

KRZYSZTOF DOMAGALSKI, ANDRZEJ TRETYN

*Katedra Fizjologii Roślin i Biotechnologii UMK
Uniwersytet Mikołaja Kopernika
Gagarina 9, 87-100 Toruń
E-mail: kdkrydom@gmail.com
prat@umk.pl*

ROŚLINNE HOMOLOGIE GENÓW ZWIĄZANYCH Z DZIEDZICZNĄ PREDYSPOZYCJĄ DO RAKA PIERSI I JAJNIKA

WSTĘP

Zjawiskiem leżącym u podstaw procesu nowotworzenia i jednocześnie charakteryzującym komórki nowotworowe jest niestabilność genetyczna. Wynika ona z dysfunkcji genów zaangażowanych w wykrywanie i naprawę uszkodzeń DNA. Dlatego w komórkach nowotworowych, w porównaniu do prawidłowych, obserwuje się mniej skuteczną naprawę uszkodzonego DNA, a osoby posiadające wrodzone (dziedziczne) mutacje w genach warunkujących utrzymanie integralności genomu są niezwykle skłonne do nowotworów (HANAHAN i WEINBERG 2000, SZUMEL 2003). Dwuniciowe pęknięcia DNA (ang. double-strand break, DSB) należą do najgroźniejszych uszkodzeń, które mogą prowadzić do powstania aberracji chromosomowych lub utraty części materiału genetycznego. Dlatego też podstawowym warunkiem utrzymania integralności genomu jest właściwe działanie systemów naprawy DSB. W komórkach eukariotycznych DSB mogą być usuwane drogą rekombinacji homologicznej (ang. homologous recombination, HR) lub poprzez łączenie niehomologicznych końców (ang. nonhomologous end joining, NHEJ). W mechanizmie HR do naprawy DNA wykorzystywana jest informacja genetyczna siostrzanej chromatyny lub homologicznego chromosomu, podczas gdy NHEJ polega na bezpośrednim łączeniu uszkodzonych końców. HR uważana jest więc za system naprawy DNA charakteryzujący się wyższą dokładnością w porównaniu do NHEJ, które może prowadzić

do zmian, w tym utraty informacji genetycznej (POPLAWSKI i BŁASIAK 2006). Jednymi z najbardziej rozpoznawanych genów związanych z naprawą dwuniciowych pęknięć DNA przez HR i utrzymaniem stabilności genomu są geny *BRCA1* i *BRCA2* (ang. breast cancer susceptibility gene 1/2), których wrodzone mutacje u człowieka predysponują do raka piersi i jajnika (VENKITARAMAN 2002, BILLACK i MONTEIRO 2005).

Za szczególnie istotne w utrzymaniu stabilności genomu uważane są także produkty genów wchodzące w skład szlaków integrujących wykrywanie i inicjowanie naprawy DNA oraz zablokowanie cyklu komórkowego do czasu, kiedy uszkodzenia zostaną usunięte z genomu. Białka tych szlaków wpływają pośrednio na proliferację lub przeżycie komórek dzięki stwarzaniu możliwości naprawy uszkodzeń genów, szczególnie tych zaangażowanych w podziały, przeżycie i śmierć komórki. W komórkach człowieka jednym z takich integratorów odpowiedzi na uszkodzenia DNA jest białko p53, produkt genu *TP53* (ang. transcription factor 53), powszechnie nazywany strażnikiem genomu (HANAHAN i WEINBERG 2000). Ryzyko rozwoju różnego typu nowotworów, w tym raka piersi i jajnika, wykazano także dla osób dziedzicznie obciążonych mutacjami w genie *TP53* (STRATTON i RAHMAN 2008).

Podobnie jak u zwierząt, w organizmach roślinnych wykryto istnienie zakonserwowanych ewolucyjnie elementów szlaków mo-

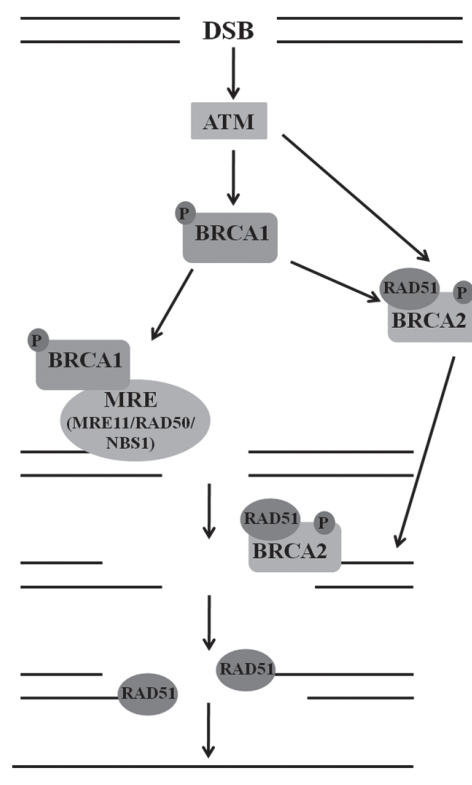
lekularnych związanych z regulacją cyklu komórkowego i naprawą DNA (BLEUYARD i współaut. 2006, DE VEYLDER i współaut.

2007). Dotyczy to również produktów genów *BRCA1*, *BRCA2* i *TP53*.

BRCA1

BRCA1 jest genem supresorowym nowotworu, którego mutacje najsilniej predysponują do nowotworów sutka i jajnika (JASIŃSKA i KRZYŻOSIAK 2001, BILLACK i MONTEIRO 2005). Produkt białkowy genu *BRCA1* uczestniczy w różnych procesach komórkowych związanych z zachowaniem integralności genomu: w wykrywaniu i naprawie DSB, