLK1 (polo-like-Kinase 1) (Literaturquellen siehe Text).

Die häufigsten genomischen Veränderungen sind zu 12% Umlagerungen. Deletionen und Duplikationen werden ebenso detektiert (Walsh et al., 2006). 85% all dieser genetischen Alterationen bedingen Leserastermutationen oder Unsinnmutationen. Daraus resultiert ein unreifes oder trunkiertes inaktives Protein (Struewing et al., 1995). Die verschiedenen Mutationsarten hängen wieder von der ethnischen und geographischen Zugehörigkeit ab. Die für BRCA2 typische Deletion in Island ist 999del5 (Thorlaciuss et al., 1998) und die in der Population der Ashkenazi-Juden ist 6174delT (Struewing et al.,

1997). Die Heterozygotenfrequenz ist wie bei BRCA1 rar und liegt bei durchschnittlich 0,18% (Anglian Breast Cancer Study Group, 2000).

### **2.1.2.3. Biologische Funktion**

BRCA2 ist ein Tumorsuppressorgen (Collins et al., 1995). Durch seine Bindung von RAD51 über die NLS geleitet BRCA2 RAD51 in den Zellkern an die Stellen gebrochener DNA (Davies et al., 2001). Polypeptide der BRC-Domäne regulieren den Auf- und Abbau des RAD51-Nukleoproteinfilaments. Einzelne BRC-Polypeptide vermögen eventuell durch den Mechanismus des molekularen Mimikry in das RAD51-Filament einzudringen und dieses zu rupturieren. Der Aufbau wird wahrscheinlich durch ein kompliziertes Zusammenspiel einzelner BRC-Polypeptide und der DBD (DNA/DSS1-binding-Domäne) reguliert und dadurch der unkontrollierte Selbstzusammenbau mehrerer RAD51-Monomere verhindert (Yuan et al., 1999; Davies et al., 2001; Galkin et al., 2005).

Für die Funktion von BRCA2 ist ein Zusammenspiel mit DSS1 (deleted in split hand/split foot-Protein 1) erforderlich. DSS1 ist ein hochkonserviertes Protein aus 70 AS und vermag BRCA2 an der C-terminalen DBD zu binden. Es sorgt dafür, dass der BRCA2/RAD51-Komplex an die zu reparierende DNA-Stelle gelangt (Gudmundsdottir et al., 2004). Es ist für ein funktionierendes BRCA2 essentiell, da dessen Stabilität von DSS1 abhängig ist (Li et al., 2006).

Weiterhin ist BRCA2 in der Lage, mit TP53 Komplexe zu bilden und seine Transkriptionsaktivität zu inhibieren (Marmorstein et al., 1998). In der Literatur finden sich Hinweise darauf, dass Mutationen in TP53 ein notwendiger Schritt in der Tumorgenese BRCA-mutierter Brusttumoren ist (Gretarsdottir et al., 1998).

BRCA2 ist auch in die Regulation des Zellzyklus mitinvolviert. Ein Bereich von BRCA2, der die BRC6, 7 und 8 enthält, vermag das Protein BRAF35 zu binden, das ebenfalls an Strukturen beschädigter DNA zu finden ist (Marmorstein et al., 2001). Der C-Terminus von BRCA2 interagiert über eine Phosphorylierungsreaktion mit BUBR1, einem Protein des Mitosespindelapparats, was eine Mitwirkung von BRCA2 am Mitose-Kontrollpunkt impliziert (Futamura et al., 2000). BRCA2-defiziente Zellen, die Mutationen in BUBR1 aufweisen, sind nicht mehr in der Lage, den Zellzyklus zu stoppen und transformieren neoplastisch (Lee et al., 1999). Auch wurden

Zentrosomenamplifikationen und abnormale Mikronukleinformationen als Auslöser von Chromosomeninstabilitäten beobachtet (Tutt et al., 1999).

### **2.1.3. TP53 (Tumorsuppressorgen 53)**

#### **2.1.3.1. Klinik**

Keimbahnmutationen in dem Gen TP53 führen zum Li-Fraumeni-Syndrom (LFS), einer seltenen, autosomal dominant vererbten Prädisposition, bereits in jungen Jahren an Weichteil- und Osteosarkomen, an Leukämien und an verschiedenen anderen Karzinomen wie denen der Brust, des Gehirns und der Nebennierenrinde zu erkranken (Malkin, 1998; Nichols et al., 2001). Das LFS wurde erstmals 1969 beschrieben, als bei Geschwistern und Cousins in 4 Familien im Kindesalter gehäuft Weichteiltumore auftraten (Li und Fraumeni, 1969). In LFS-Familien wurden in 50-70% Keimbahnmutationen in TP53 nachgewiesen (Birch et al., 1994; Varley, 2003). Das Lebenszeitrisiko für diese Patienten, an Krebs zu erkranken, beträgt im Alter von 30 Jahren bereits 50%, mit 70 Jahren sind es 90% (Li, 1990). Interessanterweise unterscheiden sich die Malignome in LFS-Patienten von denen sporadischer Tumore nicht (Garber und Offit, 2005).

Die Diagnose wird klinisch gestellt und ein klassisches LFS liegt vor, wenn alle 3 dieser Kriterien erfüllt sind: 1. Der betroffene Patient entwickelte vor seinem 45. Lebensjahr ein Sarkom. 2. Bei einem Verwandten ersten Grades wurde vor dessen 45. Lebensjahr ein beliebiger Tumor diagnostiziert. 3. Zusätzlich ist ein Verwandter ersten oder zweiten Grades ebenfalls vor seinem 45. Lebensjahr an einem beliebigen Karzinom oder im Laufe seines Lebens an einem Sarkom erkrankt (Li et al., 1988).

Immer mehr Familien wurden identifiziert, die zwar einige der geforderten Kriterien eines LFS erfüllten, jedoch nicht alle. Seit einiger Zeit wird deshalb eine weitere Form unterschieden, das Li-Fraumeni-like-Syndrom (LFL). Das LFL ist charakterisiert durch zusätzliche assoziierte Tumore. Dadurch stellt es ein sehr gemischtes Bild verschiedenster Krebserkrankungen dar. Eine Keimbahnmutation in TP53 kann in 30% der betroffenen Familien identifiziert werden (Varley, 2003).

Das Genprodukt von TP53 ist in einer Tumorzelle auffallend häufig in seiner Funktionalität eingeschränkt. In 40-50% aller humanen Krebsarten werden Mutationen in diesem Gen gefunden ([www-p53.iarc.fr/](http://www-p53.iarc.fr/)). In humanen Mammakarzinomen sind in

20-40% ebenfalls Mutationen in TP53 nachweisbar (Faille et al., 1994; Greenblatt et al., 1996). In familiären Brustkrebstumoren werden TP53-Keimbahnmutationen jedoch nur ausgesprochen selten bis gar nicht gefunden. Die Mutationshäufigkeiten liegen dabei zwischen 0 und 2,5% (Børresen et al., 1992; Cornelis et al., 1997; Balz et al., 2002). Sie sind abhängig von der geographischen Lage der Populationen (Børresen et al., 1992; Lalloo et al., 2003) und von der Art des familiären Mammakarzinoms (Marchetti et al., 1993). Das relative Risiko, ein Malignom der Brust zu entwickeln, beträgt das 10- bis 20-fache gegenüber gesunden Genträgern (Stratton und Rahman, 2008).

### 2.1.3.2. Genetik

Das 393 AS große Protein p53, benannt nach seinem Gewicht von 53 kDa, wurde 1979 von David Lane und Arnold Levine unabhängig voneinander entdeckt (Lane und Crawford, 1979; Linzer und Levine, 1979). Das Tumorsuppressorgen TP53 wurde auf dem Chromosom 17q12 lokalisiert (Donehower und Bradley, 1993). Es besteht aus 11 Exons, wobei Exon 1 nicht translatiert wird.

Das p53 wird als „Wächter des Genoms“ bezeichnet, da es nach einer DNA-Schädigung die Rolle des Koordinators übernimmt. In seiner tetrameren Form kontrolliert es die Expression von Effektorgenen, die am Zellzyklus, an der Apoptose und an der DNA-Reparatur direkt beteiligt sind (Lane, 1992).

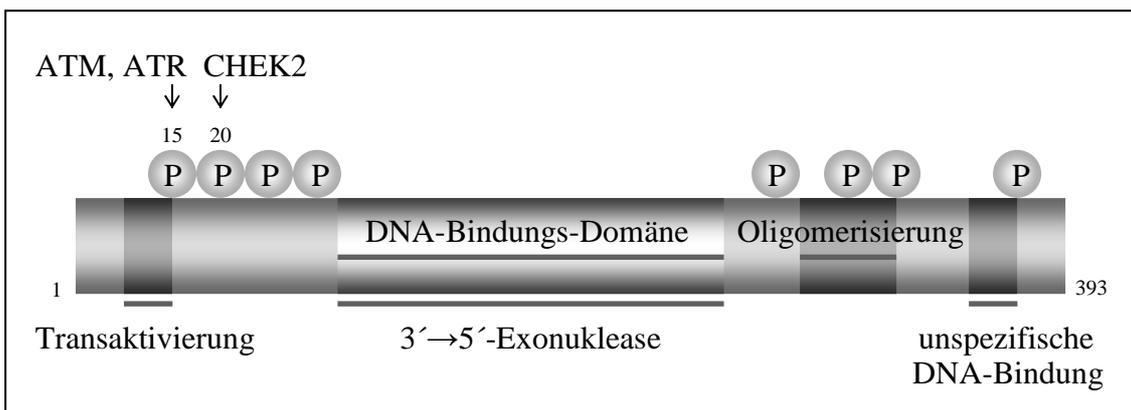


Abb.7: Für die DNA-Reparatur wichtige funktionelle Domänen in p53 (Literaturquellen siehe Text).

Es lassen sich 4 funktionell verschiedene Domänen unterscheiden. Die N-terminalen 42 AS sind hoch konserviert und wirken aktivierend auf die Transkription der entsprechenden Zielgene. Die AS 102-292 umfassen eine ebenfalls hoch konservierte

DNA-bindende Region und eine 3'→5'-Exonukleaseaktivität (Mummenbrauer et al., 1996). Am C-Terminus befindet sich eine sogenannte Oligomerisierungsdomäne, welche eine Tetramerisierung des Proteins ermöglicht. Der äußerste C-terminale Bereich beinhaltet eine weitere DNA-bindende Domäne, die die Funktion des zentralen Bereichs kontrollieren kann (Lane, 1992; Harms et al., 2004; Weinberg et al., 2004; Laptenko und Prives, 2006) (siehe Abb.7).

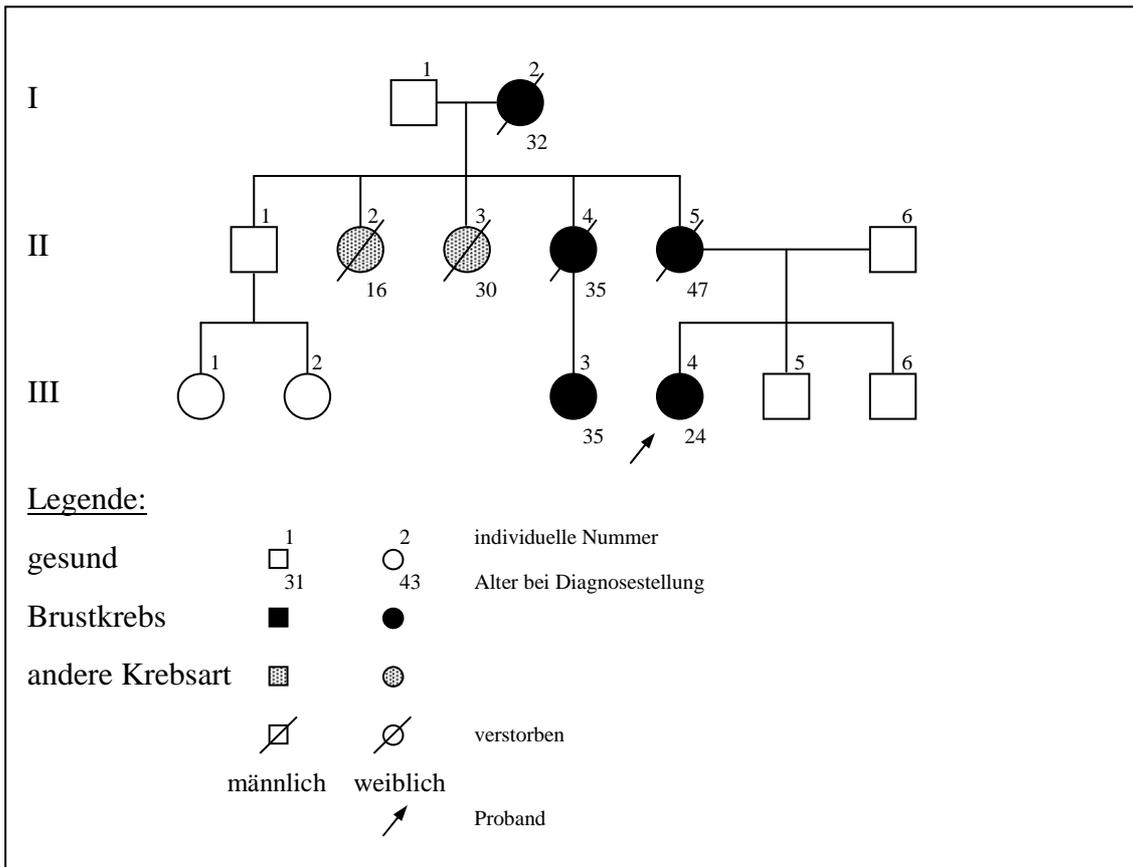


Abb.8: Stammbaum einer von „early-onset“-Brustkrebs betroffenen Familie mit LFS (modifiziert nach Børresen et al., 1992).

Das Spektrum hereditärer Mutationen gleicht dem somatischer Mutationen. Sie sind über das gesamte Gen verteilt mit einer Anhäufung in der zentralen DNA-Bindungsdomäne. Im Gegensatz zu anderen Tumorsuppressorgenen sind dies in TP53 zu etwa 80% „missense“-Punktmutationen (Liu und Chen, 2006). Zu 90% sind die vorherrschenden Mutationsereignisse Substitutionen singulärer Pyrimidinbasen (GC→AT-Transitionen), die zum Austausch einer einzelnen AS führen (Soussi et al., 2006). Die besonders oft auftretenden Punktmutationen sind an den AS-Positionen 175,

245, 248 und 273 lokalisiert. Diese „hotspot“-Mutationen sind häufiger in Keimbahnmutationen nachweisbar als in somatischen Mutationen (Varley et al., 1997; Olivier et al., 2002). Børresen et al. identifizierten 1992 eine Keimbahnmutation an der „hotspot“-Position 245 in Exon 7 (GGC→AGC / Gly→Ser) in einer von „early-onset“-Brustkrebs betroffenen Familie mit LFS (siehe Abb.8).

### 2.1.3.3. Biologische Funktion

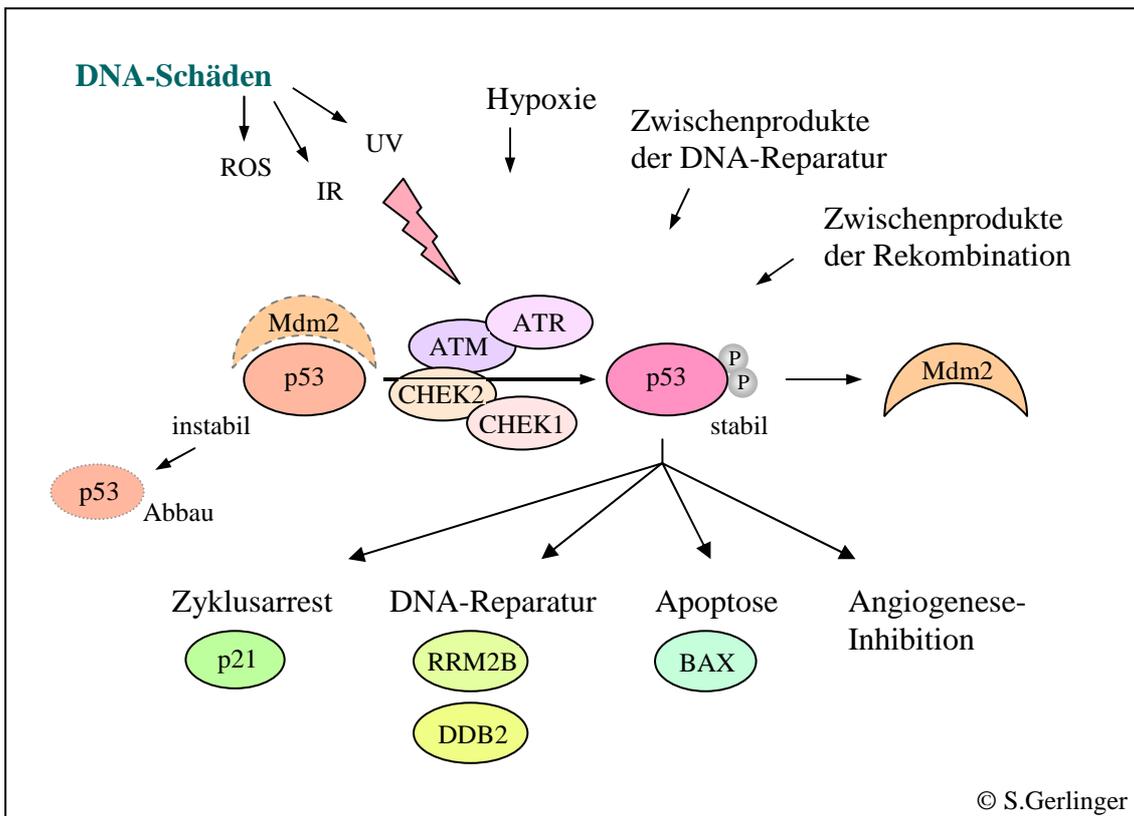


Abb.9: Die zentrale Stellung des p53-Proteins zur Überwachung der genomischen Integrität. p53 wird durch das Protein Mdm2 destabilisiert und kann anschließend ubiquitiniert und abgebaut werden. Verschiedene Stresssignale führen zur Degradation von Mdm2 und indirekt zur Stabilisierung von p53. Je nach Art des Reizes trägt eine Phosphorylierung von p53 durch die Kinasen ATM, ATR, CHEK2 oder CHEK1 zu dessen Stabilisierung bei. Erhöhte Level und die Aktivierung des Schutzproteins resultieren in der Induktion von Zielgenen wie p21, BAX, RRM2B und DDB2. Die Mdm2-Level selbst werden über dessen Transkription durch p53 negativ-reguliert. Eine Inaktivierung von p53 bedeutet für eine Tumorzelle einen wesentlichen Selektionsvorteil (Tanaka et al., 2000; Ford, 2005; Levine et al., 2006).

Die Hauptaufgabe von p53 ist die zelluläre Steuerung einer geschädigten Zelle zur Wahrung dessen genomischer Integrität. Abhängig von der Art der DNA-Schädigung

wird das Protein über verschiedene unabhängige Signalwege aktiviert (Vogelstein et al., 2000; Levine et al., 2006). Dessen Stabilität und Aktivität wird posttranslational durch Phosphorylierung, Ubiquitinierung, Acetylierung oder Sumoylierung modifiziert (Liu und Chen, 2006).

Das Genprodukt des DNA-Reparaturgens TP53 tritt mit seinen Zielproteinen selten direkt in Kontakt, meist agiert es als aktivierender oder reprimierender Transkriptionsfaktor. Über Aktivierung zellzyklusinhibierender Gene wie p21, 14-3-3 $\sigma$  oder GADD45 oder über die Promotoren-Repression von zellzyklusaktivierenden Genen wie ZyklinA, ZyklinB1 oder CDK1 wird die beschädigte Zelle in den Kontrollpunkten G1/S oder G2/M arretiert (Guillouf et al., 1995; Malkin, 1998; Laptenko und Prives, 2006). Das vermutlich wichtigste Zielgen von p53 zur Induktion der Apoptose ist BAX (Malkin, 1998). Wie sich gezeigt hat, aktiviert TP53 weitere DNA-Reparaturgene wie das Ribonukleotid-Reduktase-Gen p53R2 (Tanaka et al., 2000) oder DDB2 (Ford, 2005). Abbildung 9 verdeutlicht die zentrale Funktion von p53 als Koordinator der Zelle.

Wichtigstes Steuerungselement von p53 ist die Bindung an die DNA zur Ausübung seiner Tätigkeit als sequenzspezifischer Transkriptionsfaktor. Die meisten Mutationen bedingen einen „loss-of-funktion“-Effekt, nämlich die Synthese eines stabilen normal großen Proteins, das jedoch seine spezifischen funktionellen Eigenschaften verloren hat. Die hotspot-Mutationen 175, 245, 248 und 273 liegen innerhalb der zentralen DNA-Bindungsdomäne und führen zum Verlust seiner spezifischen DNA-Bindungsfunktion und somit zum Verlust der genomischen Stabilität (Soussi und Beroud, 2001).

Vor kurzem wurde ein „gain-of-funktion“-Effekt beschrieben, der TP53 eine mögliche Rolle als Onkogen zuweist. Dabei zeigte die Mutation R175H ein erhöhtes Metastasierungspotential und einen gesteigerten Proliferations- und Transformationsgrad (Lang et al., 2004). CD95 beispielsweise ist ein Protein, das an der Induktion der Apoptose bei DNA-Schädigung beteiligt ist, und dessen Transkription durch p53 gesteuert wird. Es konnte gezeigt werden, dass mutiertes p53 unphysiologisch an den Promotor des Apoptose-Proteins CD95 binden kann. Dadurch wird seine Aktivität herunterreguliert und die geschädigte Zelle wird nicht mehr in die Apoptose geleitet und entartet maligne (Zalcenstein et al., 2003).

## **2.2. DNA-Reparaturgene mit niedriger Penetranz**

Beispiele für DNA-Reparaturgene, die für ein geringes Lebenszeitrisiko zur Entwicklung eines Mammakarzinoms prädisponieren, sind die Gene ATM, CHEK2, NBS1 und die Fanconi-Anämie-Gene. Biallele Träger (homozygot oder compound heterozygot) von Mutationen in diesen Genen erkranken an seltenen rezessiven Brustkrebs-Syndromen oder brustkrebsassoziierten Krebsyndromen. Heterozygote Träger dieser seltenen Mutationen weisen währenddessen ein erhöhtes Risiko für familiären Brustkrebs auf (Szpirer und Szpirer, 2007).

### **2.2.1. CHEK2 (Checkpoint-Kinase 2)**

#### **2.2.1.1. Klinik**

Bell et al. entdeckten 1999 in LFS- und LFL-Familien 3 Keimbahnmutationen in dem DNA-Reparaturgen CHEK2 (Bell et al., 1999). Die Rolle von CHEK2 als Prädispositionsgen für diese Familien wurde jedoch hinterfragt, nachdem 2 dieser Varianten, die Mutationen 1100delC und I157T, in Brustkrebsfamilien und auch in Gesunden entdeckt wurden (Allinen et al., 2001; Vahteristo et al., 2001). Aktuelle Untersuchungen stellen die These auf, dass ein erhöhtes Risiko zur Entwicklung von Karzinomen in Familien mit verändertem CHEK2 ausschließlich für Brustkrebs besteht (Evans et al., 2008; Offit und Garber, 2008).

Auf der anderen Seite wurde nachgewiesen, dass Träger von CHEK2-Varianten ebenfalls ein erhöhtes Risiko für Prostatakarzinome, Schilddrüsen- und Nierenkarzinome haben (Cybulski et al., 2004). Ein erhöhtes kolorektales Karzinomrisiko wird derzeit kontrovers diskutiert (Cybulski et al., 2004; Kilpivaara et al., 2006).

Für Familien mit Brustkrebs besteht ein 3- bis 5-fach erhöhtes Risiko. Das Lebenszeitrisiko mit 70 Jahren erkrankt zu sein, liegt für heterozygote Träger der CHEK2 Mutation 1100delC bei 37% (Weischer et al., 2008).

Brusttumore von „early-onset“-Patientinnen mit Veränderungen im CHEK2-Allel sind überwiegend Östrogenrezeptor-positiv und überproportional häufig mit multizentrischem Erscheinungsbild oder haben eine lobuläre Histologie. Insgesamt betrachtet besitzen sie jedoch im Vergleich zu nichthereditären Tumoren keine charakteristische Signatur (Cybulski et al., 2006; Schmidt et al., 2007).

### 2.2.1.2. Genetik

Das Tumorsuppressorgen CHEK2 ist auf Chromosom 22q12 lokalisiert. Seine 14 Exons sind über 50 kb genomischer DNA verteilt und kodieren für ein 543 AS großes Protein (Matsuoka et al., 1998).

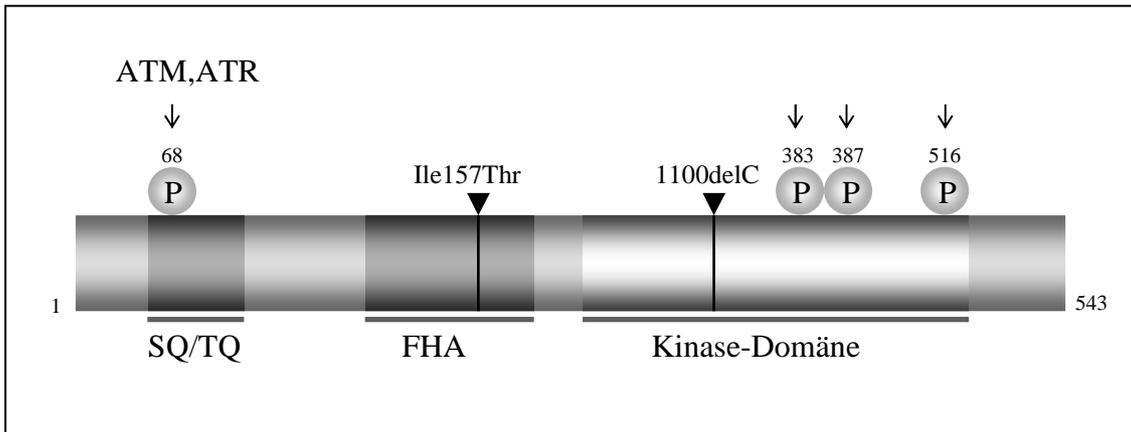


Abb.10: Für die DNA-Reparatur wichtige funktionelle Domänen in CHEK2. FHA (forkhead-assoziierte Domäne), SQ/TQ-Cluster-Domäne (Serin/Glutamin- und Threonin/Glutamin-reiche Region) (Literaturquellen siehe Text).

Das Protein besitzt 3 konservierte funktionelle Domänen (siehe Abb.10). Im N-Terminus (AS 20-75) befindet sich ein regulatorischer Bereich mit 7 Paaren von Serin/Glutamin und Threonin/Glutamin (SQ/TQ). DNA-Doppelstrangbrüche, durch ionisierende Strahlung oder andere genotoxische Ursachen, bewirken eine direkte Aktivierung von CHEK2 durch die ATM-vermittelte Phosphorylierung der AS dieser SQ/TQ-Cluster-Domäne (SCD). Die wichtigste Bindungsstelle dabei ist Threonin 68. DNA-Schäden durch UV-Exposition und Blockaden der Replikationsgabeln induzieren eine Phosphorylierung durch ATR an den Threoninen 68 und 26, sowie am Serin 50 (Matsuoka et al., 2000; Bartek et al., 2001; Kastan und Bartek, 2004).

Relativ zentral beherbergt das Protein eine „forkhead-assoziierte“ Domäne (FHA) für verschiedene Protein-Protein-Interaktionen (AS 112-175). Damit bindet die Kinase andere Phosphothreonin-Reste zur eigenen Aktivierung und zur Weiterleitung von Signalen (Li et al., 2002).

Eine große Domäne für seine Kinase-Funktion sowie 2 weitere Paare SQ/TQ und ein Aktivierungs-Loop befinden sich am C-terminalen Ende (AS 225-490) (Matsuoka et al., 1998).

Das Genprodukt von CHEK2 ist ein stabiles Nukleoprotein, das in den meisten Geweben exprimiert wird (Matsuoka et al., 1998; Lukas et al., 2001). Defekte in CHEK2 führen entweder zum Expressionsverlust oder zur Schwächung seiner Signalfunktion. Mutationen in der SQ/TQ-Cluster-Domäne verhindern eine adäquate Aktivierung der Kinase durch ATM. Veränderungen in der FHA untergraben die Protein-Protein-Interaktionen mit seinen Substraten wie p53, BRCA1 und den CDC25-Phosphatasen. Veränderungen in der Kinasedomäne führen zum Verlust der katalytischen Aktivität (Falck et al., 2001; Li et al., 2002).

Die häufigsten CHEK2-Keimbahnmutationen, die für Brustkrebs prädisponieren, sind die proteintrunkierende Deletion 1100delC im Exon 10 der Kinasedomäne und die „missense“-Mutation Ile157Thr (470T>C) im Exon 3 der FHA-Domäne. Somatische Mutationen in CHEK2 wurden zwar in vielen Krebsformen gefunden, diese sind in Mammakarzinomzellen jedoch relativ selten (0,2%) (Sullivan et al., 2002).

Die Ile157Thr-Variante wurde in Mammakarzinom-Patienten mit und ohne familiärem Hintergrund und in LFS-Familien detektiert (Allinen et al., 2001; Vahteristo et al., 2001). Das Protein der Mutante ist stabil, jedoch ist deren Expression erniedrigt (Kilpivaara et al., 2005).

CHEK2-1100delC ist nicht selten mit einem kompletten Expressionsverlust verbunden oder sie führt zu einem instabilen Protein (Vahteristo et al., 2002).

Die Mutationshäufigkeit in der Normalpopulation ist geographisch ausgesprochen variabel. Während in Populationen außerhalb Nord- und Osteuropas die Variante zum größten Teil überhaupt nicht vertreten ist (Weischer et al., 2008), findet man die höchsten Mutationsfrequenzen in Finnland (1,1-1,4%) und in den Niederlanden (1,3-1,6%). In Deutschland ist 1100delC zu 0,6-1,0% nachweisbar (CHEK2 Breast Cancer Case-Controle Consortium, 2004). Die Prävalenz dieser Mutation in Brustkrebsfamilien beträgt in Finnland 2,5% (Kilpivaara et al., 2005), in den Niederlanden 4% (Schmidt et al., 2007) und in Deutschland 2,3% (Rashid et al., 2005).

Der prozentuale Anteil von 1100delC in der Population der Ashkenazi-Juden beträgt 0,3%. Im Vergleich zu anderen ethnischen Gruppen besteht jedoch kein Unterschied (Offit et al., 2003).

### **2.2.1.3. Biologische Funktion**

Die Kinase CHEK2 übernimmt in proliferierenden sowie in nichtproliferierenden Zellen eine zentrale Rolle zur Stabilisierung der genomischen Integrität (Bartek et al., 2001). Nach Schädigungen an der DNA oder bei Blockierung der Replikation greift es regulierend in den Zellzyklus ein oder stimuliert direkt die DNA-Reparatur (Lee et al., 2000; Matsuoka et al., 2000; Lukas et al., 2001). Die initiale Phosphorylierung der SQ/TQ-Cluster-Domäne durch ATM induziert eine Homodimerisation, ebenso wie eine Phosphorylierung der Threonine 383 und 387 des autoinhibitorischen Loops und des Serins 516 der Kinase-Domäne. Dies führt zur Aktivierung von CHEK2 und zur Verbreitung des Alarmsignals innerhalb des Zellkerns (Lukas et al., 2003).

Aktiviertes CHEK2 vermittelt eine Arretierung in G1/S, indem es das p53-Protein am Serin 20 phosphoryliert und somit die Dissoziation vom Protein Mdm2 unterstützt (Chehab et al., 2000). Für eine normale Regulation des Zellzyklus bindet das Mdm2 unphosphoryliertes p53, das dadurch instabil wird und über Ubiquitinierungsreaktionen abgebaut werden kann. Geringe Mengen an p53 in der Zelle bedeuten weniger transkriptionelle Aktivierung von apoptose- und zellzyklusstopinduzierenden Proteinen wie p21 und BAX. Durch die posttranslationale Phosphorylierung von p53 durch Kinasen wie ATM und CHEK2 wird die Degradation von p53 verhindert und das Protein kann seine tumorprotektive Wirkung entfalten. In vivo erhöht CHEK2 die Stabilität von p53 nach Schädigungen an der DNA. Dominant-negative CHEK2-Mutanten hingegen zeigen weder eine Phosphorylierung von p53 an Serin 20, noch eine p53-Stabilisierung (Chehab et al., 2000).

Der G2/M-Kontrollpunkt wird von CHEK2 über die Phosphorylierung einer CDC25-Phosphatase überwacht. Durch die Phosphataktivierung wird in der Phosphatase CDC25C eine Bindungsstelle für das Protein 14-3-3 kreiert, und dessen Bindung verhindert die Dephosphorylierung der Cyklin-abhängigen Kinase 2 (Cdk2). Weiterhin kann durch die Anknüpfung eines Phosphatrestes an Serin 216 der CDC25C die Phosphatase auch direkt negativ reguliert werden. Als Phosphatdonator fungiert dabei neben CHEK2 auch CHEK1. Die Zelle kann in beiden Fällen nicht in die Mitose eintreten (Matsuoka et al., 1998; Chehab et al., 2000) (siehe Abb.11).

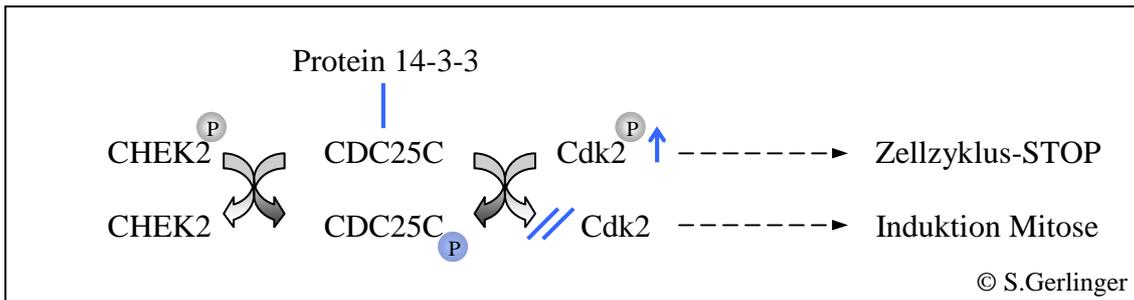


Abb.11: Vereinfachte Darstellung CHEK2-abhängiger Phosphorylierungsreaktionen zur Regulation des Zellzyklus. Blaue Markierungen verdeutlichen die normale Situation in einer Zelle.

Am Intra-S-Phase-Kontrollpunkt werden Schäden an der DNA von CHEK2 über die Phosphorylierung der Phosphatase CDC25A reguliert. Nicht phosphoryliertes CDC25A ist in der Lage, die Cdk2 durch Dephosphorylierung zu aktivieren. In dieser Form begleitet Cdk2 die Fortsetzung der DNA-Synthese. In phosphoryliertem Zustand moderiert die Kinase jedoch die Arretierung der DNA-Replikation.

Eine Schädigung der DNA durch ionisierende Strahlung induziert die Degradierung von CDC25A durch dessen Phosphorylierung am Serin 123 durch CHEK2 (Falck et al., 2001). Die nachfolgend ausbleibende Dephosphorylierung von Cdk2 bewirkt den Zellzyklusstop. CHEK2 in Tumoren hat seine Kinaseaktivität und seine Bindungsfähigkeit an CDC25A verloren. Die Expression solcher CHEK2-Allele erhöht die Menge an CDC25A und nachfolgend die der Cdk2. Die unmittelbare Folge ist eine fehlende Unterdrückung fehlerhafter DNA-Replikation. Die Zelle geht beschädigt in die Mitose (Falck et al., 2001) (siehe Abb.12).

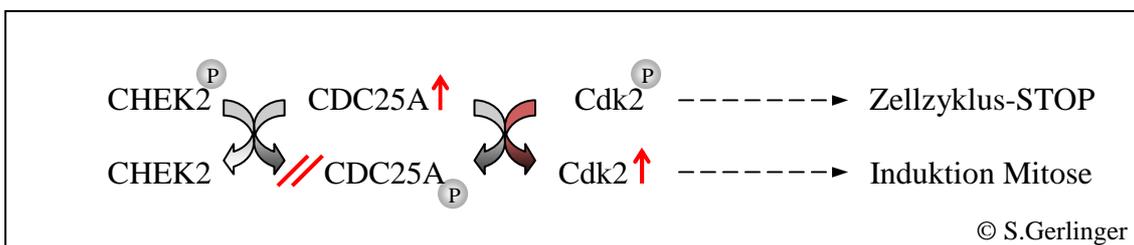


Abb.12: Vereinfachte Darstellung CHEK2-abhängiger Phosphorylierungsreaktionen zur Regulation des Zellzyklus. Rote Markierungen verdeutlichen die Situation in Tumorzellen.

CHEK2 kann nach einem erlittenen DNA-Schaden mit BRCA1 in Kontakt treten. Die Kinase ist neben ATM und ATR die dritte wichtige Kinase. Die Interaktion von

BRCA1 mit CHEK2 wird durch dessen Phosphorylierung am Serin 988 wieder aufgelöst. Die unterschiedlichen Effekte dieser Phosphorylierungsreaktionen bedürfen weiterer Forschungen (Lee et al., 2000).

## **2.2.2. ATM (Ataxia telangiectasia mutated)**

### **2.2.2.1. Klinik**

Ataxia teleangiectatica (AT) ist eine seltene Systemerkrankung. Das ihr zugrunde liegende mutierte DNA-Reparaturgen ist ATM (ataxia telangiectasia mutated). Es wird autosomal rezessiv vererbt. Etwa 0,5-1% der Bevölkerung sind gesunde heterozygote Träger einer ATM-Mutation und klinisch unauffällig. Einer jedoch von 40.000 bis 300.000 Neugeborenen der kaukasischen Welt ist bialleler Träger (für das defekte Gen homozygot oder compound heterozygot) und erkrankt (Swift et al., 1986; Savitsky et al., 1995).

Die ersten Symptome treten bereits um das 2.-3. Lebensjahr auf. Kennzeichnend sind eine progressive zerebelläre Ataxie, okulomotorische Apraxie, Teleangiectasien im Gesicht und der Bindehaut, verminderte Immunkompetenz durch einen T-Zelldefekt, ein allgemeiner physischer und psychischer Entwicklungsrückstand, sowie eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber ionisierender Strahlung (Taylor und Byrd, 2005). Das Risiko für maligne Entartungen ist im Vergleich zur Normalbevölkerung um das 100-fache erhöht. Dies sind vor allem Leukämien und Lymphome im Kindesalter. Wird, was selten geschieht, das Erwachsenenalter erreicht, stehen epitheliale Tumore wie Brustkrebs im Vordergrund (Morrell et al., 1986).

Familienanalysen verdeutlichen, dass monoallele Mutationsträger ein erhöhtes Risiko für Brustkrebs aufweisen. In AT-Familien haben weibliche Verwandte ein 2- bis 5-fach erhöhtes Risiko, an Brustkrebs zu erkranken (Swift et al., 1987; Thompson D et al., 2005). In Brustkrebsfamilien beträgt das relative Risiko (RR) für monoallele ATM-Mutationsträger 2,37 und die Mutationsfrequenz 0,86% (Renwick et al., 2006).

### **2.2.2.2. Genetik**

Das Gen ATM wurde 1988 auf Chromosom 11q22 entdeckt und 1995 kloniert. 62 seiner 66 Exons kodieren für ein 3056 AS großes Protein (Gatti et al., 1988; Savitsky et al., 1995) (siehe Abb.13). ATM gehört der Familie der PI3K-related Protein-Kinasen an

(PIKK). Sie besitzen eine Domäne, die charakteristisch für Phosphatidylinositol 3-Kinasen ist und stellen aktive Serin/Threonin-Kinasen dar (Abraham et al., 2004).

N-terminal werden über verschiedene HEAT-Domänen Interaktionen mit anderen Proteinen vermittelt (Perry und Kleckner, 2003). Innerhalb der ersten 200 AS befindet sich eine Substratbindungs-Region für BRCA1 und p53 (Fernandes et al., 2005).

Am C-Terminus, beginnend etwa bei AS 2000, befindet sich eine FAT-Domäne mit hochkonservierter FATC-Domäne aus 35 AS. Dort wird die Kinasefunktion von ATM reguliert und die Bindung regulatorischer Proteine vermittelt. Deletionen in der FATC-Domäne führen zur Blockade der Interaktion mit Tip60, einer Histon-Acetyltransferase, die nach einem DNA-Schaden die ATM-Aktivierung reguliert (Bosotti et al., 2000; Jiang et al., 2006).

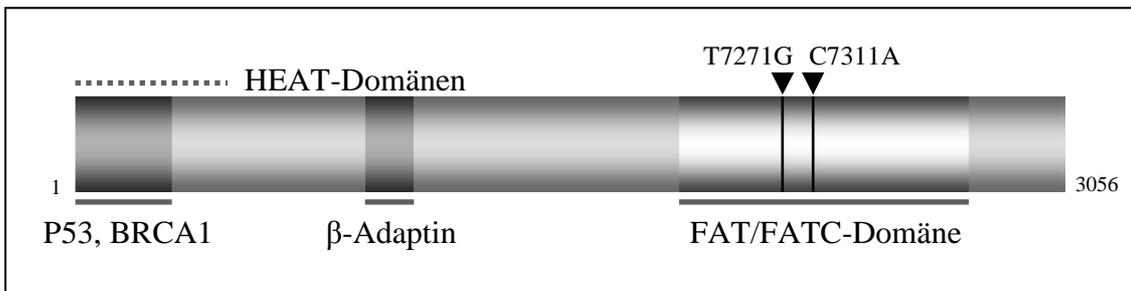


Abb.13: Für die DNA-Reparatur wichtige funktionelle Domänen in ATM. HEAT-Domänen (Non-Kinase-Anteil aus antiparallelen Helices mit flexiblen Loops), FAT/FATC-Domäne (ATM-Aktivierungsregion) (Literaturquellen siehe Text).

Bislang wurden mehr als 300 verschiedene Mutationen beschrieben, von denen über 80% Substitutionen einzelner Nukleotide oder Deletionen/Insertionen sind. 10% führen zu „missense“-Mutationen. Es werden frühzeitige Terminationcodons generiert oder Abnormalitäten beim „splicing“ (www.benaroyaresearch.org). Daraus resultiert eine reduzierte Protein-Expression oder trunkierte Proteine, die für gewöhnlich instabil sind. Während die pathogenetischen Auswirkungen von „missense“-Mutationen von der Position einer Mutation im ATM-Gen unabhängig sind (Renwick et al., 2006), besteht für trunkierende Mutationen ein Zusammenhang zwischen der Position auf dem ATM-Gen und dem Risiko für die Entstehung von Mammakarzinomen (Cavaciuti et al., 2005). Betroffen sind proteintrunkierende Mutationen in den Bindungsdomänen für p53/BRCA1, beta-Adaptin und die FAT-Domäne. Die Stabilität und Aktivität des

trunkierten ATM-Proteins ist dabei abhängig von dessen Länge und nimmt so indirekt Einfluss auf die Fähigkeit des Proteins zur DNA-Reparatur (Cavaciuti et al., 2005).

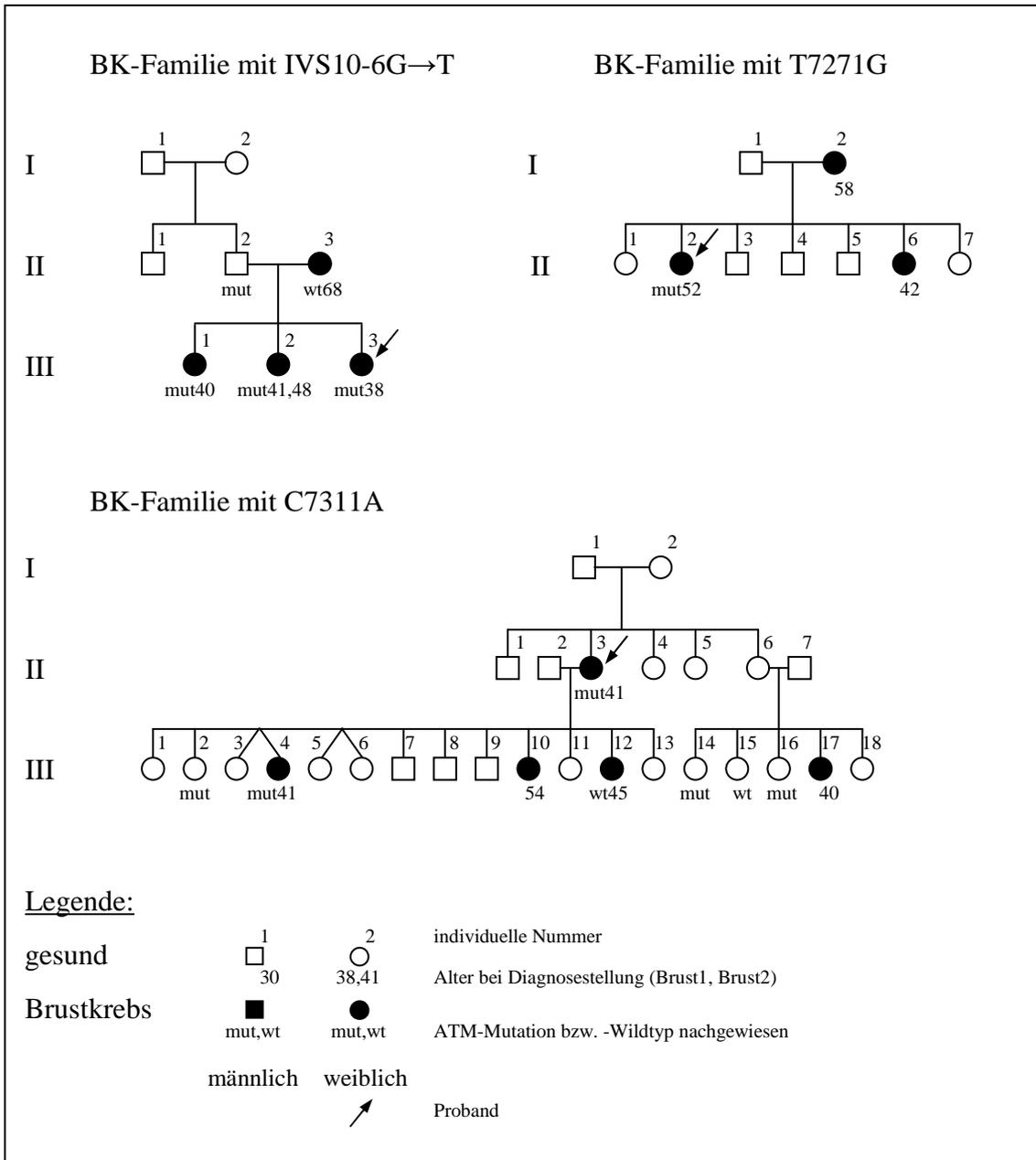


Abb.14: Stammbäume von 3 verschiedenen Familien mit familiärem Brustkrebs. Die „missense“-Mutation C7311A wurde nicht in AT-Familien beobachtet (modifiziert nach Chenevix-Trench et al., 2002 und Renwick et al., 2006).

In Deutschland sind 2% aller Brustkrebspatienten heterozygote Träger einer proteintrunkierenden ATM-Mutation (Dörk et al., 2001). 0,7% besitzen die Spleiß-

Variante 1066-6T→G (IVS10-6T→G) im Intron 10. Für dessen homozygote Träger ist durch den resultierenden Verlust des Exon 11 ein um etwa 10% verkürztes ATM-Protein mit dominant negativer Wirkung charakteristisch (Dörk et al., 2001; Chenevix-Trench et al., 2002). In einer „missense“-Mutation, T7271G, identifiziert in AT-Familien mit einem familiären Brustkrebs hintergrund, ist das Valin an AS-Position 2424 durch Glycin ersetzt. Das resultierende Protein ist zwar stabil, jedoch mit defekter Kinasefunktion und ebenfalls dominant negativer Wirkung. Die unmittelbare Folge sind eine reduzierte p53-Phosphorylierung und -Stabilisierung und eine ineffiziente BRCA1-Phosphorylierung zur Reparatur von DNA-Schäden (Chenevix-Trench et al., 2002; Stankovic et al., 2002). Abbildung 14 zeigt die Stammbäume verschiedener Brustkrebsfamilien, die von unterschiedlichen Mutationen im ATM-Gen betroffen sind.

### **2.2.2.3. Biologische Funktion**

Die Proteinkinase ATM nimmt im Regelwerk der DNA-Reparatur eine zentrale Rolle als Koordinator ein. Sie regelt verschiedene Signalwege der Reparatur von Doppelstrangbrüchen und Zellzyklusfunktionen. Eine Aufgabe als Sensor von DNA-Doppelstrangbrüchen wurde ihr ebenfalls zugewiesen (Smith et al., 1999). Dies wird jedoch kontrovers diskutiert (Zhou und Elledge, 2000).

Ist das ATM-Protein inaktiv, liegt es in dimerer oder multimerer Form vor. Als Antwort auf einen DNA-Doppelstrangbruch, vorzugsweise nach Bestrahlung, erfolgt dessen Aktivierung durch die Dissoziation der Moleküle nach intermolekularer Autophosphorylierung (Bakkenist und Kastan, 2003). Dabei sind die Zelllinien mit „missense“-Mutationen im ATM-Gen radiosensitiver als trunkierend-mutationstragende Zellen (Fernet et al., 2004). ATM-mutierte Zellen von AT-Patienten zeigen Defekte bezüglich der DNA-Synthese (Painter und Young, 1980) und des Zellzyklusarrests in den Kontrollpunkten G1/S, Intra-S und G2/M (Lavin und Khanna, 1999; Khanna et al., 2001). Die Kinase phosphoryliert nach einer Schädigung der DNA durch ionisierende Strahlung initial verschiedene Schlüsselproteine der DNA-Reparatur wie BRCA1, p53, Nbs1, CHEK2, FANCD2, FANCI, CHEK1, RPA, H2AX oder Mdm2 (Zhou und Elledge, 2000; Taniguchi et al., 2002; Smogorzewska et al., 2007) (siehe Abb.15).

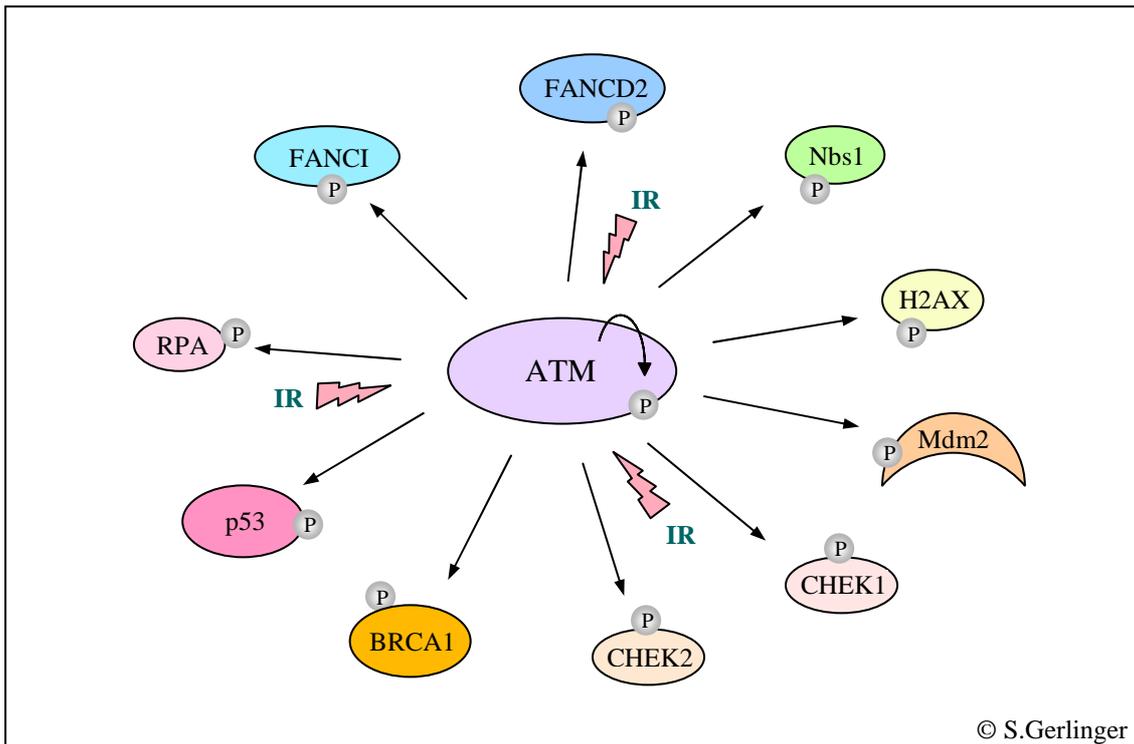


Abb.15: Schaubild zur Phosphorylierung wichtiger Schlüsselenzyme der DNA-Reparatur durch ATM nach einer Schädigung der DNA durch ionisierende Strahlung (IR).

ATM phosphoryliert BRCA1 dabei an verschiedenen AS, inklusive der Serine an Position 1387, 1423 und 1524 (Cortez et al., 1999; Gatei et al., 2000). Eine Phosphorylierung an Ser1423 induziert den Arrest an G2/M und die des Ser1387 einen Intra-S-Arrest (Xu et al., 2002). Um den Zellzyklus am G1/S zu arretieren, wird p53 am Ser15 phosphoryliert (Foray et al., 2003). Schäden an der DNA durch UV-Strahlung oder durch die Blockade der Replikation (Hydroxyurea-induzierter Replikationsarrest) werden nicht durch ATM vermittelt. Diese Signale werden durch Kinasen wie ATR an die verschiedenen Effektoren übertragen. BRCA1 wird von ATR an Serin 1423 phosphoryliert (Tibbetts et al., 2000).

### 2.2.3. NBS1 (Nijmegen-Breakage-Syndrom-Gen 1)

#### 2.2.3.1. Klinik

Biallele Defekte im DNA-Reparaturgen NBS1 bedingen das Nijmegen-Breakage-Syndrom (NBS), ein Strahlensensitivitäts-Syndrom (Szpirer und Szpirer, 2007). NBS1 wird autosomal rezessiv vererbt. Die Erkrankung ist vorwiegend in Ost- und

Zentraleuropa präsent (Steffen et al., 2006). Grundlage des NBS ist eine Störung des Reparaturmechanismus der DNA mit verstärkter Chromosomenbrüchigkeit nach Disposition mit ionisierender Strahlung. Für NBS-Patienten kennzeichnend sind, neben der Radiosensitivität, eine Immundefizienz und eine Prädisposition für maligne Tumore. Der klinische und zelluläre Phänotyp ähnelt dabei der Ataxia teleangiectatica. Die Patienten zeigen jedoch keine Ataxie und keine Teleangiectasien, sondern einen Mikrozephalus (Shiloh et al., 1997; Digweed et al., 1999).

Monoallele Keimbahnmutationen in NBS1 bedingen den dominanten Phänotyp einer familiären Prädisposition für Brustkrebs (Szpirer und Szpirer, 2007). Die NBS1-trunkierende Mutation 657del5 wurde in sporadischen Brustkrebsfällen ebenso wie in Probanden mit familiärem Brustkrebs und bilateralen Krebsfällen nachgewiesen (Górski et al., 2003; Steffen et al., 2006). Diese Deletion ist verantwortlich für ein etwa 3-fach erhöhtes Risiko für weibliche heterozygote Träger, an familiärem Brustkrebs zu erkranken (Górski et al., 2003; Bogdanova et al., 2008). In Deutschland ist 657del5 in 0,09% der Brustkrebsfälle nachweisbar (Bogdanova et al., 2008). Monoallele Mutationsträger haben zusätzlich ein erhöhtes Risiko, an Lymphomen, malignen Melanomen oder an einem Prostatakarzinom zu erkranken (Steffen et al., 2006).

Die „missense“-Mutation R215W steht ebenfalls im Verdacht, das Brustkrebsrisiko zu erhöhen, eventuell mit einer niedrigeren Penetranz (Bogdanova et al., 2008). Eine weitere europäische „missense“-Mutation ist die I171V. Obwohl diese Substitution in Polen zu einem 9-fachen Anstieg des Brustkrebsrisikos führt, ist sie in der deutschen Population nicht risikoassoziiert (Bogdanova et al., 2007; Roznowski et al., 2008).

### **2.2.3.2. Genetik**

Das Gen NBS1 wurde 1998 auf dem Chromosom 8p21 entdeckt und geklont (Carney et al., 1998; Matsuura et al., 1998).

Das 754 AS große Genprodukt Nbs1 (Nibrin-Protein) besteht aus 16 Exons und enthält in der N-terminalen Region (AS 1-152) eine „forkhead-assoziierte“ Domäne (FHA) und Teile einer „breast cancer C-terminal“-Domäne (BRCT) (AS 108-196). Beide Domänen sind funktionell wichtige Einheiten (Featherstone und Jackson, 1998) (siehe Abb.16).

Die BRCT-Domäne ist eine Protein-Protein-Bindungsregion, die in über 40 Proteinen, die der Aufrechterhaltung der genomischen Integrität dienen, nachweisbar ist

(Featherstone und Jackson, 1998). Die FHA-Domäne vermittelt spezifische Protein-Protein-Interaktionen über ein Phospho-Serin/Threonin-Motiv (Durocher et al., 1999). Diese Domäne ist für die biologische Funktion des Nibrins unentbehrlich. Das Histidin an Position 45 ist eine hochkonservierte Stelle. Dessen Mutation führt beispielsweise in *Saccharomyces cerevisiae* zu einer Störung der zellulären Antwort auf eine DNA-Schädigung (Sun et al., 1998).

NBS1 verfügt zentral über mehrere Regionen mit SQ-Motiv, welche von ATM und ATR phosphoryliert werden können (Kobayashi et al., 2004). Eine Bestrahlung mit IR (Ionisierende Strahlung) bewirkt eine Phosphorylierung von Nibrin durch ATM an den AS-Positionen Ser278 und Ser343 und eine Aktivierung des Inter-S-Kontrollpunkts. Die Phosphorylierung von Ser343 ist für die Resistenz der Zelle gegenüber ionisierender Strahlung unbedingt erforderlich (Wu et al., 2000; Zhao et al., 2000). In vitro können Ser397 und Ser615 von ATM ebenfalls phosphoryliert werden (Wu et al., 2000).

C-terminal befindet sich eine Bindungsstelle für Mre11 für die Formierung des multimeren MRN-Komplexes. Dort ist ebenfalls eine ATM-assoziierte Domäne angesiedelt (Ebi et al., 2007).

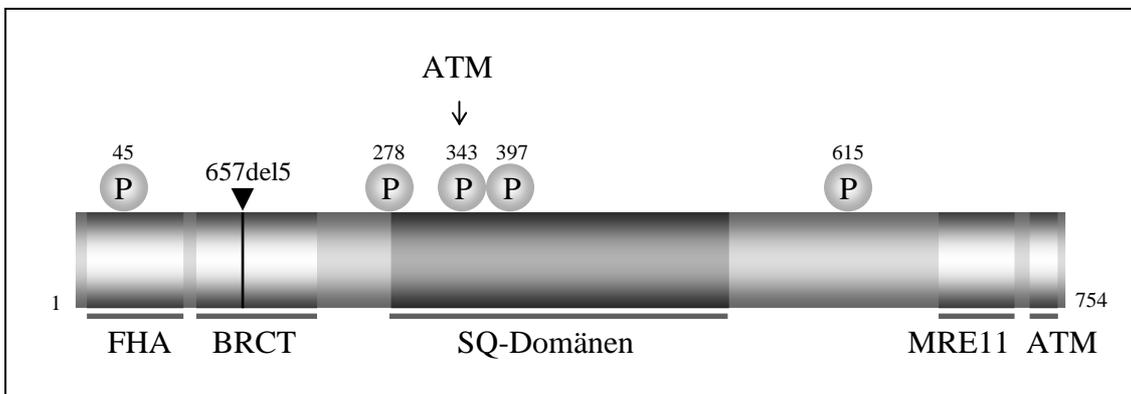


Abb.16: Für die DNA-Reparatur wichtige funktionelle Domänen in NBS1. BRCT (breast cancer C-terminal-Domäne), FHA (forkhead-assoziierte Domäne), SQ-Domäne (Serin/Glutamin-reiche Domäne) (Literaturquellen siehe Text).

Mit über 90% ist die Mutation 657del5 im Exon 6 die am häufigsten in NBS-Patienten gefundene Mutation. Sie führt zu einer Deletion von 5 Basenpaaren in der BRCT-Domäne, welche zu einer Rasterverschiebung mit resultierender Proteintrunkierung

führt (Digweed und Sperling, 2004). Es hat sich gezeigt, dass nach einer Bestrahlung mit IR das Ser343 von NBS1657del5 um 35% weniger phosphoryliert wird (Bogdanova et al., 2008). Das Resultat einer solchen Mutation ist eine erhöhte Sensibilität gegenüber ionisierender Strahlung (Zhao et al., 2002). Die Mutationsfrequenz in der Normalpopulation beträgt in Zentraleuropa zwischen 0% in Deutschland und 0,76% in Polen (Steffen et al., 2006; Ziólkowska et al., 2006).

R215W ist eine weitere NBS1-Mutation. Sie wurde in 2 NBS-Geschwistern beschrieben, die für die Mutationen 657del5/R215W compound heterozygot waren (Seemanová et al., 2006). In NBS1657del5/R215W war die Expression von Nibrin um 15% reduziert und in NBS1R215W um 70%. Dies weist darauf hin, dass die „missense“-Mutation NBS1R215W zu einem instabilen Protein führt. Auch die Phosphorylierung von Nbs1 am Ser343 unter Strahlungsdruck mit IR ist um 60% erniedrigt (Bogdanova et al., 2008). NBS1R215W ist in Deutschland in 0,8% und in Weißrussland in 0,6% unselektierter Brustkrebsfälle nachweisbar (Bogdanova et al., 2008).

### **2.2.3.3. Biologische Funktion**

Nibrin ist integraler Bestandteil des MRN-Komplexes (Mre11/Rad50/Nbs1) und ein möglicher Sensor und Koordinator für DNA-Schäden (Zhou und Elledge, 2000; Jeggo und Löbrich, 2005).

MRN ist für eine normale Zellantwort auf Doppelstrangbrüche essentiell (Petrini et al., 1999). Nach einem DNA-Replikationsblock beispielsweise ist er innerhalb des Nukleus an Fokuspunkten konzentriert detektierbar (Franchitto und Pichierri, 2002). Nbs1 interagiert direkt mit Mre11 über seine C-terminalen Sequenzen, und es ist erforderlich für die Anwesenheit des MRN im Nukleus. Ohne dieses Protein würden die Bindungspartner Mre11 und Rad50 im Zytoplasma verbleiben (Desai-Mehta et al., 2001).

Als initialer Schritt in der HR und NHEJ dient der MRN möglicherweise auch der Erkennung von Doppelstrangbrüchen (Ma et al., 2003; Pichierri und Franchitto, 2004; Zhang et al., 2004). Für eine funktionierende Chromatinbindung des MRN-Komplexes ist Nbs1 unentbehrlich (Zhao et al., 2002). Zur Optimierung sind intakte FHA- und BRCT-Domänen erforderlich. Im Gegensatz zur Zellzykluskontrolle scheint eine

Phosphorylierung von Nibrin an Ser278 und Ser343 durch ATM hierfür keine Rolle zu spielen (Zhao et al., 2002). Das durch ATM phosphorylierbare Histon H2AX jedoch wird über die FHA- und BRCT-Domänen direkt von Nbs1 im Komplex gebunden. Der MRN wird zur beschädigten Stelle rekrutiert und verbleibt in unmittelbarer Nachbarschaft zum DNA-Schaden (Kobayashi et al., 2004). Neueren Untersuchungen zu Folge, vermag der MRN-Komplex die NHEJ zu stimulieren, indem die beteiligten Enzymkomplexe an der Ausrichtung der DNA-Enden unterstützt werden (Huang und Dynan, 2002) und die Wiederverknüpfung von Doppelstrangbrüchen via homologer Rekombination eingeleitet wird (Kobayashi et al., 2004).

Das Protein Nbs1 ist neben der Prozessierung auch in die Signalgebung involviert (Shiloh, 1997). Während der S-Phase einer proliferierenden Zelle ist der MRN-Komplex kolokalisiert mit „proliferating cell nuclear“-Antigen (PCNA), was ihm eine Rolle in der DNA-Synthese und deren Regulation zuweist (Maser et al., 2001). NBS1-defekte Zellen sind nach Bestrahlung teilweise nicht mehr in der Lage, den Zellzyklus an den Kontrollstellen G1/S und Intra-S zu kontrollieren. Der G2/M-Kontrollpunkt wurde in der Literatur unterschiedlich als normal (Girard et al., 2000), abnormal verzögert (Kang et al., 2002) oder defizient (Buscemi et al., 2001) beschrieben.

Der MRN-Komplex verhindert beispielsweise den Abbau von p53 und sorgt indirekt für eine erhöhte Konzentration des Schutzproteins (Featherstone und Jackson, 1998). Defekte in der Zellzykluskontrolle können ebenfalls übergeordnet das Resultat einer ineffizienten Aktivierung der Kinase CHEK2 durch Nbs1 sein. Die Phosphorylierung von CHEK2 durch ATM erfordert letztendlich die Phosphorylierung von Nbs1 an Ser343, die in Nbs1-Mutanten jedoch deutlich reduziert ist (Buscemi et al., 2001; Bogdanova et al., 2008).

Einige Studien erforschten die interaktiven Zusammenhänge des NBS und eines weiteren Chromosomen-Instabilitäts-Syndroms, der Fanconi-Anämie (FA). Nach einer DNA-Schädigung durch IR oder durch DNA-Vernetzungen wird ein FA-Protein, das FANCD2, mit Hilfe von phosphoryliertem Nbs1 phosphoryliert. Es stellte sich heraus, dass die Phosphorylierung von Nbs1 wiederum unterstützt wird durch einen FA-Proteinkomplex aus Komponenten der FA-Gruppe I (Taniguchi et al., 2002; Pichierri und Rosselli, 2004).

## 2.2.4. Fanconi-Anämie-Gene

### 2.2.4.1. Klinik

Neben der Ataxia teleangiectatica und dem Nijmegen-Breakage-Syndrom ist die Fanconi-Anämie (FA) ein weiteres Chromosomen-Instabilitäts-Syndrom. Als Ursache wurden biallele Mutationen in bislang 13 FA-Genen verifiziert (FANCA, B, C, D1, D2, E, F, G, I, J, L, M, N). Diese DNA-Reparaturgene sind kennzeichnend für 13 verschiedene FA-Komplementationsgruppen (FA-A bis FA-N).

Auf molekularbiologischer Ebene können die FA-Gene in 3 verschiedene Gruppen eingeteilt werden. FANCA, B, C, E, F, G, L und M gehören zur Gruppe I, FANCD2 und FANCI zur Gruppe II und die Gruppe III wird von FANCD1, FANCI und FANCN gebildet. Schätzungsweise sind in mehr als 85% der FA-Familien die Subtypen FA-A, FA-C und FA-G vorherrschend (Wang, 2007) (siehe Abb.17).

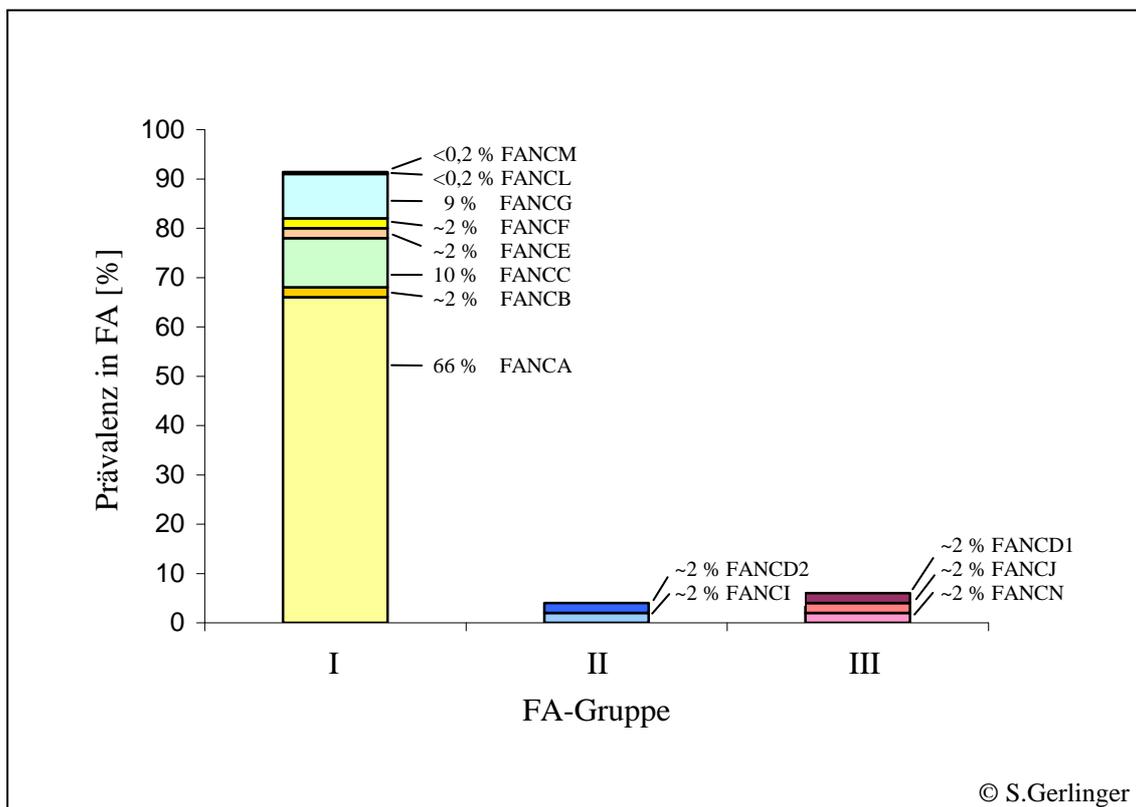


Abb.17: Prävalenz der einzelnen FA-Gene im Patientenkollektiv. Die Komplementationsgruppe FA-A ist mit 66% am häufigsten, die der FA-L und FA-M mit <0,2% am seltensten vertreten (Daten aus Wang, 2007).

Leitsymptom der klassischen Fanconi-Anämie ist eine irreversible Störung der Blutbildung im Kindesalter (7-9 Jahre) mit Knochenmarkversagen und Panzytopenie. Weitere Charakteristika sind Wachstumsretardierung, Skelettanomalien, Fehlbildungen wie Nieren- oder Gehörgangsanomalien, Pigmentierungsstörungen und Hypogonadismus. Typisch sind auch eine Prädisposition für Malignitäten wie die akute myeloische Leukämie (AML) oder Plattenepithelkarzinome (SCC) der Mundhöhle und der anogenitalen Region.

Molekulargenetisch ist eine zelluläre Überempfindlichkeit gegenüber DNA-schädigenden Substanzen wie Mitomycin C, Diepoxybutan und anderen Alkylanzien charakteristisch. Möglicherweise sind auch reaktive Sauerstoffradikale und andere oxidative Stressoren beteiligt (Tischkowitz und Hodgson, 2003; Neveling et al., 2007). In vitro ist der DNA-Reparaturprozess nach IR-Exposition in FA-Zellen von homozygoten und von heterozygoten Trägern deutlich verlängert (Djuzenova et al., 2001). Eine vermehrte Empfindlichkeit der FA-Zellen gegenüber IR- oder UV-Strahlung wird jedoch kontrovers diskutiert (Kalb et al., 2004).

Die Folgen von Mutationen in den Genen FANCD2 und FANCI sind im Allgemeinen schwerwiegender als die in der Gruppe I. Bei Patienten mit FANCD2-Mutationen treten die Malformationen häufiger auf und die hämatologischen Malignitäten manifestieren sich früher (Kalb et al., 2007).

Die Gene der Gruppe III sind Auslöser der seltenen Subtypen FA-D1, FA-J und FA-N. Deren Phänotyp entsteht durch biallele Mutationen in FANCD1 (=BRCA2), FANCI (=BRIP1 oder BACH1) und FANCN (=PALB2). FA-J zeigt den Phänotyp der klassischen FA (Levitus et al., 2005). FA-D1 und FA-N wiederum zeigen neben der klassischen FA einen speziellen FA-Phänotyp. Sie sind assoziiert mit einem gehäuftem Auftreten von Leukämien und kindlichen soliden Tumoren wie Wilmstumoren, Medulloblastomen oder Gliomen, die in der klassischen FA ausgesprochen selten vorkommen (Reid et al., 2005, 2007).

Heterozygote Mutationsträger von FA-Genen sind überwiegend asymptomatisch. Es hat sich herausgestellt, dass monoallele Träger von FANCD1, FANCI und FANCN (Gruppe III) ein erhöhtes Risiko für Brustkrebs, für Ovarialkarzinome oder für andere Krebsarten besitzen. Im Jahr 2002 wurde entdeckt, dass FANCD1 und das

Brustkrebsgen BRCA2 identisch sind (Howlett et al., 2002). Dies war die erste kausale Verknüpfung von FA und der Prädisposition zu familiärem Brustkrebs. BRCA2-Mutationsträger haben ein zwischen 3- und 10- bis 20-fach höheres Risiko. Heterozygote Träger von Mutationen in FANCI und FANCD1 haben ein etwa 2- bis 3-faches Risiko für familiären Brustkrebs. Während ein erhöhtes Brustkrebsrisiko für Träger monoalleler Mutationen in FANCD1 als gesichert angesehen wird, wird dies für FANCI und FANCD1 jedoch kontrovers diskutiert (Satagopan et al., 2001; Rahman und Scott, 2007; Stratton und Rahman, 2008).

### **2.2.4.2. FA-Gene der Gruppe I**

Die für die Proteine der Gruppe I codierenden FA-Gene sind die 8 Reparaturgene FANCA, B, C, E, F, G, L und M (siehe Abb.18).

Die zugehörigen Genprodukte bilden die Untereinheiten eines Proteinkomplexes, den sogenannten „FA-Core-Komplex“. Eine der Hauptfunktionen dieses Komplexes ist die Monoubiquitinierung und Aktivierung von FANCD2 und FANCI nach einer DNA-Schädigung (Garcia-Higuera et al., 2001; Thompson LH et al., 2005; Sims et al., 2007). Während die Polyubiquitinierung eines Proteins dessen Degradation zur Folge hat, ist die Monoubiquitinierung ein reversibles Signal zur Regulation von Proteintargeting, der Histon-Funktion, der Transkription und der DNA-Reparatur (Sigismund et al., 2004). Fällt eines dieser Proteine aus, ist die Monoubiquitinierung von FANCD2 und FANCI gestört (Wang, 2007).

FANCA enthält für den nukleoplasmatischen Transport 2 überlappende Kernlokalisierungssignale (NLS, nuklear localization-Signal) und 5 Nukleus-Export-Sequenzen (NES). Es sind Teile einer Leucin-Zipper-Sequenz nachweisbar. bZIP-Domänen (basic leucine zipper-Domäne) enthalten viele basische AS und dienen der Dimerisierung von Proteinen (The-Fanconi-anaemia/breast-cancer-consortium, 1996; Lo Ten Foe et al., 1996).

FANCB ist als einziges FA-Gen auf dem X-Chromosom lokalisiert, und alle bisherigen untersuchten FA-B-Patienten waren männlich. Es wird vermutet, dass sich auf diesem Gen ebenfalls eine NLS befindet (Meetei et al., 2004).

FANCC ist unabhängig von seiner Beteiligung im FA-Core-Komplex am JAK-STAT-Signalweg zur Wachstumskontrolle und zur Regulation der Zellentwicklung beteiligt (Fagerlie et al., 2004).

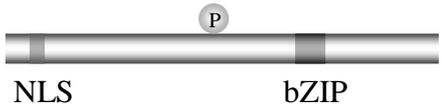
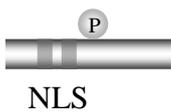
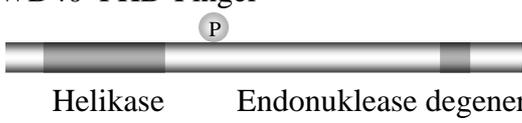
Gruppe I	Chromosomen-Lokalisation	Protein (AS)	Funktionelle Gen-Domänen
FANCA	16q24.3	1455	 NLS                      bZIP
FANCB	Xp22.31	853	 NLS
FANCC	9q22.3	558	
FANCE	6p21-22	536	 NLS
FANCF	11p15	374	 ROM-Homolog
FANCG	9p13	622	 TPR-Motiv
FANCL	2p16.1	375	 WD40 PHD-Finger
FANCM	14q21.3	2048	 Helikase                      Endonuklease degeneriert

Abb.18: Für die DNA-Reparatur wichtige funktionelle Domänen in den FA-Genen der Gruppe I. bZIP (basic leucine zipper-Domäne), NLS (nuclear localization-Signal), PHD (plant homeodomain), ROM (prokaryotic RNA binding-Protein), TPR (tetratricopeptide-repeat-Motiv), WD40 (Protein-Bindungs-Motiv aus Trp-Asp-Wiederholungssequenzen) (Daten aus Wood et al., 2005; modifiziert nach Wang, 2007).

FANCE-Protein interagiert mit FANCD1 (=BRCA2) und mit monoubiquitiniertem FANCD2 und ist für die nukleäre Akkumulation von FANCC erforderlich (Taniguchi und D'Andrea, 2002; Wang et al., 2004).

FANCF besitzt keine Introns und kodiert für ein Polypeptid, das Ähnlichkeit mit dem prokaryotischen RNA-bindenden Protein ROM besitzt. Die Bindung an RNA, eventuell auch an DNA, wird vermutlich über die AS Asn10 und Phe14 vermittelt (de Winter et al., 2000). Das Protein sorgt C-terminal für die flexible Bindung weiterer FA-Proteine wie FANCG und stabilisiert den FA-Core-Komplex. Über den N-Terminus werden FANCA und FANCG stabilisiert und der Subkomplex FANCC/FANCE gebunden (Léveillé et al., 2004).

FANCG besitzt 7 „tetratricopeptide-repeat“ (TPR)-Motive für Protein-Protein-Bindungsreaktionen. Während der M-Phase wird das zugehörige Protein an den Serinen 383 und 387 phosphoryliert. Nach Behandlung mit Mitomycin C erfolgt die Phosphorylierung am Ser7 (Blom et al., 2004; Mi et al., 2004; Qiao et al., 2004).

FANCL kodiert für die katalytische Untereinheit des FA-Core-Komplexes mit in vivo E3-Ubiquitin-Ligase-Aktivität zur Monoubiquitinierung von FANCD2. In vitro ist das Protein zur Autoubiquitinierung fähig. Zusätzlich findet man das Protein chromatinassoziiert. Beides wird durch ein „plant homeodomain“ (PHD)-Finger-Motiv vermittelt. Protein-Protein-Interaktionen werden durch die 3 WD40-Sequenzen hergestellt (Meetei et al., 2003; Gurtan et al., 2006).

FANCM enthält 7 helikasespezifische Motive und eine degenerierte Endonuklease-Domäne. Das Genprodukt ist nah verwandt mit Hef, einem Protein mit Helikase- und Endonukleasefunktion in Archaeobakterien. Es löst während der DNA-Replikation festgefahrene Replikationsgabeln und ist Bestandteil der Nukleotidexzisionsreparatur (Komori et al., 2002). Nach einer Schädigung der DNA wird FANCM hyperphosphoryliert und führt den FA-Core-Komplex an der DNA entlang (Meetei et al., 2005).

#### **2.2.4.3. FA-Gene der Gruppe II**

Die Paraloge FANCD2 und FANCI bilden die Gruppe II (siehe Abb.19).

Nach einer Schädigung der DNA werden die Proteine der beiden Gene durch den FA-Core-Komplex monoubiquitiniert und aktiviert (Garcia-Higuera et al., 2001; Thompson LH et al., 2005; Sims et al., 2007) (siehe Abb.20). Für eine effiziente FANCD2-Monoubiquitinierung ist die ATR-Kinase und RPA1 erforderlich (Andreassen et al., 2004).

Gruppe II	Chromosomen-Lokalisation	Protein (AS)	Funktionelle Gen-Domänen
FANCD2	3p25.3	1451	
FANCI	15q25-26	1328	

Abb.19: Für die DNA-Reparatur wichtige funktionelle Domänen in den FA-Genen der Gruppe II. ARM (armadillo repeat, Transduktionssignal), P (Phosphorylierung), Ub (Ubiquitinierung) (Daten aus Wood et al., 2005; modifiziert nach Wang, 2007).

Monoubiquitiniertes FANCD2 ist hauptsächlich chromatinassoziiert und wird für die normale DNA-Replikation, wie auch für die Reparatur endogener Schäden durch oxidativen Stress, benötigt. Ubiquitin fungiert dabei ausschließlich als Signalegeber für die Rekrutierung von FANCD2 zum Chromatin. Die Ubiquitinierung erfolgt am Lysin 561 (Montes de Oca et al., 2005; Thompson LH et al., 2005; Wang, 2007). Dementsprechend wurde FANCD2-Ub in der G1-Phase und auch in der S-Phase beobachtet (Rothfuss und Grompe, 2004; Thompson LH et al., 2005). Exogene Schäden durch IR, UV, DNA-schädigenden oder -vernetzenden Agentien und Hydroxyurea können ebenso eine Monoubiquitinierung bewirken. Aktiviertes FANCD2 bewegt sich zur beschädigten DNA-Stelle und interagiert mit Reparaturproteinen der Homologen Rekombination wie BRCA1, BRCA2 und RAD51 (Garcia-Higuera et al., 2001; Hussain et al., 2004; Wang et al., 2004; Rahman und Scott, 2007). Deubiquitiniert wird das Protein durch USP1 (Nijman et al., 2005).

Kürzlich wurde beschrieben, dass FANCD2 an DNA-Stellen mit festgefahrenen Replikationsgabeln geleitet wird. Die Relokalisation von FANCD2 ist dabei abhängig vom FA-Core-Komplex, von BRCA1, ATR und von der phosphorylierten Histonvariante H2AX ( $\gamma$ H2AX) (Bogliolo et al., 2007).

Während AT-Zellen hypersensitiv gegenüber IR sind, sind FA-Zellen empfindlich gegen Mitomycin C. Interessanterweise sind FANCD2 biallelisch geschädigte Zellen hypersensitiv gegenüber beiden Noxen (Taniguchi et al., 2002).

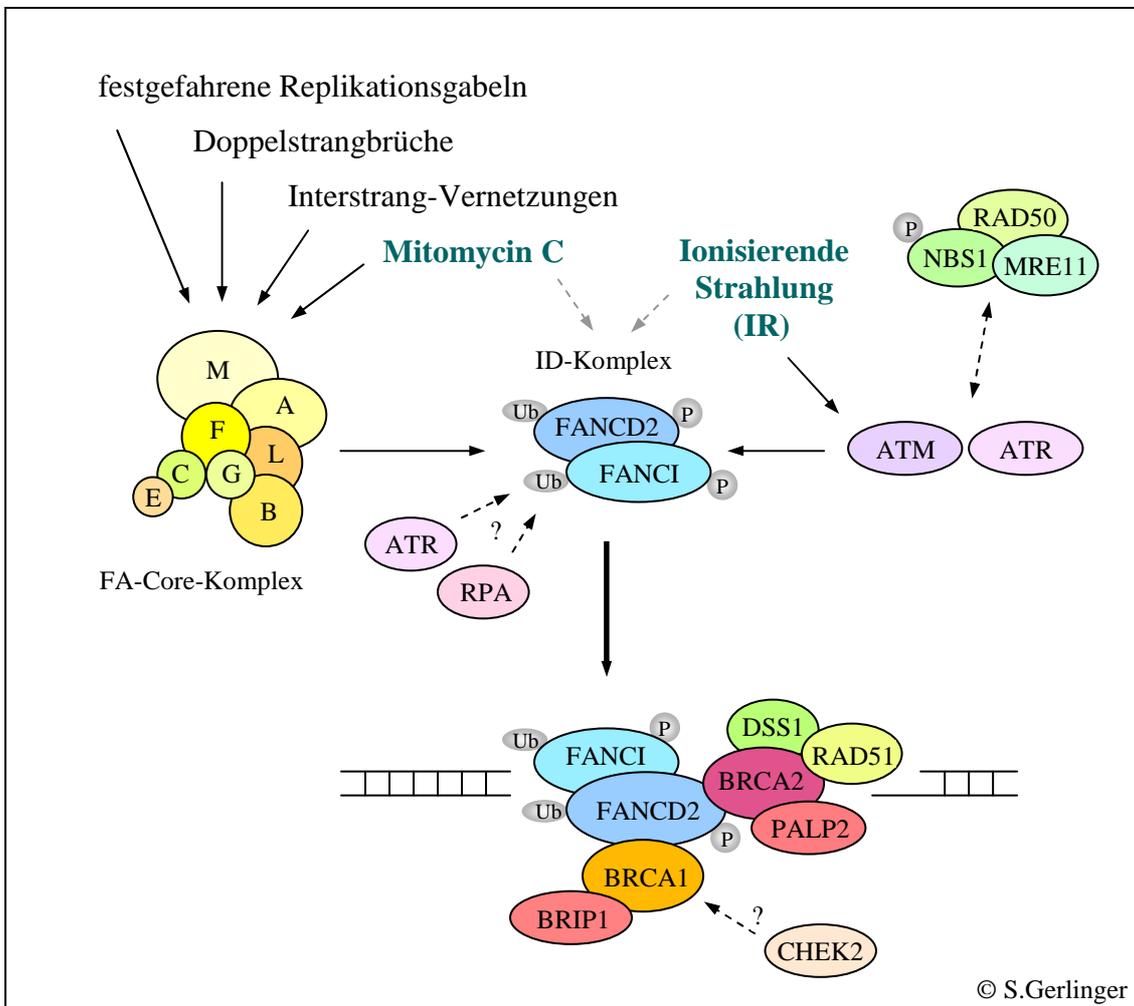


Abb.20: Schematische Darstellung des FA-Signalwegs nach Schädigung der DNA. Biallele Mutationen in den FA-Genen führen zum Phänotyp der FA. Monoallele Mutationen in NBS1, CHEK2, BRCA1 und in den FA-Genen der Gruppe III (BRCA2, BRIP1 und PALP2) prädisponieren zu einem erhöhten Risiko für familiären Brustkrebs. Der FA-Core-Komplex ubiquitiniert und aktiviert die Komponenten des ID-Komplexes. Eine Monoubiquitinierung von FANCD2 erfordert ATR und RPA. Der durch ATM und ATR phosphorylierte ID-Komplex transloziert zur beschädigten DNA und leitet zusammen mit weiteren DNA-Reparaturproteinen die Reparatur der DNA via Homologer Rekombination ein (Garcia-Higuera et al., 2001; Andreassen et al., 2004; Hussain et al., 2004; Wang et al., 2004; Rahman und Scott, 2007).

Das Mutationsspektrum von FANCD2 wird dominiert von „splicing“-Mutationen. Deletionen, Insertionen oder „nonsense“-Mutationen sind wesentlich seltener

beschrieben. In biallelen Trägern treten sie in Kombination mit einer „splicing“- oder einer, ebenfalls seltenen, „missense“-Mutation auf (Kalb et al., 2007).

Die unterschiedlichen genetischen Veränderungen sind teilweise populationsassoziiert. Beispielsweise ist die „splicing“-Mutation 1948-16T→G (IVS21-16 T→G) häufig in der türkischen Bevölkerungsgruppe nachweisbar und die 1948-6C→A (IVS21-6 C→A) ist deutsch und deutschstämmiger Abstammung. Allerdings führen beide zu demselben veränderten Protein E650X (Kalb et al., 2007).

FANCI ist ebenso eine wichtige Komponente in der DNA-Reparatur via Homologer Rekombination. FANCI besitzt eine zu FANCD2 homologe konservierte Region von 151 AS. Unter Beteiligung des FA-Core-Komplexes wird es, wie FANCD2, an einem Lysin (T523) monoubiquitiniert. Auch FANCI-Ub ist überwiegend chromatinassoziiert zu finden. Das Protein kooperiert mit FANCD2 in Form eines Proteinkomplexes, dem ID-Komplex. Die 2 Paraloge sind auch untereinander für die jeweilige Monoubiquitinierung des Bindungspartner verantwortlich. Ist eines der beiden Proteine defekt, wird das zweite Protein nicht ubiquitiniert (Smogorzewska et al., 2007; Wang, 2007). Das Deubiquitinierungsprotein ist wiederum USP1 (Nijman et al., 2005). Beide Proteine können durch ATM und ATR phosphoryliert werden. FANCD2 wird nach IR-Disposition von ATM am Serin 222 phosphoryliert. FANCI besitzt 3 Phosphorylierungsstellen, an AS Position S730, T952 und S1121 (Taniguchi et al., 2002; Smogorzewska et al., 2007).

#### **2.2.4.4. FA-Gene der Gruppe III**

Die Reparaturgene FANCD1, FANCI und FANCN sind der Gruppe III zugehörig (siehe Abb.21). Diese sind entweder der zweiten Gruppe nachgeschaltet oder sie agieren parallel.

FANCD1 ist mit BRCA2 identisch. FANCD1 ist weder eine Komponente des FA-Core-Komplexes, noch bei der Ubiquitinierung und DNA-Fokussierung von FANCD2 beteiligt (Howlett et al., 2002). BRCA2 bildet mit FANCN, RAD51, BRCA1 und BARD1 stabile Komplexe (Wang, 2007).

Die Hauptfunktion von BRCA2 ist, wie bereits beschrieben, die Regulation der Homologen Rekombination durch Kontrolle von RAD51 (Davies et al., 2001). Seine BRC-Domänen binden direkt RAD51, das mit ssDNA das Nukleoproteinfilament formiert, um homologe Sequenzen zu detektieren. Die C-terminale Region bindet RAD51 ebenfalls. Nach einem DNA-Doppelstrangbruch bewegt sich BRCA2 an den Knotenpunkt ssDNA-dsDNA der DNA-Enden und unterstützt das kontrollierte „Aufbocken“ von RAD51 auf die DNA (Wilson und Elledge, 2002). Stabilisiert wird BRCA2 dabei durch DSS1 (Li et al., 2006). Für die Relokation von BRCA2 an die Stelle des DNA-Schadens ist BRCA1 erforderlich (Greenberg et al., 2006).

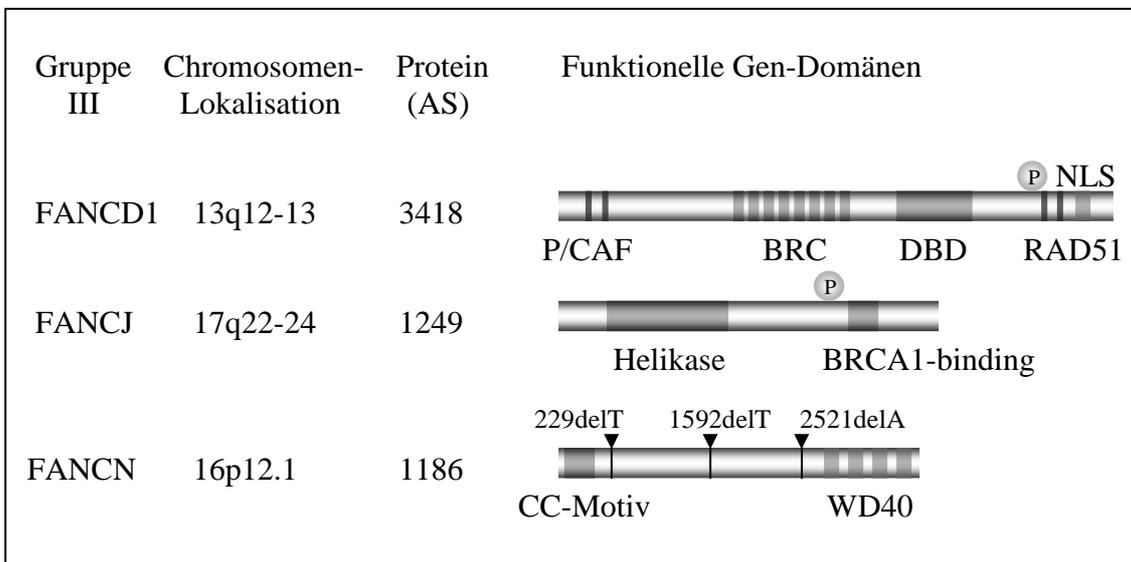


Abb.21: Für die DNA-Reparatur wichtige funktionelle Domänen in den FA-Genen der Gruppe III. Die eingezeichneten Beispiele von Keimbahnmutationen in FANCN führen zu trunkeerten PALB2-Proteinen. BRC (hochkonservierte Bindungsregion für RAD51), CC (coiled-coil-Motiv, Protein-Protein-Bindungs-Motiv), DBD (DNA/DSS1-binding-Domäne), NLS (nuclear localization-Signal), P/CAF (p300/CBP-associated-Faktor), WD40 (Protein-Bindungs-Motiv aus Trp-Asp-Wiederholungssequenzen) (Daten aus Wood et al., 2005; modifiziert nach Wang, 2007).

FANCN ist mit PALB2 identisch. PALB2 ist der Bindungspartner von BRCA2. Es stabilisiert das Protein und wirkt bei dessen Beförderung in den Zellkern mit. Es wird für die normale Homologe Rekombination, sowie für die Reparatur von Doppelstrangbrüchen benötigt (Xia et al., 2006). Das Protein besitzt 4 WD40-Domänen. Eine Inaktivierung des Proteins führt zur Destabilisierung und zur Delokalisation von

BRCA2 und einer ungenügenden DNA-Reparatur (Xia et al., 2006; Tischkowitz et al., 2007).

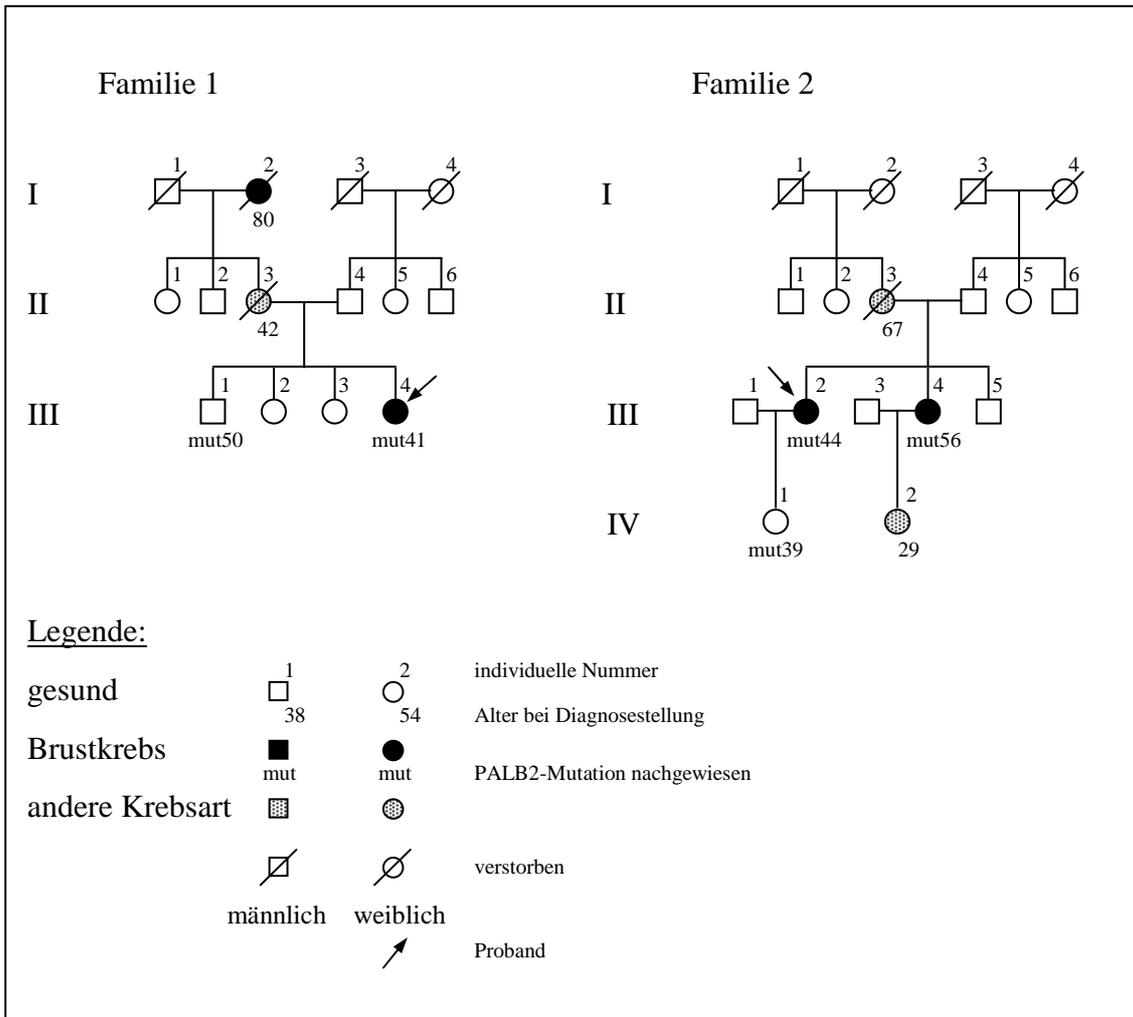


Abb.22: Stammbäume von 2 verschiedenen europäischen Brustkrebsfamilien mit der trunkierenden PALB2-Mutation 1592delT über mehrere Generationen (modifiziert nach Erkko et al., 2007).

Eine europäische Keimbahnmutation in PALB2, die für familiären Brustkrebs disponiert, ist die Frameshift-Mutation 1592delT (siehe Abb.21). Sie ist in Exon 4 gelegen und kodiert für ein trunkiertes, jedoch stabiles Protein mit reduzierter Bindungsaffinität zu BRCA2. Daraus resultiert eine defiziente Homologe Rekombination und DNA-Reparatur (Erkko et al., 2007). Abbildung 22 zeigt die Stammbäume zweier betroffener Brustkrebsfamilien. In Familien mit der PALB2-Mutation 1592delT werden auch andere Krebsformen wie Kolorektale- oder Prostata-Karzinome, Lungen- oder Magenkrebs und Leukämie gefunden. Heterozygote

Trägerinnen dieser finnischen Founder-Mutation besitzen ein 4-fach höheres Risiko für familiären Brustkrebs als Nichtträgerinnen (Erkko et al., 2007).

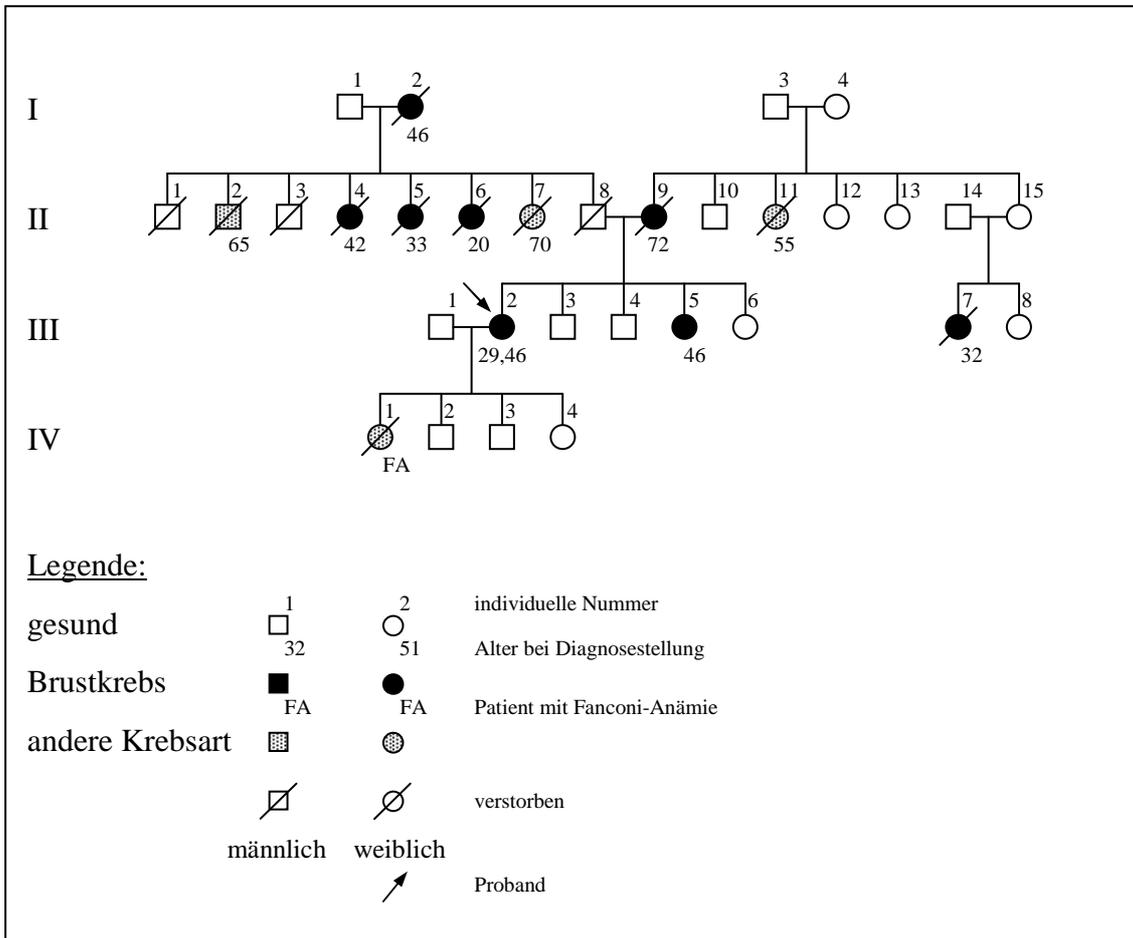


Abb.23: Stammbaum einer FA-Familie über 4 Generationen mit der trunkierenden PALB2-Mutation 2521delA (modifiziert nach Tischkowitz et al., 2007). Die DNA der bereits verstorbenen FA-Patientin IV1 wurde nicht auf die Mutation 2521delA hin untersucht, ihre Eltern sind jedoch Träger der trunkierenden PALB2-Mutationen 2521delA und 3323delA. Ihre Mutter, Individuum III2 mit strenger Brustkrebs-Historie, entwickelte Mammakarzinome im Alter von 29 und 46 Jahren (Reid et al., 2007).

Die englische Arbeitsgruppe um S. Reid identifizierte 2007 in FA-Familien weitere Keimbahnmutationen in PALB2. 2521delA ist eine Mutation in einer FA-Familie mit einem ausgesprochen großen Anteil an jungen Frauen mit Brustkrebs (siehe Abb.23). Das Genprodukt von 2521delA ist ebenfalls ein trunkiertes Protein mit erhaltener Bindungsaffinität zu BRCA2 (Reid et al., 2007; Tischkowitz et al., 2007).

In einer schottischen Brustkrebsfamilie ist eine andere Frameshift-Mutation in PALB2 nachweisbar (siehe Abb.21). Die 229delT generiert ein frühes Stoppcodon und führt zu

einem außerordentlich stark trunkierten Protein mit ebenfalls erhaltener Bindungsfähigkeit zu BRCA2 (Tischkowitz et al., 2007).

FANCI ist identisch mit BACH1 (BRCA1-associated C-terminal-Helikase) und BRIP1 (BRCA-interacting-Protein 1). BRIP1 ist eine 5'→3'-Helikase der DEAH-Familie und eine DNA-abhängige ATPase (Cantor et al., 2004).

Sie agiert komplexassoziiert mit BRCA1, BARD1, TOPBP1 (topoisomerase II binding protein 1), RAP80 oder MLH1 (mutL-Homolog 1) und PMS1 (postmeiotic segregation increased 1) (Sobhian et al., 2007; Wang, 2007). Sie tritt in direkte Wechselwirkung mit der BRCT-Domäne von BRCA1 und unterstützt dessen Funktion in der DNA-Reparatur und der Zellzykluskontrolle (Cantor et al., 2004). Deletionen in der BRCT-Domäne führen auch zu einer Relokalisation von BRCA1 aus dem Nukleus in das Zytoplasma (Rodriguez et al., 2004). Die aus einer Unterbrechung der Interaktion zwischen beiden Proteinen resultierenden Defekte in der DNA-Reparatur führen zu Brust- und Ovarialkrebs (Cantor et al., 2004).

Die Interaktion von BRIP1 mit BRCA1 ist abhängig vom Phosphorylierungsstatus der Helikase am Serin 990 (Yu et al., 2003). Die spezifische Wechselwirkung zwischen den Proteinen wird über den Zellzyklus reguliert. Nach einer DNA-Schädigung wirkt BRIP1 an der Kontrolle des G2/M-Übertritts mit (Yu et al., 2003). Ihre DNA-abhängige ATPase-Aktivität dient der G1/S-Transition. Sie ist in der G1-Phase wenig aktiv und in der S-Phase stark erhöht (Kumaraswamy und Shiekhattar, 2007).

Die Mehrzahl der bislang beschriebenen „missense“-Mutationen in BRIP1 sind nicht mit einem erhöhten Brustkrebsrisiko assoziiert. Trunkierende Keimbahnmutationen jedoch prädisponieren insgesamt für ein Relatives Risiko von 2,0. Für Trägerinnen unter 50 Jahren erhöht sich das Risiko sogar auf 3,5 (Seal et al., 2006).

Eine der am häufigsten in Familien mit Brustkrebs und in FA-Familien nachweisbaren trunkierenden BRIP1-Mutationen ist 2392C→T. Die Mutationsfrequenz dieser Alteration beträgt 0,4% im Vergleich zur Kontrollpopulation mit 0,05% (berechneter RR=8,6). Abbildung 24 zeigt die Stammbäume dreier Brustkrebsfamilien mit Keimbahnmutationen in BRIP1 über mehrere Generationen (Seal et al., 2006).

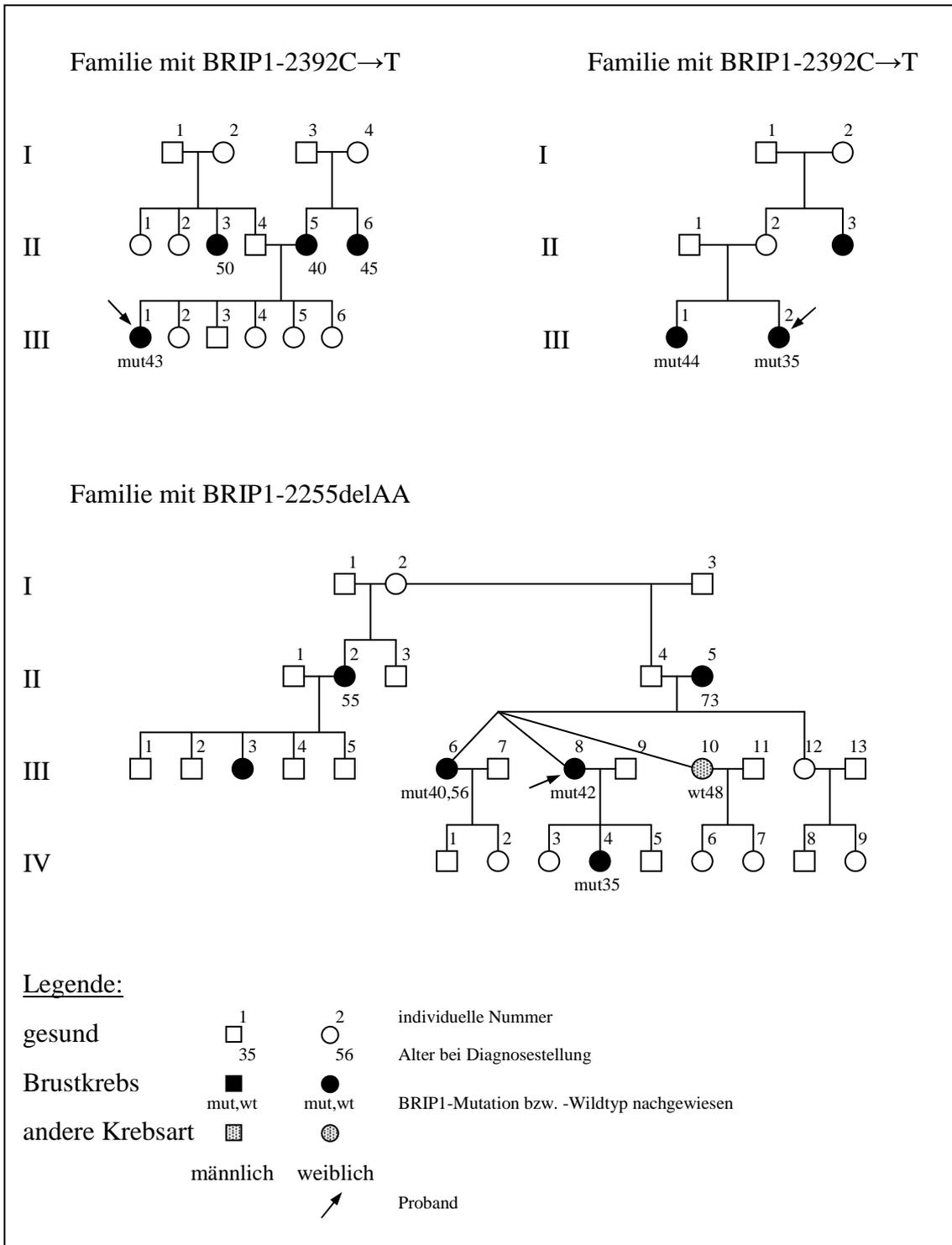


Abb.24: Stammbäume von 3 verschiedenen Brustkrebsfamilien mit den trunkierenden BRIP1-Mutationen 2392C→T und 2255delAA. Beide Mutationen sind auch in FA-Patienten nachweisbar. Individuum III6 der Familie mit BRIP1-2255delAA entwickelte bilateralen Brustkrebs im Alter von 40 und 56 Jahren und BRIP1-Wildtypträgerin III10 erkrankte an DCIS (Duktales Carzinoma in situ) (modifiziert nach Seal et al., 2006).

### **2.2.5. Polymorphismen**

Ein genetischer Polymorphismus liegt vor, wenn das seltenere der beiden Allele mit einer Häufigkeit von über 1% vorkommt. Sie sind weit verbreitet, und in vielen DNA-Reparaturgenen lassen sich Polymorphismen nachweisen. Die meisten davon sind singulär nicht krankheitsverursachend. Eine große Anzahl von Allelen, die, jede für sich genommen, sehr geringe Auswirkungen hervorrufen, können sich aufsummieren. Segregationsanalysen unterstützen dieses polygenetische Modell, in dem viele Polymorphismen in DNA-Reparaturgenen mit niedriger Penetranz für familiären Brustkrebs prädisponieren (Antoniou et al., 2000, 2001; Smith et al., 2006).

Zahlreiche Untersuchungen in Fallkontrollstudien widerlegen eine statistisch signifikante Assoziation dieser Polymorphismen mit der Entstehung von familiären als auch von sporadischen Mammakarzinomen (Goode et al., 2002; Baynes et al., 2007; Frank et al., 2007). Aktuelle Untersuchungen jedoch belegen für einen kleineren Anteil das Gegenteil. Tabelle 3 zeigt eine Auswahl relevanter „single nucleotide“-Polymorphismen (SNP) in den DNA-Reparaturgenen, die das Risiko für Brustkrebs statistisch signifikant oder tendenziell modifizieren.

Für Polymorphismen in den Genen BRCA1, ATM, TP53, CHEK2, NBS1 und PALP2 sowie BRIP1 aus der FA-Gruppe III war bislang weder ein signifikant erhöhtes noch reduziertes Risiko für Mammakarzinome auffallend (Goode et al., 2002; Sigurdson et al., 2004; Baynes et al., 2007; Frank et al., 2007; Rahman et al., 2007). Für einen CHEK2-Polymorphismus aus einer Fallkontrollstudie von Han et al. (2008) wurde ein grenzwertiger Signifikanzbereich erreicht (siehe Tab.3). 2 BRIP1-Polymorphismen konnten mit einem veränderten Ovarialkarzinomrisiko in Verbindung gebracht werden (Song et al., 2007). In einer deutschen Kohortenstudie von Frank et al. (2007) wurden 571 Individuen von Familien mit Brustkrebs auf die BRIP1-Polymorphismen -64G>A und Pro919Ser untersucht. Hier wurden keine signifikanten Unterschiede zur Kontrollpopulation gefunden. Barroso et al. (2006) wiesen einen FANCD2-SNP in sporadischem Brustkrebs nach.

Diese Polymorphismen sind in den verschiedensten Mechanismen der DNA-Reparatur zu finden. Auffällig ist eine Häufung in den Strategiewegen der HR, NER oder der FA, deren Störungen bevorzugt zur Entstehung von Brustkrebs beitragen.

## Ergebnis

Tab.3: Genotypisches Risikoprofil für familiäre Brust- und Ovarialkarzinome und den Frequenzen wichtiger Polymorphismen in den DNA-Reparaturgenen.

↓↑ : Brustkrebsrisiko erniedrigt bzw. erhöht, ↑ : assoziiert mit einem veränderten Brustkrebsrisiko, n.nwb. (nicht nachweisbar), RR=Relatives Risiko, OD=Odds-Ratio, CI=Confidenz-Intervall 95%, \* Signifikanz-Level (P-Werte) studienabhängig. SNP-Referenznummern aus [www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/). (Daten aus Kuschel et al., 2002; Smith et al., 2003; Sigurdson et al., 2004; Millikan et al., 2005; Barroso et al., 2006; Baynes et al., 2007; Rahman et al., 2007; Song et al., 2007; Han et al., 2008).

Genlocus Polymorphismus	Betroffener Reparatur- mechanismus	Risiko für Brust- und Ovarialkrebs	Wildtyp	Mutation heterozygot		Mutation homozygot	
			homozygot Frequenz %	Frequenz %	OD/RR	Frequenz %	OD/RR
BRCA1	HR	n.nwb.					
ATM	AT	n.nwb.					
TP53	Li-Fraumeni	n.nwb.					
NBS1	HR	n.nwb.					
PALP2	FA	n.nwb.					
Statistisch signifikant*							
BRCA2 N372H rs144848	HR/FA	Brustkrebs ↓ (p<0,001)	54	37	RR=0,2 CI [0,1-0,5]	9	
XRCC3 IVS5 17893 rs1799796 A>G	HR	Brustkrebs ↓↓ (p=0,008)	48	43	OD=0,8 CI [0,7-0,9]	9	OD=0,8 CI [0,6-1,0]
XRCC3 T241M 18067 rs861539 C>T	HR	Brustkrebs ↑↑ (p=0,015)	37	49	OD=1,1 CI [1,0-1,3]	15	OD=1,3 CI [1,1-1,6]
XRCC3 rs1606 C>T	HR	Brustkrebs ↑ (p=0,006)	54	40		6	
XRCC3 rs2273175 A>G	HR	Brustkrebs ↑ (p=0,007)	54	40		7	
XPF rs11648736 A>G	NER	Brustkrebs ↑ (p=0,005)	53	37		9	
XPF rs4781560 C>T	NER	Brustkrebs ↑ (p=0,006)	61	34		6	
APEX1 D148E rs1130409	BER	Brustkrebs ↓ (p<0,001)	29	52	RR=0,2 CI [0,1-0,5]	19	
FANCD2 L1366L rs2272125 A>C	FA	Brustkrebs (sporadisch) ↑↑ (p=0,005)	75	23	OD=1,3 CI [1,0-1,6]	2	OD=2,8 CI [1,1-7,1]
Trend*							
CHEK2 rs10854805 C>T	Li-Fraumeni	Brustkrebs ↓ (p=0,01)	68	29		3	
BRIP1 rs2191249 A>C	FA	Ovarialkrebs ↓↓ (p=0,045)			OD=0,9 CI [0,8-1,1]		OD=0,8 CI [0,6-1,0]
BRIP1 rs4988344 C>G	FA	Ovarialkrebs ↑↑ (p=0,02)			OD=1,1 CI [1,0-1,3]		OD=1,5 CI [1,0-2,2]
XRCC2 R188H 31479 rs3218536 G>A	HR	Brustkrebs ↓↑ (p=0,07)	85	14	OD=0,9 CI [0,8-1,1]	1	OD=2,6 CI [1,0-6,7]
LIG4 D501D 1977 rs1805386 T>C	NHEJ	Brustkrebs ↓↓ (p=0,09)	73	26	OD=0,9 CI [0,8-1,1]	2	OD=0,7 CI [0,4-1,0]

© S.Gerlinger

---

## 3. Diskussion

### 3.1. Modell eines DNA-Reparatur-Netzwerkes zur Brusttumorgenese

Es existiert ein kausaler Zusammenhang zwischen der Rolle von BRCA1 und BRCA2 in der DNA-Reparatur und der Entwicklung von familiärem Brustkrebs durch Mutationen in diesen Hochrisikogenen (Schultz und Weber, 1999). BRCA1 übernimmt zahlreiche Funktionen innerhalb verschiedener DNA-Reparaturwege, BRCA2 besitzt eine zentrale Funktion im FA-Signalweg. Die beiden Gene prädisponieren für ein 10- bis 20-fach erhöhtes familiäres Brustkrebsrisiko. BRIP1 und PALB2 der Gruppe III des FA-Signalwegs sind für ein 2- bis 3-faches Risiko verantwortlich. TP53 (10- bis 20-fach) ist der Wächter des Genoms und koordiniert die DNA-Reparatur mit der Zellproliferation und ATM (RR=2) ist eine Kinase mit Schlüsselstellung in der Rekombinations-Reparatur. NBS1 (RR bis zu 3-fach) ist Teil des MRN-Komplexes, dessen führende Rolle das Erkennen von DNA-Schäden ist. CHEK2 (RR 3- bis 12-fach) trägt zur Stabilisierung der genomischen Integrität bei, indem es die verschiedenen Alarmsignale überträgt.

In Familien mit hereditären Brustkrebssyndromen und Brustkrebs-assoziierten hereditären Krebsyndromen ist ein vermehrtes Brusttumorwachstum ein gemeinsames Merkmal all dieser Komponenten. Folgendes in dieser Arbeit konzipierte Modell versucht, diese Teile auf zellulärer Ebene miteinander zu verknüpfen (siehe Abb.25).

Biallele Mutationsträger von BRCA2 zeigen den Phänotyp der Fanconi-Anämie FA-D1, BRIP1 den der FA-J und PALB2 den der FA-N. ATM prädisponiert in bialleler Form für Ataxia teleangiectatica und NBS1 für das Nijmegen-Breakage-Syndrom. Interessanterweise sind für biallele Mutationen in den Genen BRCA1 und CHEK2 bislang noch keine spezifischen Phänotypen bekannt. Aufgrund der zentralen Stellung von BRCA1 könnten biallele Veränderungen bereits im Embryonenstadium letal sein. Für CHEK2-1100delC ist bislang nur ein noch lebender homozygoter Träger bekannt. Dieser entwickelte mit 52 Jahren ein familiäres Kolonkarzinom (van Puijenbroek et al., 2005). Träger von Mutationen in ATM und in FA-Genen erreichen normalerweise kein hohes Alter. Dies erschwert eine Untersuchung zur Brusttumorgenese, da die Patienten bereits verstorben sind, bevor sich die Tumore entwickeln könnten, und sorgt für eine hohe Dunkelziffer. Vielleicht ist dies der Grund, weshalb es für die Gene CHEK2 und

ATM Untersuchungen gibt, die ein weit höheres Brustkrebsrisiko (bis zu 12-fach und 15-fach) in Erwägung ziehen, als es die meisten anderen Veröffentlichungen zeigen (Chenevix-Trench et al., 2002; Johnson et al., 2005).

Neben den zellulären Unterschieden ließe sich, durch die Schlüsselposition von BRCA1, ebenso die verschiedenen Morphologien und das unterschiedliche „Grading“ der BRCA1-Tumore heterozygoter Trägerinnen, der BRCA2-Tumore und der BRCA1/2-negativen Tumore erklären.

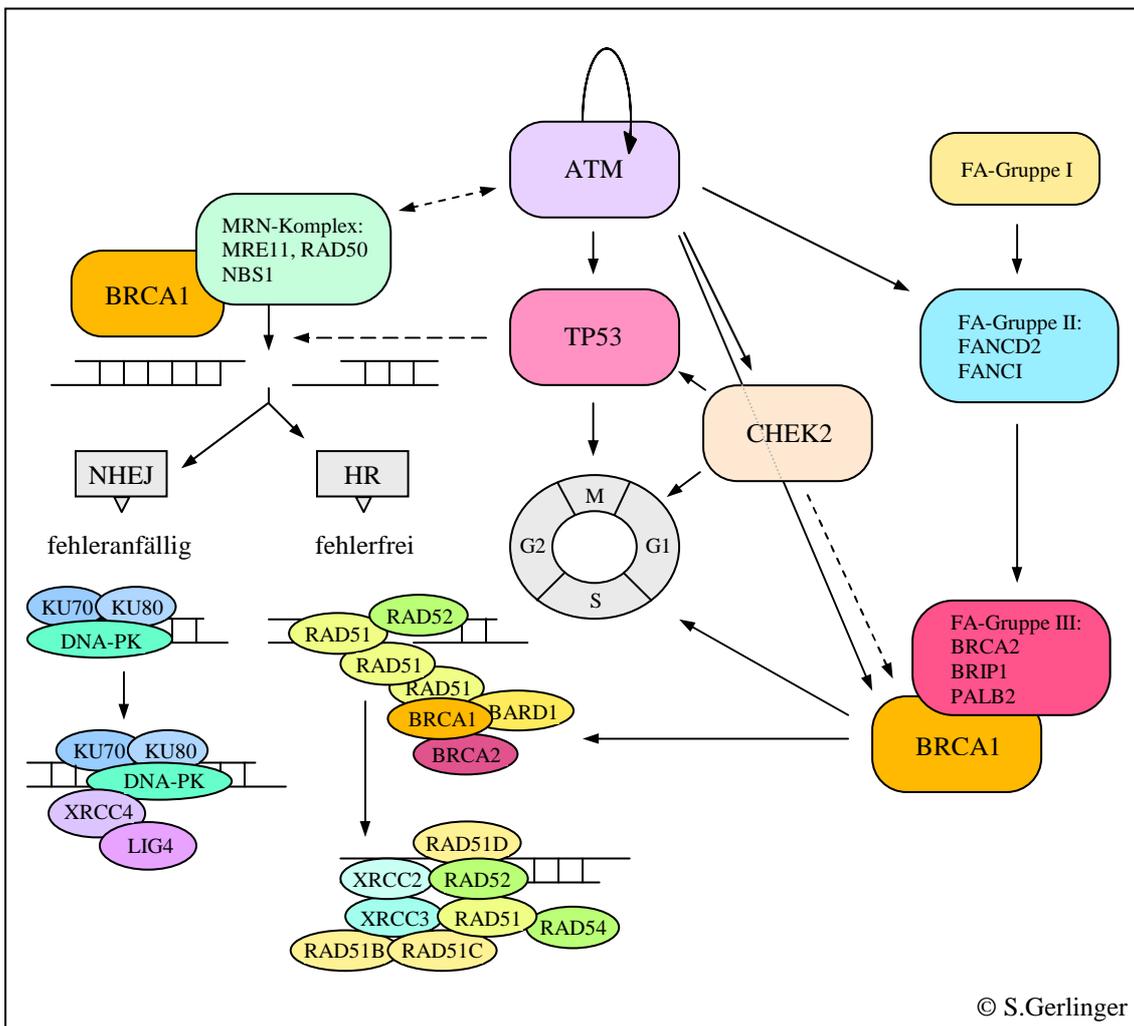


Abb.25: Vereinfachtes Modell eines möglichen DNA-Reparaturnetzwerkes für die Brusttumorgenese durch DNA-Schäden wie Doppelstrangbrüche und arretierte Replikationsgabeln. Dargestellt ist das Zusammenspiel zentraler DNA-Reparaturgene mehrerer Reparatur- und Signalwege, die in monoalleler Form für familiären Brustkrebs prädisponieren. Weisen sie biallele Defekte auf, führen sie zu voneinander unabhängigen hereditären Brustkrebsyndromen oder zu Brustkrebs-assoziierten hereditären Krebsyndromen.

### **3.2. Mutationen der DNA-Reparaturgene und der Einfluss von Polymorphismen**

TP53 prädisponiert für das Li-Fraumeni-Syndrom. Charakteristisch dafür ist nicht das Auftreten einer bestimmten Malignität, sondern die Ausbildung multipler Tumore. Mutationen in TP53 erhöhen also die Erkrankungshäufigkeit generell. Auffallend ist dabei der geringe Anteil an sporadischen Brusttumoren (25%), der sich für betroffene BRCA1-Mutationsträgerinnen jedoch deutlich erhöht (60%) (Schultz und Weber, 1999). Dies zeigt, dass TP53 ein zentrales TSG auch in der erblich bedingten Brusttumorgenese ist.

Für TSG sind trunkierende Mutationsereignisse typisch. Interessanterweise sind die für TP53 führenden genetischen Veränderungen Missense-Mutationen, ohne ein Stopp-Kodon zu generieren. Die Konsequenzen aus proteintrunkierenden Nullmutationen wären ein LOF, respektive GOF, durch Ausfall des gekürzten Alles. Sie sind häufig bei monogenen Erkrankungen zu finden und die Mutationsfrequenzen sind dabei extrem selten. Durch Missense-Mutationen in einem Allel entstehen jedoch defekte Proteine mit veränderten Eigenschaften, wie eine veränderte Bindungsaffinität und veränderter Funktion. Neben einer verminderten Proteinkonzentration ohne Effekt, sind die defekten Proteine jedoch in der Lage, die Funktionsfähigkeit des noch intakten Proteins des zweiten Allels aufzuheben oder zu modifizieren. Dieser dominant negative Effekt könnte die Heterozygotenfrequenz verschiedener Populationen nicht unerheblich modulieren. Das Auftreten seltener bis häufiger Sequenzvarianten ist bevorzugt in multifaktoriellen Erkrankungen zu beobachten.

Normvarianten wirken auf die Funktionen von Proteinen ein und verändern das relative Risiko innerhalb des Genpools. Im Rahmen polygener Erkrankungen besteht eine umgekehrte Korrelation zwischen der Stärke des Einflusses auf den Phänotyp und der Häufigkeit der DNA-Veränderung innerhalb einer Population. Wenige Veränderungen beispielsweise in BRCA1 und BRCA2 besitzen einen großen Einfluss auf die Entwicklung familiärer Mammakarzinome. Veränderungen von geringer Qualität müssen eine hohe Anzahl an Polymorphismen darbieten.

Die Auswirkungen zweier BRIP1-Varianten auf die Entstehung familiären Brustkrebses wurde von einer deutschen Arbeitsgruppe um B. Frank 2007 untersucht. Der Austausch einer AS an Position 64 (BRIP1-64G>A) führt zur Formation eines GATA- oder

CCAAT-Motivs als Hinweis auf eine mögliche Modifikation der Genexpression. BRIP1-Pro919Ser ist in der BRCA1-Bindungs-Region gelegen und könnte zu einer veränderten Proteinstruktur und -funktion führen (Frank et al., 2007). In der amerikanischen Population kumuliert sich das Brustkrebsrisiko für 50-jährige Frauen mit BRIP1-P919S, die heterozygot (PS) sind oder homozygote Träger der seltenen SS-Allele (S=Serin) sind, im Vergleich zu den generell homozygoten PP-Trägerinnen (P=Prolin), auf das 4,5- bis 6,9-fache. Demgegenüber macht sich in Deutschland BRIP1-P919S nicht negativ bemerkbar. Zwar halten die Daten einer Signifikanz nicht stand, jedoch liefern sie Hinweise auf eine additive Wirkung dieser Mutation.

Auf der anderen Seite vermögen die Varianten BRCA2-N372H und APEX1-D148E, im Vergleich zu den Homozygoten beider Allele, das Heterozygotenrisiko zu reduzieren und üben sogar einen dominant protektiven Effekt aus.

Diese Art der Modifikationen durch Polymorphismen werden für Mammakarzinome und auch für Ovarialkarzinome beobachtet. Sie könnten einen nicht unwesentlichen Anteil an der Erhöhung des Brustkrebsrisikos für betroffene Familien mit Brustkrebs und brustkrebsassoziierten Krebsyndromen darstellen.

### **3.3. Weitere DNA-Reparaturgene mit Risikopotential für Brustkrebs**

Obwohl weder die molekulargenetischen Grundlagen noch die biochemischen Abläufe zur Entstehung von familiärem Brustkrebs hinreichend bekannt sind, so kann man doch die hier beschriebenen zentralen DNA-Reparaturgene als Risikofaktoren etablieren. Der große Prozentsatz noch unbekannter Einflüsse auf die Brusttumorgenese lässt sich jedoch allein durch den Einfluss dieser Gene nicht erklären. Die Basis scheint hierfür ein polygenetisches Geschehen auf der Grundlage additiver Effekte von Hochrisikogenen und weiteren Genen zu sein, die isoliert betrachtet für nur einen geringen Prozentsatz oder überhaupt nicht für Brustkrebs prädisponieren.

Es zeichnet sich ab, dass nicht nur die Rekombinations-Reparatur, sondern weitere Reparaturmechanismen immer wichtiger werden. Weniger zentral agierende Proteine wie Sensoren und Effektoren oder akzessorische Proteine werden als mögliche Kandidaten zunehmend interessanter. Tabelle 4 beschreibt verschiedene DNA-Reparaturgene und die zugehörigen Reparaturmechanismen, deren Genprodukte zur Modulation des familiären Brustkrebsrisikos beitragen könnten.

Tab.4: DNA-Reparaturgene mit einem möglichen Einfluss auf die Entstehung von familiärem Brustkrebs. BER=Basenexzisionsreparatur, HR=Homologe Rekombination, MMR=Mismatch-Reparatur, NER=Nukleotidexzisionsreparatur, NHEJ=Nicht-Homologe-End-zu-End-Verknüpfung, OCDDR=other conserved DNA damage response-Gene, RKR=Rekombinations-Reparatur, SDDA=sensitivity to DNA damaging agents, (klassifiziert unter [www.cgal.icnet.uk/DNA\\_Repair\\_Genes.html](http://www.cgal.icnet.uk/DNA_Repair_Genes.html), 2008).

Gen	Chromosom	Funktion/Aufgabe Brustkrebs	Reparaturweg	Referenz
RAD50	5q23.3	ATPase im MRN-Komplex (MRE11/RAD50/NBS1)	HR (RKR)	Heikkinen et al., 2003 Walsh und King, 2007
MRE11	11q21	3'-Exonuklease	HR (RKR)	Heikkinen et al., 2003
RAD51	15q15.1	ATPase, Homologenpaarung	HR (RKR)	Kato et al., 2000 Teng et al., 2008
DSS1	7q21.3	Assoziiert mit BRCA2	HR (RKR)	Gudmundsdottir et al., 2004
XRCC3	14q32.33	Reparatur von DNA-Brüchen und -crosslinks	HR (RKR)	Smith et al., 2003
KU70 (G22P1)	22q13.2	Bindung von DNA-Enden	NHEJ (RKR)	Fu et al., 2003
LIG4	13q33.3	Ligase	NHEJ (RKR)	Kuschel et al., 2002
XRCC4	5q14.2	Ligase-akzessorischer Faktor	NHEJ (RKR)	Fu et al., 2003
CHEK1	11q24.2	Effektor-Kinase für ATR	OCDDR	Zhou und Elledge, 2000
ATR	3q23	ATM-und PI-3K-Kinase, phosphoryliert FA- Core-Komplex und ID-Komplex	OCDDR	Tibbetts et al., 2000 Zhou und Elledge, 2000
RAD9	11q13.2	PCNA-ähnlicher DNA-Schadens-Sensor	OCDDR	Zhou und Elledge, 2000
WRN	8p12	Werner-Syndrom-Helikase, 3'-Exonuklease	SDDA	Wirtenberg et al., 2006
BLM	15q26.1	Bloom-Syndrom-Helikase, Stabilisierung und Neustart von Replikationsgabeln	SDDA	Zhou und Elledge, 2000 Zhang und Powell, 2005
XRCC1	19q13.31	Ligase-akzessorischer Faktor	BER	Smith et al., 2003 Sigurdson et al., 2004
APEX	14q11.2	Apurinische/apyrimidinische-Endonuklease	BER	Sigurdson et al., 2004
DDB2 (p48)	11p11.2	DNA-Bindung	NER	Ford, 2005
XPF (ERCC4)	16p13.12	5'-Inzision-Untereinheit	NER	Smith et al., 2003
MLH1	3p23.3	ATPase, assoziiert mit BRCA1, BRIP1, BLM	MMR	Zhou und Elledge, 2000
MSH2	2p21	Detektion Mismatch und Loop	MMR	Zhou und Elledge, 2000
γH2AX	(H2AX 11q23.3)	Nach DNA-Schädigung phosphorylierte Histon-H2AX-Variante	Chromatinstruktur	Zhang und Powell, 2005 Cahill et al., 2006
RRM2B (p53R2)	8q22.3	p53-induzierbare kleine Untereinheit 2 Homolog Ribonukleotid-Reduktase	Modulation des Nukleoid-Pools	Tanaka et al., 2000

© S.Gerlinger

Etliche Gene, die nicht von Wood et al. 2005 (aktualisiert im Februar 2008 unter [www.cgal.icnet.uk/DNA\\_Repair\\_Genes.html](http://www.cgal.icnet.uk/DNA_Repair_Genes.html)) als DNA-Reparaturgene klassifiziert wurden, sind möglicherweise auch in die Entstehung von Brusttumoren involviert. Dafür spricht, dass ein relativ großer Anteil (5%) an den für familiären Brustkrebs prädisponierenden Risikogenen von Polymorphismen gebildet wird, die nicht den DNA-Reparaturgenen zugehörig sind (siehe Abb.3). TWIST1, CASP8, TGFB1, FGFR2, TOX3, MAP3K1, LSP1, um nur Einige zu nennen, besitzen das Potential von Risikogenen mit niedriger Penetranz (Szpirer und Szpirer, 2007). PTEN beispielsweise ist ein Gen, das für die Entstehung des Cowden-Syndroms verantwortlich ist, STK11 verursacht das Peutz-Jeghers-Syndrom. Betroffene Familienmitglieder dieser hereditären brustkrebsassoziierten Krebs syndrome haben ein bis zu 50% erhöhtes Lebenszeitrisiko für Brustkrebs. Die beiden Gene werden mit hoher Penetranz autosomal dominant vererbt. PTEN bedingt ein 2- bis 5-fach erhöhtes Risiko für Brusttumore und STK11 verursacht ein relatives Risiko von  $RR=15$  (Giardiello et al., 2000; Waite und Eng, 2002).

### **3.4. Populationsgenetik**

Für 4-10% aller Brustkrebsfälle kann eine hereditäre Ursache mit klarem monogenem Erbgang festgestellt werden. Etwa 20-25% der Fälle treten gehäuft familiär auf, d.h. es liegt eine genetische Prädisposition mit einem komplexen polygenen Vererbungsmodus vor. Eine klare Zuordnung kann in manchen Fällen schwer getroffen werden. Die Präsenz von Keimzellmosaiken, Antizipation oder genomisches Imprinting können die Vererbungsmodi modifizieren.

In 10-25% aller familiären Brustkrebsfälle sind genetische Veränderungen in den Hochrisikogenen BRCA1 und BRCA2 nachweisbar (Breast Cancer Linkage Consortium, 1998; Anglian breast cancer study group, 2000). Andere Autoren machen diese DNA-Reparaturgene für das Doppelte, für 30-40% der Fälle, oder mehr verantwortlich (Lux et al., 2006; Walsh und King, 2007). In der Literatur ist die Datenlage zu prozentualen Verteilungsmustern sehr uneinheitlich. Häufig sind es Schätzwerte oder die Studiendesigns sind nicht miteinander vergleichbar. Unterschiedliche Definitionen und Screening-Methoden erschweren zusätzlich die Resumes. Schätzungen über Familien mit einer großen Anzahl von Brustkrebsfällen

fallen oft zu hoch aus, während populationsgestützte Studien zu niedrige Werte erbringen. Viele frühere Brustkrebs-Studien fanden unter unselektierten Bedingungen statt, familiäre und nichtfamiliäre Brustkrebsfälle wurden vermischt. In diesen Studien muss man davon ausgehen, dass ein nicht unerheblicher Teil sporadischer Natur ist und eine Aussage über eine familiäre Ursache nur unter Vorbehalt zu treffen ist. Innerhalb familiär gehäufte Brustkrebsfälle waren manche Studiendesigns so angelegt, dass deren Charakteristika oft nicht weiter unterschieden werden konnten. So kommt es vor, dass die Mutationsraten von unselektionierten, prämenopausalen, familiären Brustkrebsfällen und familiären Brust- und Ovarialkarzinomfällen zwischen dem 5- und dem 20-fachen differieren (Arver et al., 2000).

Angesichts der Tatsache, dass ungefähr 80% der Frauen mit Ovarialkarzinomen BRCA1 positiv sind, werden Frauen mit familiär auftretenden Ovarialkarzinomen vermehrt in die Testungen miteinbezogen. Dadurch steigt die Zahl positiv detektierter BRCA1/2-Fälle an. Demgegenüber jedoch sind nur 15% BRCA2 positiv.

Zur besseren Vergleichbarkeit und um der Einschätzbarkeit für die Diagnostik und Therapie gerecht zu werden, definieren einige Studien ihre Rahmenbedingungen sinnvollerweise immer konkreter. Im Rahmen der Deutschen Multicenterstudie „Familiärer Brust- und Eierstockkrebs“ wurde folgende Klassifizierung für Risikofamilien vorgenommen (siehe Tab.5).

Tab.5: Risikoklassifikation für familiären Brust- und Eierstockkrebs.

Einteilung der 6 Kategorien basierend auf familiengeschichtlichem Hintergrund. Bilaterale Mammakarzinome werden als 2 unabhängige Fälle behandelt. Hochrisikoklassifikationen sind die Kategorien A1, A2 und B. Ein mittleres Malignomrisiko besteht für Betroffene aus der Kategorie C, D und E (modifiziert nach German Consortium for Hereditary Breast and Ovarian Cancer, 2002).

A1	Familien mit $\geq 2$ Mammakarzinomen und $\geq 2$ Fälle prämenopausal unter 50 Jahren
A2	Familien mit mindestens einem männlichen Betroffenen
B	Familien mit $\geq 1$ Mammakarzinom und $\geq 1$ Ovarialkarzinom
C	Familien mit $\geq 2$ Mammakarzinomen und $\geq 1$ Fall prämenopausal unter 50 Jahren
D	Familien mit $\geq 2$ Mammakarzinomen nach dem 50. Lebensjahr
E	1 Mammakarzinom vor dem 35. Lebensjahr

Das Risiko für BRCA1/2-Trägerinnen wird durch zusätzliche genetische Faktoren modifiziert (Antoniou und Easton, 2006). In den letzten Jahren wurden weitere DNA-Reparaturgene wie TP53, ATM, CHEK2, NBS1 und die FA-Gene nachgewiesen, die das Brustkrebsrisiko erhöhen. Trotzdem ist die Ursache von mehr als 60% aller familiär gehäuften Mammakarzinome noch unklar. Neben modulierenden genetischen Effekten, ist in verschiedenen Populationen der Einfluss von Umgebungsfaktoren, die innerhalb betroffener Familien geklustert auftreten können, für ein erhöhtes Risiko relevant.

Epidemiologische Studien identifizierten eine große Zahl brustkrebsinduzierender Faktoren mit unterschiedlichem Risikoprofil (siehe Tab.6).

Tab.6: Allgemeine und genetisch assoziierte Risikofaktoren für Brustkrebs.

(Daten aus Dupont und Page, 1985; Byrne et al., 1995; Chen et al., 1999; Arver et al., 2000; Vacek und Geller, 2004; Hartmann et al., 2005).

Risikofaktor	Relatives Risiko [-fach]
Gegenwärtige Ernährung und Alkoholkonsum	1,5-3,0
Kontrazeption	1,5-3,0
Nulliparität oder Späterstgebärende	1,5-3,0
Stilldauer	1,5-3,0
Frühe Menarche oder späte Menopause	1,5-3,0
Hormonersatztherapie	1,5-3,0
Brusttumor invasiv	2-6
Mastopathie	kein erhöhtes Risiko
Mastopathie + positive Familiengeschichte	2,7
Atypische duktale Hyperplasie	4-5
Atypische duktale Hyperplasie + positive Familiengeschichte	11
Lobuläre Hyperplasie	4-5
Mammographie, dichtes Brustgewebe, prämenopausal	4-6
Mammographie, dichtes Brustgewebe, postmenopausal	4-6

© S.Gerlinger

Neben Lifestyleeinflüssen sind die Art der Brustdrüsengewebe und deren Wachstum Prädiktoren für ein erhöhtes Risiko. Interessanterweise sind Frauen mit verändertem Brustdrüsengewebe und einem familiären Hintergrund weitaus gefährdeter als Frauen ohne eine Brustkrebs-Historie. Die Mammographie erwies sich für dichtes Brustdrüsengewebe unvorteilhafter als für weniger dichtes (Vacek und Geller, 2004). Es gibt sogar Hinweise auf eine erbliche Komponente (Boyd et al., 2002). Gegen einen

genetischen Einfluss spricht jedoch, dass es keine signifikanten Unterschiede zwischen prä- und postmenopausalen Veränderungen gibt (Vacek und Geller, 2004).

In unserer Gesellschaft sind präventive Maßnahmen wie die Mammographie, die Hormonsubstitutionstherapie oder die prophylaktische Mastektomie prä- und postmenopausaler Frauen immer wieder Gegenstand heftiger Diskussionen. Die Modulation des familiären Brustkrebsrisikos durch klar nachweisbare genetische Ursachen und durch Umweltfaktoren, mit und ohne möglichem genetischen Potential, präferiert ein Multifaktorenmodell ohne Mendel-Erbgang.

Die auffällige Abhängigkeit erhobener Daten von der Populationsdynamik unterstützt dieses Modell als Ausdruck einer komplexen Gen-Umwelt-Interaktion. Analysen in kleinen Populationen haben den Nachteil, dass sie einer genetischen Drift unterliegen, d.h. durch Zufallsabweichungen ändert sich der genetische Pool einer Population. Das Mutationsrisiko einer genetischen Variante in abgegrenzten Founder-Populationen wie die der Ashkenazi-Juden kann innerhalb des größeren geographischen Genpools völlig variieren. Ein Populationsgleichgewicht ist über mehrere Generationen nur stabil, wenn die Population groß genug ist. Neben weiteren Faktoren wie Panmixie und Neumutationen ist die soziale, gesellschaftliche und medizinische Umwelt ein großer Modulator der Genfrequenzen und Ausprägung von Mammakarzinomen.

Der Einfluss von Umweltfaktoren wird jedoch noch kontrovers diskutiert und genetische Modelle rechnen mit einem Anteil von weniger als 10% (Jonker et al., 2003). Bei geringer Penetranz und variabler Expressivität ist eine Beeinflussung durch nicht-genetische Faktoren sehr wahrscheinlich. Es ist deshalb anzunehmen, dass neben Umgebungsfaktoren und den Hochrisikogenen weitere Gene niedriger Penetranz koexistent sind und das Risiko kumulieren. Ein multiplikativer Effekt von verschiedenen Faktoren ist absolut denkbar.

---

## 4. Zusammenfassung

Die Voraussetzung für die genomische Integrität einer Zelle ist eine funktionierende DNA-Reparatur. Bei deren Zusammenbruch kommt es zur Tumorgenese. In dieser Arbeit wurde literarisch untersucht, welchen Einfluss DNA-Reparaturgene auf das Risiko für die Entwicklung von familiärem Brustkrebs nehmen.

Basis für die Brusttumorgenese ist eine defekte Rekombinations-Reparatur. Zunehmend treten auch andere, teilweise weniger erforschte, Reparaturwege in den Vordergrund. Diese könnten miteinander sogar ein komplexes DNA-Reparatur-Netzwerk bilden. Sind deren Komponenten defekt, kommt es zur Brusttumorgenese. Heterozygote Träger einer Mutation in den zentralen Genen haben dabei ein erhöhtes Risiko für familiäre Mammakarzinome. Biallele Träger entwickeln teilweise sehr spezifische hereditäre Brustkrebssyndrome oder Brustkrebs-assoziierte hereditäre Krebs syndrome.

Trägerinnen von Mutationen in den DNA-Reparaturgenen mit hoher Penetranz, BRCA1, BRCA2 und TP53, haben ein zwischen 3- und 22-fach erhöhtes Brustkrebsrisiko. Mutationsträgerinnen von Genen mit niedriger Penetranz wie CHEK2, ATM, NBS1 und die FA-Gene BRIP1 und PALB2 haben ein etwa 2- bis 5-faches Risiko. Normvarianten der DNA-Reparaturgene können sogar für ein noch höheres Risiko prädisponieren. Die Polymorphismen üben einen additiven oder dominant negativen Effekt aus und modifizieren so das familiäre Brustkrebsrisiko kumulativ. Weiterhin wird dieses polygene Modell durch Umweltfaktoren moduliert, die das Risiko zusätzlich erhöhen können. Die modulierenden Einflüsse aller bislang detektierten Risikofaktoren müssen jedoch immer wieder durch neue genetische Modelle evaluiert werden.

Die DNA-Reparaturgene sind für etwa 30% aller familiären Brustkrebsfälle verantwortlich, der große Rest ist weiterhin unerforscht. Viele, bislang noch wenig beachtete oder unbekannte DNA-Reparaturgene und Gene, die nicht als solche klassifiziert sind, haben das Potential zum Risikogen für Brustkrebs.

Nach heutigem Kenntnisstand handelt es sich bei der Entstehung von familiärem Brustkrebs um ein multifaktorielles Geschehen auf der Basis polygenetischer Veränderungen in den DNA-Reparaturgenen.

---

## 5. Literaturverzeichnis

- Abraham RT (2004)** PI 3-kinase related kinases: 'big' players in stress-induced signaling pathways. *DNA Repair (Amst)* 3: 883-887.
- Albertson DG (2003)** Profiling breast cancer by array CGH. *Breast Cancer Res Treat* 78: 289-298.
- Albertson DG, Collins C, McCormick F, Gray JW (2003)** Chromosome aberrations in solid tumors. *Nat Genet* 34: 369-376.
- Allinen M, Huusko P, Mäntyniemi S, Launonen V, Winqvist R (2001)** Mutation analysis of the *CHK2* gene in families with hereditary breast cancer. *Br J Cancer* 85: 209-212.
- Al-Minawi AZ, Saleh-Gohari N, Helleday T (2008)** The ERCC1/XPF endonuclease is required for efficient single-strand annealing and gene conversion in mammalian cells. *Nucleic Acids Res* 36: 1-9.
- Andreassen PR, D'Andrea AD, Taniguchi T (2004)** ATR couples FANCD2 monoubiquitination to the DNA-damage response. *Genes Dev* 18: 1958-1963.
- Anglian Breast Cancer Study Group (2000)** Prevalence and penetrance of *BRCA1* and *BRCA2* mutations in a population-based series of breast cancer cases. *Br J Cancer* 83: 1301-1308.
- Antoniou AC, Gayther SA, Stratton JF, Ponder BA, Easton DF (2000)** Risk models for familial ovarian and breast cancer. *Genet Epidemiol* 18: 173-190.
- Antoniou AC, Pharoah PD, McMullan G, Day NE, Ponder BA, Easton D (2001)** Evidence for further breast cancer susceptibility genes in addition to *BRCA1* and *BRCA2* in a population-based study. *Genet Epidemiol* 21: 1-18.
- Antoniou AC, Easton DF (2006)** Models of genetic susceptibility to breast cancer. *Oncogene* 25: 5898-5905.
- Arver B, Du Q, Chen J, Luo L, Lindblom A (2000)** Hereditary breast cancer: a review. *Semin Cancer Biol* 10: 271-288.
- Backe J, Hofferbert S, Skawran B, Dörk T, Stuhmann M, Karstens JH, Untch M, Meindl A, Burgemeister R, Chang-Claude J, Weber BH (1999)** Frequency of *BRCA1* mutation 5382insC in German breast cancer patients. *Gynecol Oncol* 72: 402-406.

**Bakkenist CJ, Kastan MB (2003)** DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature* 421: 499-506.

**Balz V, Prisack HB, Bier H, Bojar H (2002)** Analysis of BRCA1, TP53, and TSG101 germline mutations in German breast and/or ovarian cancer families. *Cancer Genet Cytogenet* 138: 120-127.

**Barroso E, Milne RL, Fernández LP, Zamora P, Arias JI, Benítez J, Ribas G (2006)** FANCD2 associated with sporadic breast cancer risk. *Carcinogenesis* 27: 1930-1937.

**Bar-Sade RB, Kruglikova A, Modan B, Gak E, Hirsh-Yechezkel G, Theodor L, Novikov I, Gershoni-Baruch R, Risel S, Papa MZ, Ben-Baruch G, Friedman E (1998)** The 185delAG BRCA1 mutation originated before the dispersion of Jews in the diaspora and is not limited to Ashkenazim. *Hum Mol Genet* 7: 801-805.

**Bartek J, Falck J, Lukas J (2001)** CHK2 kinase-a busy messenger. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2: 877-886.

**Baynes C, Healey CS, Pooley KA, Scollen S, Luben RN, Thompson DJ, Pharoah PD, Easton DF, Ponder BA, Dunning AM; SEARCH breast cancer study (2007)** Common variants in the ATM, BRCA1, BRCA2, CHEK2 and TP53 cancer susceptibility genes are unlikely to increase breast cancer risk. *Breast Cancer Res* 9: R27-R41.

**Bell DW, Varley JM, Szydlo TE, Kang DH, Wahrer DC, Shannon KE, Lubratovich M, Verselis SJ, Isselbacher KJ, Fraumeni JF, Birch JM, Li FP, Garber JE, Haber DA (1999)** Heterozygous germ line hCHK2 mutations in Li-Fraumeni syndrome. *Science* 286: 2528-2531.

**Bertwistle D, Swift S, Marston NJ, Jackson LE, Crossland S, Crompton MR, Marshall CJ, Ashworth A (1997)** Nuclear location and cell cycle regulation of the BRCA2 protein. *Cancer Res* 57: 5485-5488.

**Bhattacharyya A, Ear US, Koller BH, Weichselbaum RR, Bishop DK (2000)** The breast cancer susceptibility gene BRCA1 is required for subnuclear assembly of Rad51 and survival following treatment with the DNA cross-linking agent cisplatin. *J Biol Chem* 275: 23899-23903.

**Bignell G, Micklem G, Stratton MR, Ashworth A, Wooster R (1997)** The BRC repeats are conserved in mammalian BRCA2 proteins. *Hum Mol Genet* 6: 53-58.

**Birch JM, Hartley AL, Tricker KJ, Prosser J, Condie A, Kelsey AM, Harris M, Jones PH, Binchy A, Crowther D, Craft AW, Eden OB, Evans DGR, Thompson E, Mann JR,**

Martin J, Mitchell ELD, Santibáñez-Koref MF (1994) Prevalence and diversity of constitutional mutations in the p53 gene among 21 Li-Fraumeni families. *Cancer Res* 54: 1298-1304.

**Blom E**, van de Vrugt HJ, de Vries Y, de Winter JP, Arwert F, Joenje H (2004) Multiple TPR motifs characterize the Fanconi anemia FANCG protein. *DNA Repair (Amst)* 3: 77-84.

**Bogdanova N**, Schürmann P, Waltes R, Feshchenko S, Zalutsky IV, Bremer M, Dörk T (2007) NBS1 variant I171V and breast cancer risk. *Breast Cancer Res Treat*. Doi: 10.1007/s10549-007-9820-4 (Nov 30, 2007).

**Bogdanova N**, Feshchenko S, Schürmann P, Waltes R, Wieland B, Hillemanns P, Rogov YI, Dammann O, Bremer M, Karstens JH, Sohn C, Varon R, Dörk T (2008) Nijmegen Breakage Syndrome mutations and risk of breast cancer. *Int J Cancer* 122: 802-806.

**Bogliolo M**, Lyakhovich A, Callén E, Castellà M, Cappelli E, Ramírez MJ, Creus A, Marcos R, Kalb R, Neveling K, Schindler D, Surrallés J (2007) Histone H2AX and Fanconi anemia FANCD2 function in the same pathway to maintain chromosome stability. *EMBO J* 26: 1340-1351.

**Børresen AL**, Andersen TI, Garber J, Barbier-Piroux N, Thorlacius S, Eyfjörd J, Ottestad L, Smith-Sørensen B, Hovig E, Malkin D (1992) Screening for germ line TP53 mutations in breast cancer patients. *Cancer Res* 52: 3234-3236.

**Bosotti R**, Isacchi A, Sonnhammer EL (2000) FAT: a novel domain in PIK-related kinases. *Trends Biochem Sci* 25: 225-227.

**Boyd NF**, Dite GS, Stone J, Gunasekara A, English DR, McCredie MR, Giles GG, Trichler D, Chiarelli A, Yaffe MJ, Hopper JL (2002) Heritability of mammographic density, a risk factor for breast cancer. *N Engl J Med* 347: 886-894.

**Bradbury AR, Olopade OI** (2007) Genetic susceptibility to breast cancer. *Rev Endocr Metab Disord* 8: 255-267.

**Breast Cancer Linkage Consortium** (1993) Genetic linkage analysis in familial breast and ovarian cancer: results from 214 families. *Am J Hum Genet* 52: 678-701.

**Breast Cancer Linkage Consortium** (1994) Risks of cancer in BRCA1-mutation carriers. *Lancet* 343: 692-695.

**Breast Cancer Linkage Consortium (1995)** High allele loss rates at 17q12-q21 in breast and ovarian tumors from BRCA1-linked families. *Genes Chromosomes Cancer* 13: 203-210.

**Breast Cancer Linkage Consortium (1998)** Genetic heterogeneity and penetrance analysis of the BRCA1 and BRCA2 genes in breast cancer families. *Am J Hum Genet* 62: 676-689.

**Breast Cancer Linkage Consortium (1999)** Cancer risks in BRCA2 mutation carriers. *J Natl Cancer Inst* 91: 1310-1316.

**Breast Cancer Linkage Consortium (2001)** Variation in cancer risks, by mutation position, in BRCA2 mutation carriers. *Am J Hum Genet* 68: 410-419.

**Breast Cancer Linkage Consortium (2002)** Cancer Incidence in BRCA1 mutation carriers. *J Natl Cancer Inst* 94: 1358-1365.

**Buscemi G, Savio C, Zannini L, Miccichè F, Masnada D, Nakanishi M, Tauchi H, Komatsu K, Mizutani S, Khanna K, Chen P, Concannon P, Chessa L, Delia D (2001)** Chk2 activation dependence on Nbs1 after DNA damage. *Mol Cell Biol* 21: 5214-5222.

**Byrne C, Schairer C, Wolfe J, Parekh N, Salane M, Brinton LA, Hoover R, Haile R (1995)** Mammographic features and breast cancer risk: effects with time, age, and menopause status. *J Natl Cancer Inst* 87: 1622-1629.

**Cahill D, Connor B, Carney JP (2006)** Mechanisms of eukaryotic DNA double strand break repair. *Front Biosci* 11: 1958-1976.

**Callebaut I, Mornon JP (1997)** From BRCA1 to RAP1: a widespread BRCT module closely associated with DNA repair. *FEBS Lett* 400: 25-30.

**Cantor SB, Bell DW, Ganesan S, Kass EM, Drapkin R, Grossman S, Wahrer DC, Sgroi DC, Lane WS, Haber DA, Livingston DM (2001)** BACH1, a novel helicase-like protein, interacts directly with BRCA1 and contributes to its DNA repair function. *Cell* 105: 149-160.

**Cantor S, Drapkin R, Zhang F, Lin Y, Han J, Pamidi S, Livingston DM (2004)** The BRCA1-associated protein BACH1 is a DNA helicase targeted by clinically relevant inactivating mutations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 2357-2362.

**Carney JP, Maser RS, Olivares H, Davis EM, Le Beau M, Yates JR 3rd, Hays L, Morgan WF, Petrini JH (1998)** The hMre11/hRad50 protein complex and Nijmegen

breakage syndrome: linkage of double-strand break repair to the cellular DNA damage response. *Cell* 93: 477-486.

**Catteau A**, Harris WH, Xu CF, Solomon E (1999) Methylation of the BRCA1 promoter region in sporadic breast and ovarian cancer: correlation with disease characteristics. *Oncogene* 18: 1957-1965.

**Cavaciuti E**, Laugé A, Janin N, Ossian K, Hall J, Stoppa-Lyonnet D, Andrieu N (2005) Cancer risk according to type and location of ATM mutation in ataxia-telangiectasia families. *Genes Chromosomes Cancer* 42: 1-9.

**Chai YL**, Cui J, Shao N, Shyam E, Reddy P, Rao VN (1999) The second BRCT domain of BRCA1 proteins interacts with p53 and stimulates transcription from the p21WAF1/CIP1 promoter. *Oncogene* 18: 263-268.

**Chan KY**, Ozçelik H, Cheung AN, Ngan HY, Khoo US (2002) Epigenetic factors controlling the BRCA1 and BRCA2 genes in sporadic ovarian cancer. *Cancer Res.* 62: 4151-4156.

**CHEK2 Breast Cancer Case-Control Consortium** (2004) CHEK2\*1100delC and susceptibility to breast cancer: a collaborative analysis involving 10,860 breast cancer cases and 9,065 controls from 10 studies. *Am J Hum Genet* 74: 1175-1182.

**Cehab NH**, Malikzay A, Appel M, Halazonetis TD (2000) Chk2/hCds1 functions as a DNA damage checkpoint in G(1) by stabilizing p53. *Genes Dev* 14: 278-288.

**Chen CF**, Li S, Chen Y, Chen PL, Sharp ZD, Lee WH (1996) The nuclear localization sequences of the BRCA1 protein interact with the importin-alpha subunit of the nuclear transport signal receptor. *J Biol Chem* 271: 32863-32868.

**Chen J**, Silver DP, Walpita D, Cantor SB, Gazdar AF, Tomlinson G, Couch FJ, Weber BL, Ashley T, Livingston DM, Scully R (1998) Stable interaction between the products of the BRCA1 and BRCA2 tumor suppressor genes in mitotic and meiotic cells. *Mol Cell* 2: 317-328.

**Chen Y**, Chen CF, Riley DJ, Allred DC, Chen PL, Von Hoff D, Osborne CK, Lee WH (1995) Aberrant subcellular localization of BRCA1 in breast cancer. *Science* 270: 789-791.

**Chen Y**, Thompson W, Semenciw R, Mao Y (1999) Epidemiology of contralateral breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 8: 855-861.

**Chenevix-Trench G**, Spurdle AB, Gatei M, Kelly H, Marsh A, Chen X, Donn K, Cummings M, Nyholt D, Jenkins MA, Scott C, Pupo GM, Dörk T, Bendix R, Kirk J, Tucker K, McCredie MR, Hopper JL, Sambrook J, Mann GJ, Khanna KK (2002) Dominant negative ATM mutations in breast cancer families. *J Natl Cancer Inst* 94: 205-215.

**Claus EB**, Risch NJ, Thompson WD (1990) Age at onset as an indicator of familial risk of breast cancer. *Am J Epidemiol* 131: 961-972.

**Collins N**, McManus R, Wooster R, Mangion J, Seal S, Lakhani SR, Ormiston W, Daly PA, Ford D, Easton DF, Stratton MR (1995) Consistent loss of the wild type allele in breast cancers from a family linked to the BRCA2 gene on chromosome 13q12-13. *Oncogene* 10: 1673-1675.

**Cornelis RS**, van Vliet M, van de Vijver MJ, Vasen HF, Voute PA, Top B, Khan PM, Devilee P, Cornelisse CJ (1997) Three germline mutations in the TP53 gene. *Hum Mutat* 9: 157-163.

**Cortez D**, Wang Y, Qin J, Elledge SJ (1999) Requirement of ATM-dependent phosphorylation of brca1 in the DNA damage response to double-strand breaks. *Science* 286: 1162-1166.

**Cybulski C**, Huzarski T, Górski B, Masojć B, Mierzejewski M, Debniak T, Gliniewicz B, Matyjasik J, Złowocka E, Kurzawski G, Sikorski A, Posmyk M, Szwiec M, Czajka R, Narod SA, Lubiński J (2004) A novel founder CHEK2 mutation is associated with increased prostate cancer risk. *Cancer Res* 64: 2677-2679.

**Cybulski C**, Górski B, Huzarski T, Byrski T, Gronwald J, Debniak T, Wokolorczyk D, Jakubowska A, Kowalska E, Oszurek O, Narod SA, Lubinski J (2006) CHEK2-positive breast cancers in young Polish women. *Clin Cancer Res* 12: 4832-4835.

**Davies AA**, Masson JY, McIlwraith MJ, Stasiak AZ, Stasiak A, Venkitaraman AR, West SC (2001) Role of BRCA2 in control of the RAD51 recombination and DNA repair protein. *Mol Cell* 7: 273-282.

**Desai-Mehta A**, Cerosaletti KM, Concannon P (2001) Distinct functional domains of nibrin mediate Mre11 binding, focus formation, and nuclear localization. *Mol Cell Biol* 21: 2184-2191.

**De Winter JP**, Rooimans MA, van Der Weel L, van Berkel CG, Alon N, Bosnoyan-Collins L, de Groot J, Zhi Y, Waisfisz Q, Pronk JC, Arwert F, Mathew CG, Scheper RJ,

Hoatlin ME, Buchwald M, Joenje H (2000) The Fanconi anaemia gene FANCF encodes a novel protein with homology to ROM. *Nat Genet* 24: 15-16.

**Digweed M**, Reis A, Sperling K (1999) Nijmegen breakage syndrome: consequences of defective DNA double strand break repair. *Bioessays* 21: 649-656.

**Digweed M, Sperling K (2004)** Nijmegen breakage syndrome: clinical manifestation of defective response to DNA double-strand breaks. *DNA Repair (Amst)* 3: 1207-1217.

**Djuzenova CS**, Rothfuss A, Oppitz U, Spelt G, Schindler D, Hoehn H, Flentje M (2001) Response to X-irradiation of Fanconi anemia homozygous and heterozygous cells assessed by the single-cell gel electrophoresis (comet) assay. *Lab Invest* 81: 185-192.

**Dörk T**, Bendix R, Bremer M, Rades D, Klöpffer K, Nicke M, Skawran B, Hector A, Yamini P, Steinmann D, Weise S, Stuhmann M, Karstens JH (2001) Spectrum of ATM gene mutations in a hospital-based series of unselected breast cancer patients. *Cancer Res* 61: 7608-7615.

**Donehower LA, Bradley A (1993)** The tumor suppressor p53. *Biochim Biophys Acta* 1155: 181-205.

**Dupont WD, Page DL (1985)** Risk factors for breast cancer in women with proliferative breast disease. *N Engl J Med* 312: 146-151.

**Durocher D**, Henckel J, Fersht AR, Jackson SP (1999) The FHA domain is a modular phosphopeptide recognition motif. *Mol Cell* 4: 387-394.

**Easton DF**, Steele L, Fields P, Ormiston W, Averill D, Daly PA, McManus R, Neuhausen SL, Ford D, Wooster R, Cannon-Albright LA, Stratton MR, Goldgar DE (1997) Cancer risks in two large breast cancer families linked to BRCA2 on chromosome 13q12-13. *Am J Hum Genet* 61: 120-128.

**Ebi H**, Matsuo K, Sugito N, Suzuki M, Osada H, Tajima K, Ueda R, Takahashi T (2007) Novel NBS1 heterozygous germ line mutation causing MRE11-binding domain loss predisposes to common types of cancer. *Cancer Res* 67: 11158-11165.

**Einbeigi Z**, Bergman A, Kindblom LG, Martinsson T, Meis-Kindblom JM, Nordling M, Suurkula M, Wahlström J, Wallgren A, Karlsson P (2001) A founder mutation of the BRCA1 gene in Western Sweden associated with a high incidence of breast and ovarian cancer. *Eur J Cancer* 37: 1904-1909.

**Elliott B**, Richardson C, Jasin M (2005) Chromosomal translocation mechanisms at intronic alu elements in mammalian cells. *Mol Cell* 17: 885-894.

**Enomoto T** (2001) Functions of RecQ family helicases: possible involvement of Bloom's and Werner's syndrome gene products in guarding genome integrity during DNA replication. *J Biochem* 129: 501-507.

**Erkko H**, Xia B, Nikkilä J, Schleutker J, Syrjäkoski K, Mannermaa A, Kallioniemi A, Pylkäs K, Karppinen SM, Rapakko K, Miron A, Sheng Q, Li G, Mattila H, Bell DW, Haber DA, Grip M, Reiman M, Jukkola-Vuorinen A, Mustonen A, Kere J, Aaltonen LA, Kosma VM, Kataja V, Soini Y, Drapkin RI, Livingston DM, Winqvist R (2007) A recurrent mutation in PALB2 in Finnish cancer families. *Nature* 446: 316-319.

**Evans DG**, Birch JM, Narod SA (2008) Is CHEK2 a cause of the Li Fraumeni syndrome? *J Med Genet* 45: 63-64.

**Fagerlie SR**, Koretsky T, Torok-Storb B, Bagby GC (2004) Impaired type I IFN-induced Jak/STAT signaling in FA-C cells and abnormal CD4<sup>+</sup> Th cell subsets in *Fancc*<sup>-/-</sup> mice. *J Immunol* 173: 3863-3870.

**Faille A**, De Cremoux P, Extra JM, Linares G, Espie M, Bourstyn E, De Rocquancourt A, Giacchetti S, Marty M, Calvo F (1994) p53 mutations and overexpression in locally advanced breast cancers. *Br J Cancer* 69: 1145-1150.

**Falck J**, Mailand N, Syljuåsen RG, Bartek J, Lukas J (2001) The ATM-Chk2-Cdc25A checkpoint pathway guards against radioresistant DNA synthesis. *Nature* 410: 842-847.

**Featherstone C**, Jackson SP (1998) DNA repair: the Nijmegen breakage syndrome protein. *Curr Biol* 8: R622-R625.

**Ferguson DO**, Sekiguchi JM, Chang S, Frank KM, Gao Y, DePinho RA, Alt FW (2000) The nonhomologous end-joining pathway of DNA repair is required for genomic stability and the suppression of translocations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 6630-6633.

**Ferguson DO**, Alt FW (2001) DNA double strand break repair and chromosomal translocation: lessons from animal models. *Oncogene*. 20: 5572-5579.

**Fernandes N**, Sun Y, Chen S, Paul P, Shaw RJ, Cantley LC, Price BD (2005) DNA damage-induced association of ATM with its target proteins requires a protein interaction domain in the N terminus of ATM. *J Biol Chem* 280: 15158-15164.

- Fernet M**, Moullan N, Lauge A, Stoppa-Lyonnet D, Hall J (2004) Cellular responses to ionising radiation of AT heterozygotes: differences between missense and truncating mutation carriers. *Br J Cancer* 90: 866-873.
- Foray N**, Marot D, Gabriel A, Randrianarison V, Carr AM, Perricaudet M, Ashworth A, Jeggo P (2003) A subset of ATM- and ATR-dependent phosphorylation events requires the BRCA1 protein. *EMBO J* 22: 2860-2871.
- Ford JM** (2005) Regulation of DNA damage recognition and nucleotide excision repair: another role for p53. *Mutat Res* 577: 195-202.
- Franchitto A, Pichierri P** (2002) Bloom's syndrome protein is required for correct relocalization of RAD50/MRE11/NBS1 complex after replication fork arrest. *J Cell Biol* 157: 19-30.
- Frank B**, Hemminki K, Meindl A, Wappenschmidt B, Sutter C, Kiechle M, Bugert P, Schmutzler RK, Bartram CR, Burwinkel B (2007) BRIP1 (BACH1) variants and familial breast cancer risk: a case-control study. *BMC Cancer* 7: 83-87.
- Friedman LS**, Ostermeyer EA, Szabo CI, Dowd P, Lynch ED, Rowell SE, King MC (1994) Confirmation of BRCA1 by analysis of germline mutations linked to breast and ovarian cancer in ten families. *Nat Genet* 8: 399-404.
- Fu YP**, Yu JC, Cheng TC, Lou MA, Hsu GC, Wu CY, Chen ST, Wu HS, Wu PE, Shen CY (2003) Breast cancer risk associated with genotypic polymorphism of the nonhomologous end-joining genes: a multigenic study on cancer susceptibility. *Cancer Res* 63: 2440-2446.
- Fuks F**, Milner J, Kouzarides T (1998) BRCA2 associates with acetyltransferase activity when bound to P/CAF. *Oncogene* 17: 2531-2534.
- Futamura M**, Arakawa H, Matsuda K, Katagiri T, Saji S, Miki Y, Nakamura Y (2000) Potential role of BRCA2 in a mitotic checkpoint after phosphorylation by hBUBR1. *Cancer Res* 60: 1531-1535.
- Galkin VE**, Esashi F, Yu X, Yang S, West SC, Egelman EH (2005) BRCA2 BRC motifs bind RAD51-DNA filaments. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 8537-8542.
- Garber JE, Offit K** (2005) Hereditary cancer predisposition syndromes. *J Clin Oncol* 23: 276-292.

- Garcia-Higuera I**, Taniguchi T, Ganesan S, Meyn MS, Timmers C, Hejna J, Grompe M, D'Andrea AD (2001) Interaction of the Fanconi anemia proteins and BRCA1 in a common pathway. *Mol Cell* 7: 249-262.
- Gasior SL**, Olivares H, Ear U, Hari DM, Weichselbaum R, Bishop DK (2001) Assembly of RecA-like recombinases: distinct roles for mediator proteins in mitosis and meiosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 8411-8418.
- Gatei M**, Scott SP, Filippovitch I, Soronika N, Lavin MF, Weber B, Khanna KK (2000) Role for ATM in DNA damage-induced phosphorylation of BRCA1. *Cancer Res* 60: 3299-3304.
- Gatti RA**, Berkel I, Boder E, Braedt G, Charmley P, Concannon P, Ersoy F, Foroud T, Jaspers NG, Lange K, Lathrop GM, Leppert M, Nakamura Y, O'Connell P, Paterson M, Salser W, Sanal O, Silver J, Sparkes RS, Susi E, Weeks DE, Wei S, White R, Yoder F (1988) Localization of an ataxia-telangiectasia gene to chromosome 11q22-23. *Nature* 336: 577-580.
- German Consortium for Hereditary Breast and Ovarian Cancer** (2002) 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* 97: 472-480.
- Giardiello FM**, Brensinger JD, Tersmette AC, Goodman SN, Petersen GM, Booker SV, Cruz-Correa M, Offerhaus JA (2000) Very high risk of cancer in familial Peutz-Jeghers syndrome. *Gastroenterology* 119: 1447-1453.
- Girard PM**, Foray N, Stumm M, Waugh A, Riballo E, Maser RS, Phillips WP, Petrini J, Arlett CF, Jeggo PA (2000) Radiosensitivity in Nijmegen Breakage Syndrome cells is attributable to a repair defect and not cell cycle checkpoint defects. *Cancer Res* 60: 4881-4888.
- Go RC**, King MC, Bailey-Wilson J, Elston RC, Lynch HT (1983) Genetic epidemiology of breast cancer and associated cancers in high-risk families. I. Segregation analysis. *Natl Cancer Inst* 71: 455-461.
- Goode EL**, Dunning AM, Kuschel B, Healey CS, Day NE, Ponder BA, Easton DF, Pharoah PP (2002) Effect of germ-line genetic variation on breast cancer survival in a population-based study. *Cancer Res* 62: 3052-3057.

- Górski B**, Debniak T, Masojć B, Mierzejewski M, Medrek K, Cybulski C, Jakubowska A, Kurzawski G, Chosia M, Scott R, Lubiński J (2003) Germline 657del5 mutation in the NBS1 gene in breast cancer patients. *Int J Cancer* 106: 379-381.
- Greenberg RA**, Sobhian B, Pathania S, Cantor SB, Nakatani Y, Livingston DM (2006) Multifactorial contributions to an acute DNA damage response by BRCA1/BARD1-containing complexes. *Genes Dev* 20: 34-46.
- Greenblatt MS**, Grollman AP, Harris CC (1996) Deletions and insertions in the p53 tumor suppressor gene in human cancers: confirmation of the DNA polymerase slippage/misalignment model. *Cancer Res* 56: 2130-2136.
- Gretarsdottir S**, Thorlacius S, Valgardsdottir R, Gudlaugsdottir S, Sigurdsson S, Steinarsdottir M, Jonasson JG, Anamthawat-Jonsson K, Eyfjörd JE (1998) BRCA2 and p53 mutations in primary breast cancer in relation to genetic instability. *Cancer Res* 58: 859-862.
- Gudmundsdottir K**, Lord CJ, Witt E, Tutt AN, Ashworth A (2004) DSS1 is required for RAD51 focus formation and genomic stability in mammalian cells. *EMBO Rep* 5: 989-993.
- Guillouf C**, Rosselli F, Krishnaraju K, Moustacchi E, Hoffman B, Liebermann DA (1995) p53 involvement in control of G2 exit of the cell cycle: role in DNA damage-induced apoptosis. *Oncogene* 10: 2263-2270.
- Gurtan AM**, Stuckert P, D'Andrea AD (2006) The WD40 repeats of FANCL are required for Fanconi anemia core complex assembly. *J Biol Chem* 281: 10896-10905.
- Haber JE** (1999) DNA recombination: the replication connection. *Trends Biochem Sci* 24: 271-275.
- Hahn WC, Weinberg RA** (2002) Modelling the molecular circuitry of cancer. *Nat Rev Cancer* 2: 331-341.
- Hall JM**, Lee MK, Newman B, Morrow JE, Anderson LA, Huey B, King MC (1990) Linkage of early-onset familial breast cancer to chromosome 17q21. *Science* 250: 1684-1689.
- Han J**, Haiman C, Niu T, Guo Q, Cox DG, Willett WC, Hankinson SE, Hunter DJ (2008) Genetic variation in DNA repair pathway genes and premenopausal breast cancer risk. *Breast Cancer Res Treat*. Doi: 10.1007/s10549-008-0089-z (Jun 13, 2008).
- Hanahan D, Weinberg RA** (2000) The hallmarks of cancer. *Cell* 100: 57-70.

**Harkin DP**, Bean JM, Miklos D, Song YH, Truong VB, Englert C, Christians FC, Ellisen LW, Maheswaran S, Oliner JD, Haber DA (1999) Induction of GADD45 and JNK/SAPK-dependent apoptosis following inducible expression of BRCA1. *Cell* 97: 575-586.

**Harms K**, Nozell S, Chen X (2004) The common and distinct target genes of the p53 family transcription factors. *Cell Mol Life Sci* 61: 822-842.

**Hartman AR, Ford JM** (2002) BRCA1 induces DNA damage recognition factors and enhances nucleotide excision repair. *Nat Genet* 32: 180-184.

**Hartmann LC**, Sellers TA, Frost MH, Lingle WL, Degenim AC, Ghosh K, Vierkant RA, Maloney SD, Pankratz VS, Hillman DW, Suman VJ, Johnson J, Blake C, Tlsty T, Vachon CM, Melton LJ 3rd, Visscher DW (2005) Benign breast disease and the risk of breast cancer. *N Engl J Med* 353: 229-237.

**Hashizume R**, Fukuda M, Maeda I, Nishikawa H, Oyake D, Yabuki Y, Ogata H, Ohta T (2001) The RING heterodimer BRCA1-BARD1 is a ubiquitin ligase inactivated by a breast cancer-derived mutation. *J Biol Chem* 276: 14537-14540.

**Hefferin ML, Tomkinson AE** (2005) Mechanism of DNA double-strand break repair by non-homologous end joining. *DNA Repair (Amst)* 4: 639-648.

**Heikkinen K**, Karppinen SM, Soini Y, Mäkinen M, Winqvist R (2003) Mutation screening of Mre11 complex genes: indication of RAD50 involvement in breast and ovarian cancer susceptibility. *J Med Genet* 40: e131-e138.

**Hilton JL**, Geisler JP, Rathe JA, Hattermann-Zogg MA, DeYoung B, Buller RE (2002) Inactivation of BRCA1 and BRCA2 in ovarian cancer. *J Natl Cancer Inst* 94: 1396-1406.

**Holt JT**, Thompson ME, Szabo C, Robinson-Benion C, Arteaga CL, King MC, Jensen RA (1996) Growth retardation and tumour inhibition by BRCA1. *Nat Genet* 12: 298-302.

**Honrado E**, Benítez J, Palacios J (2005) The molecular pathology of hereditary breast cancer: genetic testing and therapeutic implications. *Mod Pathol* 18: 1305-1320.

**Howlett NG**, Taniguchi T, Olson S, Cox B, Waisfisz Q, De Die-Smulders C, Persky N, Grompe M, Joenje H, Pals G, Ikeda H, Fox EA, D'Andrea AD (2002) Biallelic inactivation of BRCA2 in Fanconi anemia. *Science* 297: 606-609.

**Hussain S**, Wilson JB, Medhurst AL, Hejna J, Witt E, Ananth S, Davies A, Masson JY, Moses R, West SC, de Winter JP, Ashworth A, Jones NJ, Mathew CG (2004) Direct interaction of FANCD2 with BRCA2 in DNA damage response pathways. *Hum Mol Genet* 13: 1241-1248.

**International Human Genome Sequencing Consortium (2001)** Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409: 860-921.

**Jasin M (2002)** Homologous repair of DNA damage and tumorigenesis: the BRCA connection. *Oncogene* 21: 8981-8993.

**Jeggo PA, Löbrich, M (2005)** Artemis links ATM to double strand break rejoining. *Cell Cycle* 4: 359-362.

**Jiang X**, Sun Y, Chen S, Roy K, Price BD (2006) The FATC domains of PIKK proteins are functionally equivalent and participate in the Tip60-dependent activation of DNA-PKcs and ATM. *J Biol Chem* 281: 15741-15746.

**Johnson N**, Fletcher O, Naceur-Lombardelli C, dos Santos Silva I, Ashworth A, Peto J (2005) Interaction between CHEK2\*1100delC and other low-penetrance breast-cancer susceptibility genes: a familial study. *Lancet* 366: 1554-1557.

**Jonker MA**, Jacobi CE, Hoogendoorn WE, Nagelkerke NJ, de Bock GH, van Houwelingen JC (2003) Modeling familial clustered breast cancer using published data. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 12: 1479-1485.

**Kalb R**, Duerr M, Wagner M, Herterich S, Gross M, Digweed M, Joenje H, Hoehn H, Schindler D (2004) Lack of sensitivity of primary Fanconi's anemia fibroblasts to UV and ionizing radiation. *Radiat Res* 161: 318-325.

**Kalb R**, Neveling K, Hoehn H, Schneider H, Linka Y, Batish SD, Hunt C, Berwick M, Callen E, Surralles J, Casado JA, Bueren J, Dasi A, Soulier J, Gluckman E, Zwaan CM, van Spaendonk R, Pals G, de Winter JP, Joenje H, Grompe M, Auerbach AD, Hanenberg H, Schindler D (2007) 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* 80: 895-910.

**Kang J**, Bronson RT, Xu Y (2002) Targeted disruption of NBS1 reveals its roles in mouse development and DNA repair. *EMBO J* 21: 1447-1455.

**Kastan MB, Bartek J (2004)** Cell-cycle checkpoints and cancer. *Nature* 432: 316-323.

- Kato M**, Yano K, Matsuo F, Saito H, Katagiri T, Kurumizaka H, Yoshimoto M, Kasumi F, Akiyama F, Sakamoto G, Nagawa H, Nakamura Y, Miki Y (2000) Identification of Rad51 alteration in patients with bilateral breast cancer. *J Hum Genet* 45: 133-137.
- Khanna KK**, Lavin MF, Jackson SP, Mulhern TD (2001) ATM, a central controller of cellular responses to DNA damage. *Cell Death Differ* 8: 1052-1065.
- Khoo US**, Ozcelik H, Cheung AN, Chow LW, Ngan HY, Done SJ, Liang AC, Chan VW, Au GK, Ng WF, Poon CS, Leung YF, Loong F, Ip P, Chan GS, Andrulis IL, Lu J, Ho FC (1999) Somatic mutations in the BRCA1 gene in Chinese sporadic breast and ovarian cancer. *Oncogene* 18: 4643-4646.
- Kilpivaara O**, Bartkova J, Eerola H, Syrjäkoski K, Vahteristo P, Lukas J, Blomqvist C, Holli K, Heikkilä P, Sauter G, Kallioniemi OP, Bartek J, Nevanlinna H (2005) Correlation of CHEK2 protein expression and c.1100delC mutation status with tumor characteristics among unselected breast cancer patients. *Int J Cancer* 113: 575-580.
- Kilpivaara O**, Alhopuro P, Vahteristo P, Aaltonen LA, Nevanlinna H (2006) CHEK2 I157T associates with familial and sporadic colorectal cancer. *J Med Genet* 43: e34.
- Kim JE**, Minter-Dykhouse K, Chen J (2006) Signaling networks controlled by the MRN complex and MDC1 during early DNA damage responses. *Mol Carcinog* 45: 403-408.
- Kinzler KW**, Vogelstein B (1998) Landscaping the cancer terrain. *Science* 280: 1036-1037.
- Knudson AG Jr.** (1971) Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 68: 820-823.
- Knudson AG Jr.** (1977) Genetics and the ethiology of human cancer. *Adv Hum Genet* 8: 1-66.
- Kobayashi J**, Antoccia A, Tauchi H, Matsuura S, Komatsu K (2004) NBS1 and its functional role in the DNA damage response. *DNA Repair (Amst)* 3: 855-861.
- Komori K**, Fujikane R, Shinagawa H, Ishino Y (2002) Novel endonuclease in Archaea cleaving DNA with various branched structure. *Genes Genet Syst* 77: 227-241.
- Kumaraswamy E**, Shiekhattar R (2007) Activation of BRCA1/BRCA2-associated helicase BACH1 is required for timely progression through S phase. *Mol Cell Biol* 27: 6733-6741.

- Kuschel B**, Auranen A, McBride S, Novik KL, Antoniou A, Lipscombe JM, Day NE, Easton DF, Ponder BA, Pharoah PD, Dunning A (2002) Variants in DNA double-strand break repair genes and breast cancer susceptibility. *Hum Mol Genet* 11: 1399-1407.
- Laloo F**, Varley J, Ellis D, Moran A, O'Dair L, Pharoah P, Evans DG, Early Onset Breast Cancer Study Group (2003) Prediction of pathogenic mutations in patients with early-onset breast cancer by family history. *Lancet* 361: 1101-1102.
- Lane DP, Crawford LV (1979)** T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. *Nature* 278: 261-263.
- Lane DP (1992)** Cancer. P53, guardian of the genome. *Nature* 358: 15-16.
- Lang GA**, Iwakuma T, Suh YA, Liu G, Rao VA, Parant JM, Valentin-Vega YA, Terzian T, Caldwell LC, Strong LC, El-Naggar AK, Lozano G (2004) Gain of function of a p53 hot spot mutation in a mouse model of Li-Fraumeni syndrome. *Cell* 119: 861-872.
- Laptenko O, Prives C (2006)** Transcriptional regulation by p53: one protein, many possibilities. *Cell Death Differ* 13: 951-961.
- Lavin MF, Khanna KK (1999)** ATM: the protein encoded by the gene mutated in the radiosensitive syndrome ataxia-telangiectasia. *Int J Radiat Biol* 75: 1201-1214.
- Lee H**, Trainer AH, Friedman LS, Thistlethwaite FC, Evans MJ, Ponder BA, Venkitaraman AR (1999) Mitotic checkpoint inactivation fosters transformation in cells lacking the breast cancer susceptibility gene, Brca2. *Mol Cell* 4: 1-10.
- Lee JS**, Collins KM, Brown AL, Lee CH, Chung JH (2000) hCds1-mediated phosphorylation of BRCA1 regulates the DNA damage response. *Nature* 404: 201-204.
- Léveillé F**, Blom E, Medhurst AL, Bier P, Laghmani el H, Johnson M, Rooimans MA, Sobock A, Waisfisz Q, Arwert F, Patel KJ, Hoatlin ME, Joenje H, de Winter JP (2004) The Fanconi anemia gene product FANCF is a flexible adaptor protein. *J Biol Chem* 279: 39421-39430.
- Levine AJ**, Hu W, Feng Z (2006) The P53 pathway: what questions remain to be explored? *Cell Death Differ* 13: 1027-1036.
- Levitus M**, Waisfisz Q, Godthelp BC, de Vries Y, Hussain S, Wiegant WW, Elghalbzouri-Maghrani E, Steltenpool J, Rooimans MA, Pals G, Arwert F, Mathew CG, Zdzienicka MZ, Hiom K, De Winter JP, Joenje H (2005) The DNA helicase BRIP1 is defective in Fanconi anemia complementation group J. *Nat Genet* 37: 934-935.

- Li FP, Fraumeni JF Jr (1969)** Soft-tissue sarcomas, breast cancer, and other neoplasms. A familial syndrom? *Ann Int Med* 71: 747-752.
- Li FP, Fraumeni JF Jr, Mulvihill JJ, Blattner WA, Dreyfus MG, Tucker MA, Miller RW (1988)** A cancer family syndrome in twenty-four kindreds. *Cancer Res* 48: 5358-5362.
- Li FP (1990)** Familial cancer syndromes and clusters. *Curr Probl Cancer* 14: 73-114.
- Li J, Williams BL, Haire LF, Goldberg M, Wilker E, Durocher D, Yaffe MB, Jackson SP, Smerdon SJ (2002)** Structural and functional versatility of the FHA domain in DNA-damage signaling by the tumor suppressor kinase Chk2. *Mol Cell* 9: 1045-1054.
- Li J, Zou C, Bai Y, Wazer DE, Band V, Gao Q (2006)** DSS1 is required for the stability of BRCA2. *Oncogene* 25: 1186-1194.
- Liang F, Han M, Romanienko PJ, Jasin M (1998)** Homology-directed repair is a major double-strand break repair pathway in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 5172-5177.
- Lieber MR, Ma Y, Pannicke U, Schwarz K (2003)** Mechanism and regulation of human non-homologous DNA end-joining. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4: 712-720.
- Lin HR, Ting NS, Qin J, Lee WH (2003)** M phase-specific phosphorylation of BRCA2 by Polo-like kinase 1 correlates with the dissociation of the BRCA2-P/CAF complex. *J Biol Chem* 278: 35979-35987.
- Linzer DI, Levine AJ (1979)** Characterization of a 54K dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells. *Cell* 17: 43-52.
- Lisby M, Barlow JH, Burgess RC, Rothstein R (2004)** Choreography of the DNA damage response: spatiotemporal relationships among checkpoint and repair proteins. *Cell* 118: 699-713.
- Liu G, Chen X (2006)** Regulation of the p53 transkriptional activity. *J Cell Biochem* 97: 448-458.
- Liu J, Yuan Y, Huan J, Shen Z (2001)** Inhibition of breast and brain cancer cell growth by BCCIPalpha, an evolutionarily conserved nuclear protein that interacts with BRCA2. *Oncogene* 20: 336-345.
- Lo Ten Foe JR, Rooimans MA, Bosnoyan-Collins L, Alon N, Wijker M, Parker L, Lightfoot J, Carreau M, Callen DF, Savoia A, Cheng NC, van Berkel CG, Strunk MH,**

- Gille JJ, Pals G, Kruyt FA, Pronk JC, Arwert F, Buchwald M, Joenje H (1996) Expression cloning of a cDNA for the major Fanconi anaemia gene, FAA. *Nat Genet* 14: 320-323.
- Lovering R**, Hanson IM, Borden KL, Martin S, O'Reilly NJ, Evan GI, Rahman D, Pappin DJ, Trowsdale J, Freemont PS (1993) Identification and preliminary characterization of a protein motif related to the zinc finger. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 2112-2116.
- Lukas C**, Bartkova J, Latella L, Falck J, Mailand N, Schroeder T, Sehested M, Lukas J, Bartek J (2001) DNA damage-activated kinase Chk2 is independent of proliferation or differentiation yet correlates with tissue biology. *Cancer Res* 61: 4990-4993.
- Lukas C**, Falck J, Bartkova J, Bartek J, Lukas J (2003) Distinct spatiotemporal dynamics of mammalian checkpoint regulators induced by DNA damage. *Nat Cell Biol* 5: 255-260.
- Lux MP**, Fasching PA, Beckmann MW (2006) Hereditary breast and ovarian cancer: review and future perspectives. *J Mol Med* 84: 16-28.
- Lynch HT**, Fain PR, Golgar D, Albano WA, Mailliard JA, McKenna P (1981) Familial breast cancer and its recognition in an oncology clinic. *Cancer* 47: 2730-2739.
- Lynch HT**, Silva E, Snyder C, Lynch JF (2008) Hereditary breast cancer: Part I. Diagnosing hereditary breast cancer syndromes. *Breast J* 14: 3-13.
- Ma JL**, Kim EM, Haber JE, Lee SE (2003) Yeast Mre11 and Rad1 proteins define a Ku-independent mechanism to repair double-strand breaks lacking overlapping end sequences. *Mol Cell Biol* 23: 8820-8828.
- Maki H** (2002) Origins of spontaneous mutations: specificity and directionality of base-substitution, frameshift, and sequence-substitution mutageneses. *Annu Rev Genet* 36: 279-303.
- Malkin D** (1998) The Li-Fraumeni syndrome. In: Vogelstein B, Kinzler KW (Eds.) *The genetic basis of human cancer*, McGraw-Hill, New York, NY 1998, pp. 939-407.
- Marchetti A**, Buttitta F, Pellegrini S, Diella F, Campani D, Cecchetti D, Squartini F, Callahan R, Bistocchi M (1993) p53 mutations and histologic type of invasive breast carcinoma. A polymerase chain reaction-single-strand conformation polymorphism and immunohistochemical analysis. *Ann NY Acad Sci* 698: 114-119.

**Marmorstein LY**, Ouchi T, Aaronson SA (1998) The BRCA2 gene product functionally interacts with p53 and RAD51. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 13869-13874.

**Marmorstein LY**, Kinev AV, Chan GK, Bochar DA, Beniya H, Epstein JA, Yen TJ, Shiekhatter R (2001) A human BRCA2 complex containing a structural DNA binding component influences cell cycle progression. *Cell* 104: 247-257.

**Marsh DJ, Zori RT** (2002) Genetic insights into familial cancers update and recent discoveries. *Cancer Letters* 181: 125-164.

**Maser RS**, Monsen KJ, Nelms BE, Petrini JH (1997) hMre11 and hRad50 nuclear foci are induced during the normal cellular response to DNA double-strand breaks. *Mol Cell Biol* 17: 6087-6096.

**Maser RS**, Mirzoeva OK, Wells J, Olivares H, Williams BR, Zinkel RA, Farnham PJ, Petrini JH (2001) Mre11 complex and DNA replication: linkage to E2F and sites of DNA synthesis. *Mol Cell Biol* 21: 6006-6016.

**Massague J** (2004) G1 cell-cycle control and cancer. *Nature* 432: 298-306.

**Matsuoka S**, Huang M, Elledge SJ (1998) Linkage of ATM to cell cycle regulation by the Chk2 protein kinase. *Science* 282: 1893-1897.

**Matsuoka S**, Rotman G, Ogawa A, Shiloh Y, Tamai K, Elledge SJ (2000) Ataxia telangiectasia-mutated phosphorylates Chk2 in vivo and in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 10389-10394.

**Matsuura S**, Tauchi H, Nakamura A, Kondo N, Sakamoto S, Endo S, Smeets D, Solder B, Belohradsky BH, Der Kaloustian VM, Oshimura M, Isomura M, Nakamura Y, Komatsu K (1998) Positional cloning of the gene for Nijmegen breakage syndrome. *Nat Genet* 19: 179-181.

**Meetei AR**, de Winter JP, Medhurst AL, Wallisch M, Waisfisz Q, van de Vrugt HJ, Oostra AB, Yan Z, Ling C, Bishop CE, Hoatlin ME, Joenje H, Wang W (2003) A novel ubiquitin ligase is deficient in Fanconi anemia. *Nat Genet* 35: 165-170.

**Meetei AR**, Levitus M, Xue Y, Medhurst AL, Zwaan M, Ling C, Rooimans MA, Bier P, Hoatlin M, Pals G, de Winter JP, Wang W, Joenje H (2004) X-linked inheritance of Fanconi anemia complementation group B. *Nat Genet* 36: 1219-1224.

**Meetei AR**, Medhurst AL, Ling C, Xue Y, Singh TR, Bier P, Steltenpool J, Stone S, Dokal I, Mathew CG, Hoatlin M, Joenje H, de Winter JP, Wang W (2005) A human

ortholog of archaeal DNA repair protein Hef is defective in Fanconi anemia complementation group M. *Nat Genet* 37: 958-963.

**Mérel P**, Prieur A, Pfeiffer P, Delattre O (2002) Absence of major defects in non-homologous DNA end joining in human breast cancer cell lines. *Oncogene* 21: 5654-5659.

**Mettlin C**, Croghan I, Natarajan N, Lane W (1990) The association of age and familial risk in a case-control study of breast cancer. *Am J Epidemiol* 131: 973-983.

**Mi J**, Qiao F, Wilson JB, High AA, Schroeder MJ, Stukenberg PT, Moss A, Shabanowitz J, Hunt DF, Jones NJ, Kupfer GM (2004) FANCG is phosphorylated at serines 383 and 387 during mitosis. *Mol Cell Biol* 24: 8576-8585.

**Michel B**, Flores MJ, Viguera E, Grompone G, Seigneur M, Bidnenko V (2001) Rescue of arrested replication forks by homologous recombination. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 8181-8188.

**Miki Y**, Swensen J, Shattuck-Eidens D, Futreal PA, Harshman K, Tavtigian S, Liu Q, Cochran C, Bennett LM, Ding W, Bell R, Rosenthal J, Hussey C, Tran T, McClure M, Frye C, Hattier T, Phelps R, Haugen-Strano A, Katcher H, Yakumo K, Gholami Z, Shaffer D, Stone S, Bayer S, Wray C, Bodgen R, Dayananth P, Ward J, Tonin P, Narod S, Bristow PK, Norris FH, Helvering L, Morrison P, Rosteck P, Lai M, Barrett JC, Lewis C, Neuhausen S, Cannon-Albright L, Goldgar D, Wiseman R, Kamb A, Skolnick MH (1994) A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science* 266: 66-71.

**Millikan RC**, Player JS, Decotret AR, Tse CK, Keku T (2005) Polymorphisms in DNA repair genes, medical exposure to ionizing radiation, and breast cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 14: 2326-2334.

**Montes de Oca R**, Andreassen PR, Margossian SP, Gregory RC, Taniguchi T, Wang X, Houghtaling S, Grompe M, D'Andrea AD (2005) Regulated interaction of the Fanconi anemia protein, FANCD2, with chromatin. *Blood* 105: 1003-1009.

**Moreau S**, Morgan EA, Symington LS (2001) Overlapping functions of the *Saccharomyces cerevisiae* Mre11, Exo1 and Rad27 nucleases in DNA metabolism. *Genetics* 159: 1423-1433.

- Morimatsu M**, Donoho G, Hasty P (1998) Cells deleted for Brca2 COOH terminus exhibit hypersensitivity to gamma-radiation and premature senescence. *Cancer Res* 58: 3441-3447.
- Morrell D**, Cromartie E, Swift M (1986) Mortality and cancer incidence in 263 patients with ataxia-telangiectasia. *J Natl Cancer Inst* 77: 89-92.
- Moynahan ME**, Chiu JW, Koller BH, Jasin M (1999) Brca1 controls homology-directed DNA repair. *Mol Cell* 4: 511-518.
- Moynahan ME**, Cui TY, Jasin M (2001) Homology-directed DNA repair, mitomycin-C resistance, and chromosome stability is restored with correction of a BRCA1 mutation. *Cancer Res* 61: 4842-4850.
- Mummenbrauer T**, Janus F, Müller B, Wiesmüller L, Deppert W, Grosse F (1996) p53 Protein exhibits 3'-to-5' exonuclease activity. *Cell* 85: 1089-1099.
- Nakabeppu Y**, Sakumi K, Sakamoto K, Tsuchimoto D, Tsuzuki T, Nakatsu Y (2006) Mutagenesis and carcinogenesis caused by the oxidation of nucleic acids. *Biol Chem* 387: 373-379.
- Narod SA** (1994) Genetics of breast and ovarian cancer. *British Med Bulletin* 50: 656-676.
- Narod SA, Foulkes WD** (2004) BRCA1 and BRCA2: 1994 and beyond. *Nat Rev Cancer* 4: 665-676.
- Nathanson KL**, Wooster R, Weber BL (2001) Breast cancer genetics: what we know and what we need. *Nat Med* 7: 552-556.
- Neveling K**, Bechtold A, Hoehn H (2007) Genetic instability syndromes with progeroid features. *Z Gerontol Geriatr* 40: 339-348.
- Newman B**, Austin MA, Lee M, King MC (1988) Inheritance of human breast cancer: evidence for autosomal dominant transmission in high-risk families. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85: 3044-3048.
- Nichols KE**, Malkin D, Garber JE, Fraumeni JF Jr, Li FP (2001) Germ-line p53 mutations predispose to a wide spectrum of early-onset cancers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 10: 83-87.
- Nijman SM**, Huang TT, Dirac AM, Brummelkamp TR, Kerkhoven RM, D'Andrea AD, Bernards R (2005) The deubiquitinating enzyme USP1 regulates the Fanconi anemia pathway. *Mol Cell* 17: 331-339.

**Offit K**, Pierce H, Kirchhoff T, Kolachana P, Rapaport B, Gregersen P, Johnson S, Yossepowitch O, Huang H, Satagopan J, Robson M, Scheuer L, Nafa K, Ellis N (2003) Frequency of CHEK2\*1100delC in New York breast cancer cases and controls. *BMC Med Genet* 4: 1-4.

**Offit K, Garber JE (2008)** Time to check CHEK2 in families with breast cancer? *J Clin Oncol* 26: 519-520.

**Olivier M**, Eeles R, Hollstein M, Khan MA, Harris CC, Hainaut P (2002) The IARC TP53 database: new online mutation analysis and recommendations to users. *Hum Mutat* 19: 607-614.

**Olivier M**, Langerød A, Carrieri P, Bergh J, Klaar S, Eyfjord J, Theillet C, Rodriguez C, Lidereau R, Bièche I, Varley J, Bignon Y, Uhrhammer N, Winqvist R, Jukkola-Vuorinen A, Niederacher D, Kato S, Ishioka C, Hainaut P, Børresen-Dale AL (2006) The clinical value of somatic TP53 gene mutations in 1,794 patients with breast cancer. *Clin Cancer Res.*12: 1157-1167.

**Ottman R**, Pike MC, King MC, Casagrande JT, Henderson BE (1986) Familial breast cancer in a population-based series. *Am J Epidemiol* 123: 15-21.

**Painter RB, Young BR (1980)** Radiosensitivity in ataxia-telangiectasia: A new explanation. *Proc Natl Acad Sci* 77: 7315-7317.

**Paull TT**, Cortez D, Bowers B, Elledge SJ, Gellert M (2001) Direct DNA binding by Brca1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 6086-6091.

**Perry J, Kleckner N (2003)** The ATRs, ATMs, and TORs are giant HEAT repeat proteins. *Cell* 112: 151-155.

**Peto J, Mack TM (2000)** High constance incidence in twins and other relatives of woman with breast cancer. *Nat Genet* 26: 411-414.

**Petrini JH (1999)** The mammalian Mre11-Rad50-nbs1 protein complex: integration of functions in the cellular DNA-damage response. *Am J Hum Genet* 64: 1264-1269.

**Pichierri P, Fanchitto A (2004)** Werner syndrome protein, the MRE11 complex and ATR: menage-à-trois in guarding genome stability during DNA replication? *BioEssays* 26: 306-313.

**Pichierri P, Rosselli F (2004)** The DNA crosslink-induced S-phase checkpoint depends on ATR-CHK1 and ATR-NBS1-FANCD2 pathways. *EMBO J* 23: 1178-1187.

**Pierce AJ, Jasin M (2001)** NHEJ deficiency and disease. *Mol Cell* 8: 1160-1161.

**Pierce AJ**, Stark JM, Araujo FD, Moynahan ME, Berwick M, Jasin M (2001) Double-strand breaks and tumorigenesis. *Trends Cell Biol* 11: S52-S59.

**Ponder BA** (2001) Cancer genetics. *Nature* 411: 336-341.

**Ponz de Leon M** (1994) Familial and hereditary tumors. Springer Verlag, Berlin Heidelberg New York, pp.110-132.

**Powell SN**, Willers H, Xia F (2002) BRCA2 keeps RAD51 in line. High-fidelity homologous recombination prevents breast and ovarian cancer? *Mol Cell* 10: 1262-1263.

**Qiao F**, Mi J, Wilson JB, Zhi G, Bucheimer NR, Jones NJ, Kupfer GM (2004) Phosphorylation of fanconi anemia (FA) complementation group G protein, FANCG, at serine 7 is important for function of the FA pathway. *J Biol Chem* 279: 46035-46045.

**Rahko E**, Blanco G, Soini Y, Bloigu R, Jukkola A (2003) A mutant TP53 gene status is associated with a poor prognosis and anthracycline-resistance in breast cancer patients. *Eur J Cancer* 39: 447-453.

**Rahman N, Scott RH** (2007) Cancer genes associated with phenotypes in monoallelic and biallelic mutation carriers: new lessons from old players. *Hum Mol Genet* 16: R60-R66.

**Rahman N**, Seal S, Thompson D, Kelly P, Renwick A, Elliott A, Reid S, Spanova K, Barfoot R, Chagtai T, Jayatilake H, McGuffog L, Hanks S, Evans DG, Eccles D; Breast Cancer Susceptibility Collaboration (UK), Easton DF, Stratton MR (2007) PALB2, which encodes a BRCA2-interacting protein, is a breast cancer susceptibility gene. *Nat Genet* 39: 165-167.

**Rajan JV**, Wang M, Marquis ST, Chodosh LA (1996) Brca2 is coordinately regulated with Brcal during proliferation and differentiation in mammary epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 13078-13083.

**Rashid MU**, Jakubowska A, Justenhoven C, Harth V, Pesch B, Baisch C, Pierl CB, Brüning T, Ko Y, Benner A, Wichmann HE, Brauch H, Hamann U; GENICA Network (2005) German populations with infrequent CHEK2\*1100delC and minor associations with early-onset and familial breast cancer. *Eur J Cancer* 41: 2896-2903.

**Reid S**, Renwick A, Seal S, Baskcomb L, Barfoot R, Jayatilake H, Pritchard-Jones K, Stratton MR, Ridolfi-Lüthy A, Rahman N; Breast Cancer Susceptibility Collaboration (UK); Familial Wilms Tumour Collaboration (2005) Biallelic BRCA2 mutations are

associated with multiple malignancies in childhood including familial Wilms tumour. *J Med Genet* 42: 147-151.

**Reid S**, Schindler D, Hanenberg H, Barker K, Hanks S, Kalb R, Neveling K, Kelly P, Seal S, Freund M, Wurm M, Batish SD, Lach FP, Yetgin S, Neitzel H, Ariffin H, Tischkowitz M, Mathew CG, Auerbach AD, Rahman N (2007) Biallelic mutations in PALB2 cause Fanconi anemia subtype FA-N and predispose to childhood cancer. *Nat Genet* 39: 162-164.

**Renwick A**, Thompson D, Seal S, Kelly P, Chagtai T, Ahmed M, North B, Jayatilake H, Barfoot R, Spanova K, McGuffog L, Evans DG, Eccles D; Breast Cancer Susceptibility Collaboration (UK), Easton DF, Stratton MR, Rahman N (2006) ATM mutations that cause ataxia-telangiectasia are breast cancer susceptibility alleles. *Nat Genet* 38: 873-875.

**Rodriguez JA**, Au WW, Henderson BR (2004) Cytoplasmic mislocalization of BRCA1 caused by cancer-associated mutations in the BRCT domain. *Exp Cell Res* 293: 14-21.

**Roseman DL**, Straus AK, Shorey W (1990) A positive family history of breast cancer. Does it effect diminish with age? *Arch Intern Med* 150: 191-194.

**Rothfuss A**, Grompe M (2004) Repair kinetics of genomic interstrand DNA cross-links: evidence for DNA double-strand break-dependent activation of the Fanconi anemia/BRCA pathway. *Mol Cell Biol* 24: 123-134.

**Rothkamm K**, Krüger I, Thompson LH, Löbrich M (2003) Pathways of DNA double-strand break repair during the mammalian cell cycle. *Mol Cell Biol* 23: 5706-5715.

**Roznowski K**, Januszkiewicz-Lewandowska D, Mosor M, Pernak M, Litwiniuk M, Nowak J (2008) I171V germline mutation in the NBS1 gene significantly increases risk of breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 110: 343-348.

**Ruffner H**, Jiang W, Craig AG, Hunter T, Verma IM (1999) BRCA1 is phosphorylated at serine 1497 in vivo at a cyclin-dependent kinase 2 phosphorylation site. *Mol Cell Biol* 19: 4843-4854.

**Satagopan JM**, Offit K, Foulkes W, Robson ME, Wacholder S, Eng CM, Karp SE, Begg CB (2001) The lifetime risks of breast cancer in Ashkenazi Jewish carriers of BRCA1 and BRCA2 mutations. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 10: 467-473.

**Savitsky K**, Bar-Shira A, Gilad S, Rotman G, Ziv Y, Vanagaite L, Tagle DA, Smith S, Uziel T, Sfez S, Ashkenazi M, Pecker I, Frydman M, Harnik R, Patanjali SR, Simmons

A, Clines GA, Sartiel A, Gatti RA, Chessa L, Sanal O, Lavin MF, Jaspers NG, Taylor AM, Arlett CF, Miki T, Weissman SM, Lovett M, Collins FS, Shiloh Y (1995) A single ataxia telangiectasia gene with a product similar to PI-3 kinase. *Science* 268: 1749-1753.

**Schmidt MK**, Tollenaar RA, de Kemp SR, Broeks A, Cornelisse CJ, Smit VT, Peterse JL, van Leeuwen FE, Van't Veer LJ (2007) Breast cancer survival and tumor characteristics in premenopausal women carrying the CHEK2\*1100delC germline mutation. *J Clin Oncol* 25: 64-69.

**Schultz LB, Weber BL** (1999) Recent advances in breast cancer biology. *Curr Opin Oncol* 11: 429-434.

**Scully R**, Chen J, Plug A, Xiao Y, Weaver D, Feunteun J, Ashley T, Livingston DM (1997) Association of BRCA1 with Rad51 in mitotic and meiotic cells. *Cell* 88: 265-275.

**Seal S**, Thompson D, Renwick A, Elliott A, Kelly P, Barfoot R, Chagtai T, Jayatilake H, Ahmed M, Spanova K, North B, McGuffog L, Evans DG, Eccles D; Breast Cancer Susceptibility Collaboration (UK), Easton DF, Stratton MR, Rahman N (2006) Truncating mutations in the Fanconi anemia J gene BRIP1 are low-penetrance breast cancer susceptibility alleles. *Nat Genet* 38: 1239-1241.

**Seemanová E**, Sperling K, Neitzel H, Varon R, Hadac J, Butova O, Schröck E, Seeman P, Digweed M (2006) Nijmegen breakage syndrome (NBS) with neurological abnormalities and without chromosomal instability. *J Med Genet* 43: 218-224.

**Serova O**, Montagna M, Torchard D, Narod SA, Tonin P, Sylla B, Lynch HT, Feunteun J, Lenoir GM (1996) A high incidence of BRCA1 mutations in 20 breast-ovarian cancer families. *A J Hum Genet* 58: 42-51.

**Shiloh Y** (1997) Ataxia-telangiectasia and the Nijmegen breakage syndrome: related disorders but genes apart. *Annu Rev Genet* 31: 635-662.

**Sigismund S**, Polo S, Di Fiore PP (2004) Signaling through monoubiquitination. *Curr Top Microbiol Immunol* 286: 149-185.

**Sigurdson AJ**, Hauptmann M, Chatterjee N, Alexander BH, Doody MM, Rutter JL, Struwing JP (2004) Kin-cohort estimates for familial breast cancer risk in relation to variants in DNA base excision repair, BRCA1 interacting and growth factor genes. *BMC Cancer* 4: 9-21.

**Sims AE**, Spiteri E, Sims RJ 3rd, Arita AG, Lach FP, Landers T, Wurm M, Freund M, Neveling K, Hanenberg H, Auerbach AD, Huang TT (2007) FANCI is a second monoubiquitinated member of the Fanconi anemia pathway. *Nat Struct Mol Biol* 14: 564-567.

**Slatterly ML, Kerber RA (1993)** A comprehensive evaluation of family history and breast cancer risk. The Utah Population Database. *Jama* 270: 1563-1568.

**Smith GC**, Cary RB, Lakin ND, Hann BC, Teo SH, Chen DJ, Jackson SP (1999) Purification and DNA binding properties of the ataxia-telangiectasia gene product ATM. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 11134-11139.

**Smith J**, Baldeyron C, De Oliveira I, Sala-Trepat M, Papadopoulo D (2001) The influence of DNA double-strand break structure on end-joining in human cells. *Nucleic Acids Res* 29: 4783-4792.

**Smith P**, McGuffog L, Easton DF, Mann GJ, Pupo GM, Newman B, Chenevix-Trench G; kConFab Investigators, Szabo C, Southey M, Renard H, Odefrey F, Lynch H, Stoppa-Lyonnet D, Couch F, Hopper JL, Giles GG, McCredie MR, Buys S, Andrulis I, Senie R; BCFS, BRCA1 Collaborators Group, Goldgar DE, Oldenburg R, Kroeze-Jansema K, Kraan J, Meijers-Heijboer H, Klijn JG, van Asperen C, van Leeuwen I, Vasen HF, Cornelisse CJ, Devilee P, Baskcomb L, Seal S, Barfoot R, Mangion J, Hall A, Edkins S, Rapley E, Wooster R, Chang-Claude J, Eccles D, Evans DG, Futreal PA, Nathanson KL, Weber BL; Breast Cancer Susceptibility Collaboration (UK), Rahman N, Stratton MR (2006) A genome wide linkage search for breast cancer susceptibility genes. *Genes Chromosomes Cancer* 45: 646-655.

**Smith TR**, Levine EA, Perrier ND, Miller MS, Freimanis RI, Lohman K, Case LD, Xu J, Mohrenweiser HW, Hu JJ (2003) DNA-repair genetic polymorphisms and breast cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 12 (11 Pt 1): 1200-1204.

**Smogorzewska A**, Matsuoka S, Vinciguerra P, McDonald ER 3rd, Hurov KE, Luo J, Ballif BA, Gygi SP, Hofmann K, D'Andrea AD, Elledge SJ (2007) Identification of the FANCI protein, a monoubiquitinated FANCD2 paralog required for DNA repair. *Cell* 129: 289-301.

**Sobhian B**, Shao G, Lilli DR, Culhane AC, Moreau LA, Xia B, Livingston DM, Greenberg RA (2007) RAP80 targets BRCA1 to specific ubiquitin structures at DNA damage sites. *Science* 316: 1198-1202.

- Somasundaram K**, Zhang H, Zeng YX, Houvras Y, Peng Y, Zhang H, Wu GS, Licht JD, Weber BL, El-Deiry WS (1997) Arrest of the cell cycle by the tumour-suppressor BRCA1 requires the CDK-inhibitor p21WAF1/CiP1. *Nature* 389: 187-190.
- Song H**, Ramus SJ, Kjaer SK, Hogdall E, Dicioccio RA, Whittemore AS, McGuire V, Hogdall C, Jacobs IJ, Easton DF, Ponder BA, Dunning AM, Gayther SA, Pharoah PD (2007) Tagging single nucleotide polymorphisms in the BRIP1 gene and susceptibility to breast and ovarian cancer. *PLoS ONE* 2: e268-e275.
- Soussi T, Bérout C** (2001) Assessing TP53 status in human tumours to evaluate clinical outcome. *Nat Rev Cancer* 1: 233-240.
- Soussi T**, Ishioka C, Claustres M, Bérout C (2006) Locus-specific mutation databases: pitfalls and good practice based on the p53 experience. *Nat Rev Cancer* 6: 83-90.
- Stankovic T**, Stewart GS, Byrd P, Fegan C, Moss PA, Taylor AM (2002) ATM mutations in sporadic lymphoid tumours. *Leuk Lymphoma* 43: 1563-1571.
- Stark JM**, Pierce AJ, Oh J, Pastink A, Jasin M (2004) Genetic steps of mammalian homologous repair with distinct mutagenic consequences. *Mol and Cell Biol* 24: 9305-9316.
- Steffen J**, Nowakowska D, Niwińska A, Czapczak D, Kluska A, Piatkowska M, Wiśniewska A, Paszko Z (2006) Germline mutations 657del5 of the NBS1 gene contribute significantly to the incidence of breast cancer in Central Poland. *Int J Cancer* 119: 472-475.
- Stratton MR, Rahman N** (2008) The emerging landscape of breast cancer susceptibility. *Nat Genet* 40: 17-22.
- Struewing JP**, Abeliovich D, Peretz T, Avishai N, Kaback MM, Collins FS, Brody LC (1995) The carrier frequency of the BRCA1 185delAG mutation is approximately 1 percent in Ashkenazi Jewish individuals. *Nat Genet* 11: 198-200.
- Struewing JP**, Hartge P, Wacholder S, Baker SM, Berlin M, McAdams M, Timmerman MM, Brody LC, Tucker MA (1997) The risk of cancer associated with specific mutations of BRCA1 and BRCA2 among Ashkenazi Jews. *N Engl J Med* 336: 1401-1408.
- Sullivan A**, Yuille M, Repellin C, Reddy A, Reelfs O, Bell A, Dunne B, Gusterson BA, Osin P, Farrell PJ, Yulug I, Evans A, Ozcelik T, Gasco M, Crook T (2002) Concomitant inactivation of p53 and Chk2 in breast cancer. *Oncogene* 21: 1316-1324.

- Sun Z**, Hsiao J, Fay DS, Stern DF (1998) Rad53 FHA domain associated with phosphorylated Rad9 in the DNA damage checkpoint. *Science* 281: 272-274.
- Swift M**, Morrell D, Cromartie E, Chamberlin AR, Skolnick MH, Bishop DT (1986) The incidence and gene frequency of ataxia-telangiectasia in the United States. *Am J Hum Genet* 39: 573-583.
- Swift M**, Reitnauer PJ, Morrell D, Chase CL (1987) Breast and other cancers in families with ataxia-telangiectasia. *N Engl J Med* 316: 1289-1294.
- Syrjäkoski K**, Vahteristo P, Eerola H, Tamminen A, Kivinummi K, Sarantaus L, Holli K, Blomqvist C, Kallioniemi OP, Kainu T, Nevanlinna H (2000) Population-based study of BRCA1 and BRCA2 mutations in 1035 unselected Finnish breast cancer patients. *J Natl Cancer Inst* 92: 1529-1531.
- Szipirer C**, **Szipirer J** (2007) Mammary cancer susceptibility: human genes and rodent models. *Mamm Genome* 18: 817-831.
- Takata M**, Sasaki MS, Sonoda E, Morrison C, Hashimoto M, Utsumi H, Yamaguchi-Iwai Y, Shinohara A, Takeda S (1998) Homologous recombination and non-homologous end-joining pathways of DNA double-strand break repair have overlapping roles in the maintenance of chromosomal integrity in vertebrate cells. *EMBO J* 17: 5497-5508.
- Tanaka H**, Arakawa H, Yamaguchi T, Shiraishi K, Fukuda S, Matsui K, Takei Y, Nakamura Y (2000) A ribonucleotide reductase gene involved in a p53-dependent cell-cycle checkpoint for DNA damage. *Nature* 404: 42-49.
- Taniguchi T**, **D'Andrea AD** (2002) The Fanconi anemia protein, FANCE, promotes the nuclear accumulation of FANCC. *Blood* 100: 2457-2462.
- Taniguchi T**, Garcia-Higuera I, Xu B, Andreassen PR, Gregory RC, Kim ST, Lane WS, Kastan MB, D'Andrea AD (2002) Convergence of the fanconi anemia and ataxia telangiectasia signaling pathways. *Cell* 109: 459-472.
- Taylor AM**, **Byrd PJ** (2005) Molecular pathology of ataxia telangiectasia. *J Clin Pathol* 58: 1009-1015.
- Teng DH**, Bogden R, Mitchell J, Baumgard M, Bell R, Berry S, Davis T, Ha PC, Kehrer R, Jammulapati S, Chen Q, Offit K, Skolnick MH, Tavtigian SV, Jhanwar S, Swedlund B, Wong AK, Kamb A (1996) Low incidence of BRCA2 mutations in breast carcinoma and other cancers. *Nat Genet* 13: 241-244.

**Teng LS, Zheng Y, Wang HH (2008)** BRCA1/2 associated hereditary breast cancer. *J Zhejiang Univ Sci B* 9: 85-89.

**The Fanconi anaemia/breast cancer consortium (1996)** Positional cloning of the Fanconi anaemia group A gene. *Nat Genet* 14: 324-328.

**Thompson D, Duedal S, Kirner J, McGuffog L, Last J, Reiman A, Byrd P, Taylor M, Easton DF (2005)** Cancer risks and mortality in heterozygous ATM mutation carriers. *J Natl Cancer Inst* 97: 813-822.

**Thompson LH, Hinz JM, Yamada NA, Jones NJ (2005)** How Fanconi anemia proteins promote the four Rs: replication, recombination, repair, and recovery. *Environ Mol Mutagen* 45: 128-142.

**Thompson ME, Jensen RA, Obermiller PS, Page DL, Holt JT (1995)** Decreased expression of BRCA1 accelerates growth and is often present during sporadic breast cancer progression. *Nat Genet* 9: 444-450.

**Thorlacius S, Struewing JP, Hartge P, Olafsdottir GH, Sigvaldason H, Tryggvadottir L, Wacholder S, Tulinius H, Eyfjörd JE (1998)** Population-based study of risk of breast cancer in carriers of BRCA2 mutation. *Lancet* 352: 1337-1339.

**Tibbetts RS, Cortez D, Brumbaugh KM, Scully R, Livingston D, Elledge SJ, Abraham RT (2000)** Functional interactions between BRCA1 and the checkpoint kinase ATR during genotoxic stress. *Genes Dev* 14: 2989-3002.

**Tischkowitz MD, Hodgson SV (2003)** Fanconi anaemia. *J Med Genet* 40: 1-10.

**Tischkowitz M, Xia B, Sabbaghian N, Reis-Filho JS, Hamel N, Li G, van Beers EH, Li L, Khalil T, Quenneville LA, Omeroglu A, Poll A, Lepage P, Wong N, Nederlof PM, Ashworth A, Tonin PN, Narod SA, Livingston DM, Foulkes WD (2007)** Analysis of PALB2/FANCN-associated breast cancer families. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 6788-6793.

**Turner N, Tutt A, Ashworth A (2004)** Hallmarks of 'BRCAness' in sporadic cancers. *Nat Rev Cancer* 4: 814-819.

**Tutt A, Gabriel A, Bertwistle D, Connor F, Paterson H, Peacock J, Ross G, Ashworth A (1999)** Absence of Brca2 causes genome instability by chromosome breakage and loss associated with centrosome amplification. *Curr Biol* 9: 1107-1110.

**Umezu K, Sugawara N, Chen C, Haber JE, Kolodner RD (1998)** Genetic analysis of yeast RPA1 reveals its multiple functions in DNA metabolism. *Genetics* 148: 989-1005.

**Vacek PM, Geller BM (2004)** A prospective study of breast cancer risk using routine mammographic breast density measurements. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 13: 715-722.

**Vahteristo P, Tamminen A, Karvinen P, Eerola H, Eklund C, Aaltonen LA, Blomqvist C, Aittomäki K, Nevanlinna H (2001)** p53, CHK2, and CHK1 genes in Finnish families with Li-Fraumeni syndrome: further evidence of CHK2 in inherited cancer predisposition. *Cancer Res* 61: 5718-5722.

**Vahteristo P, Bartkova J, Eerola H, Syrjäkoski K, Ojala S, Kilpivaara O, Tamminen A, Kononen J, Aittomäki K, Heikkilä P, Holli K, Blomqvist C, Bartek J, Kallioniemi OP, Nevanlinna H (2002)** A CHEK2 genetic variant contributing to a substantial fraction of familial breast cancer. *Am J Hum Genet* 71: 432-438.

**Valerie K, Povirk LF (2003)** Regulation and mechanisms of mammalian double-strand break repair. *Oncogene* 22: 5792-5812.

**Van Gent DC, Hoeijmakers JH, Kanaar R (2001)** Chromosomal stability and the DNA double-stranded break connection. *Nat Rev Genet* 2: 196-206.

**Van Puijenbroek M, van Asperen CJ, van Mil A, Devilee P, van Wezel T, Morreau H (2005)** Homozygosity for a CHEK2\*1100delC mutation identified in familial colorectal cancer does not lead to a severe clinical phenotype. *J Pathol* 206: 198-204.

**Varley JM, Evans DG, Birch JM (1997)** Li-Fraumeni syndrome-a molecular and clinical review. *Br J Cancer* 76: 1-14.

**Varley JM (2003)** Germline TP53 mutations and Li-Fraumeni syndrome. *Hum Mutat* 21: 313-320.

**Vogelstein B, Lane D, Levine AJ (2000)** Surfing the p53 network. *Nature* 408: 307-

**Waite KA, Eng C (2002)** Protean PTEN: Form and Function. *Am J Hum Genet* 70: 829-844.

**Walsh T, Casadei S, Coats KH, Swisher E, Stray SM, Higgins J, Roach KC, Mandell J, Lee MK, Ciernikova S, Foretova L, Soucek P, King MC (2006)** Spectrum of mutations in BRCA1, BRCA2, CHEK2, and TP53 in families at high risk of breast cancer. *JAMA* 295: 1379-1388.

**Walsh T, King MC (2007)** Ten genes for inherited breast cancer. *Cancer Cell* 11: 103-105.

**Wang H**, Zeng ZC, Bui TA, DiBiase SJ, Qin W, Xia F, Powell SN, Iliakis G (2001) Nonhomologous end-joining of ionizing radiation-induced DNA double-stranded breaks in human tumor cells deficient in BRCA1 or BRCA2. *Cancer Res* 61: 270-277.

**Wang HC**, Chou WC, Shieh SY, Shen CY (2006) Ataxia telangiectasia mutated and checkpoint kinase 2 regulate BRCA1 to promote the fidelity of DNA end-joining. *Cancer Res* 66: 1391-1400.

**Wang W** (2007) Emergence of a DNA-damage response network consisting of Fanconi anaemia and BRCA proteins. *Nat Rev Genet* 8: 735-748.

**Wang X**, Andreassen PR, D'Andrea AD (2004) Functional interaction of monoubiquitinated FANCD2 and BRCA2/FANCD1 in chromatin. *Mol Cell Biol* 24: 5850-5862.

**Wang Y**, Cortez D, Yazdi P, Neff N, Elledge SJ, Qin J (2000) BASC, a super complex of BRCA1-associated proteins involved in the recognition and repair of aberrant DNA structures. *Genes Dev* 14: 927-939.

**Weber BL, Garber JE** (1993) Family history and breast cancer, probabilities and possibilities. *JAMA* 270: 1602-1603.

**Weinberg RL**, Freund SM, Veprintsev DB, Bycroft M, Fersht AR (2004) Regulation of DNA binding of p53 by its C-terminal domain. *J Mol Biol* 342: 801-811.

**Weischer M**, Bojesen SE, Ellervik C, Tybjaerg-Hansen A, Nordestgaard BG (2008) CHEK2\*1100delC genotyping for clinical assessment of breast cancer risk: meta-analyses of 26,000 patient cases and 27,000 controls. *J Clin Oncol* 26: 542-548.

**Welsh PL**, Owens KN, King MC (2000) Insights into the functions of BRCA1 and BRCA2. *Trends Genet* 16: 69-74.

**West SC** (2003) Molecular views of recombination proteins and their control. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4: 435-445.

**Williamson EA**, Dadmanesh F, Koeffler HP (2002) BRCA1 transactivates the cyclin-dependent kinase inhibitor p27(Kip1). *Oncogene* 21: 3199-3206.

**Wilson JH, Elledge SJ** (2002) Cancer. BRCA2 enters the fray. *Science* 297: 1822-1823.

**Wirtenberger M**, Frank B, Hemminki K, Klaes R, Schmutzler RK, Wappenschmidt B, Meindl A, Kiechle M, Arnold N, Weber BH, Niederacher D, Bartram CR, Burwinkel

B (2006) Interaction of Werner and Bloom syndrome genes with p53 in familial breast cancer. *Carcinogenesis* 27: 1655-1660.

**Wong AK**, Pero R, Ormonde PA, Tavtigian SV, Bartel PL (1997) RAD51 interacts with the evolutionarily conserved BRC motifs in the human breast cancer susceptibility gene *brca2*. *J Biol Chem* 272: 31941-31944.

**Wood RD**, Mitchell M, Lindahl T (2005) Human DNA repair genes, 2005. *Mutat Res* 577: 275-283.

**Wooster R**, Neuhausen SL, Mangion J, Quirk Y, Ford D, Collins N, Nguyen K, Seal S, Tran T, Averill D, Fields P, Marshall G, Narod S, Lenoir GM, Lynch H, Feunteun J, Devilee P, Cornelisse CJ, Menko FH, Daly PA, Ormiston W, McManus R, Pye C, Lewis CM, Cannon-Albright LA, Peto J, Ponder BAJ, Skolnick MH, Easton D.F, Goldgar DE, Stratton MR (1994) Lokalisation of the breast cancer susceptibility gene, *BRCA2*, to chromosome 13q12-13. *Science* 265: 2088-2090.

**Wooster R**, **Weber BL** (2003) Breast and ovarian cancer. *N Engl J Med* 348: 2339-2347.

**Wu LC**, Wang ZW, Tsan JT, Spillman MA, Phung A, Xu XL, Yang MC, Hwang LY, Bowcock AM, Baer R (1996) Identification of a RING protein that can interact in vivo with the *BRCA1* gene product. *Nat Genet* 14: 430-440.

**Wu X**, Ranganathan V, Weisman DS, Heine WF, Ciccone DN, O'Neill TB, Crick KE, Pierce KA, Lane WS, Rathbun G, Livingston DM, Weaver DT (2000) ATM phosphorylation of Nijmegen breakage syndrome protein is required in a DNA damage response. *Nature* 405: 477-482.

**[www.benaroyaresearch.org](http://www.benaroyaresearch.org) (Stand Juli 2008).**

**[www.cancer.org](http://www.cancer.org) (2007)** Breast Cancer Facts & Figures 2007. American Cancer Society Inc. Atlanta, Georgia.

**[www.cgal.icnet.uk/DNA\\_Repair\\_Genes.html](http://www.cgal.icnet.uk/DNA_Repair_Genes.html) (2008)** update of the original supplement: Wood RD, Mitchell M, Lindahl T (2005) Human DNA repair genes, 2005. *Mutat Res* 577: 275-283.

**[www.gekid.de](http://www.gekid.de) (2008)** Krebs in Deutschland 2003-2004. Häufigkeiten und Trends. 6. überarbeitete Auflage. Robert-Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg). Berlin, 2008.

**[www-p53.iarc.fr/](http://www-p53.iarc.fr/) (Stand August 2008).**

**www.rki.de (2005)** Gesundheitsberichterstattung des Bundes - Heft 25, Brustkrebs. Robert-Koch-Institut. Berlin, 2005.

**Xia B**, Sheng Q, Nakanishi K, Ohashi A, Wu J, Christ N, Liu X, Jasin M, Couch FJ, Livingston DM (2006) Control of BRCA2 cellular and clinical functions by a nuclear partner, PALB2. *Mol Cell* 22: 719-729.

**Xu B**, O'Donnell AH, Kim ST, Kastan MB (2002) Phosphorylation of Serin 1387 in BRCA1 is specifically required for the ATM-mediated S-phase checkpoint after ionizing irradiation. *Cancer Res* 62: 4588-4591.

**Yarden RI**, Pardo-Reoyo S, Sgagias M, Cowan KH, Brody LC (2002) BRCA1 regulates the G2/M checkpoint by activating Chk1 kinase upon DNA damage. *Nat Genet* 30: 285-289.

**Yu X**, Chini CC, He M, Mer G, Chen J (2003) The BRCT domain is a phospho-protein binding domain. *Science* 302: 639-642.

**Yuan SS**, Lee SY, Chen G, Song M, Tomlinson GE, Lee EY (1999) BRCA2 is required for ionizing radiation-induced assembly of Rad51 complex in vivo. *Cancer Res* 59: 3547-3551.

**Zalcenstein A**, Stambolsky P, Weisz L, Müller M, Wallach D, Goncharov TM, Krammer PH, Rotter V, Oren M (2003) Mutant p53 gain of function: repression of CD95(Fas/APO-1) gene expression by tumor-associated p53 mutants. *Oncogene* 22: 5667-5676.

**Zelada-Hedman M**, Wasteson Arver B, Claro A, Chen J, Werelius B, Kok H, Sandelin K, Håkansson S, Andersen TI, Borg A, Børresen Dale AL, Lindblom A (1997) A screening for BRCA1 mutations in breast and breast-ovarian cancer families from the Stockholm region. *Cancer Res* 57: 2474-2477.

**Zhang H**, Somasundaram K, Peng Y, Tian H, Zhang H, Bi D, Weber BL, El-Deiry WS (1998a) BRCA1 physically associates with p53 and stimulates its transcriptional activity. *Oncogene* 16: 1713-1721.

**Zhang H**, Tomblin G, Weber BL (1998b) BRCA1, BRCA2 and the DNA damage response: collision or collusion? *Cell* 92: 433-436.

**Zhang J**, Willers H, Feng Z, Ghosh JC, Kim S, Weaver DT, Chung JH, Powell SN, Xia F (2004) Chk2 phosphorylation of BRCA1 regulates DNA double-strand break repair. *Mol Cell Biol* 24: 708-718.

**Zhang J, Powell SN (2005)** The role of the BRCA1 tumor suppressor in DNA double-strand break repair. *Mol Cancer Res* 3: 531-539.

**Zhao S, Weng YC, Yuan SS, Lin YT, Hsu HC, Lin SC, Gerbino E, Song MH, Zdzienicka MZ, Gatti RA, Shay JW, Ziv Y, Shiloh Y, Lee EY (2000)** Functional link between ataxia-telangiectasia and Nijmegen breakage syndrome gene products. *Nature* 405: 473-477.

**Zhao S, Renthal W, Lee EY (2002)** Functional analysis of FHA and BRCT domains of NBS1 in chromatin association and DNA damage responses. *Nucleic Acids Res* 30: 4815-4822.

**Zhong Q, Chen CF, Li S, Chen Y, Wang CC, Xiao J, Chen PL, Sharp ZD, Lee WH (1999)** Association of BRCA1 with the hRad50-hMre11-p95 complex and the DNA damage response. *Science* 285: 747-750.

**Zhong Q, Chen CF, Chen PL, Lee WH (2002)** BRCA1 facilitates microhomology-mediated end joining of DNA double strand breaks. *J Biol Chem* 277: 28641-28647.

**Zhou B-BS, Elledge SJ (2000)** The DNA damage response putting checkpoints in perspective. *Nature* 408: 433-439.

**Zhuang J, Zhang J, Willers H, Wang H, Chung JH, van Gent DC, Hallahan DE, Powell SN, Xia F (2006)** Checkpoint kinase 2-mediated phosphorylation of BRCA1 regulates the fidelity of nonhomologous end-joining. *Cancer Res* 66: 1401-1408.

**Ziółkowska I, Mosor M, Nowak J (2006)** Regional distribution of heterozygous 657del5 mutation carriers of the NBS1 gene in Wielkopolska province (Poland). *J Appl Genet* 47: 269-272.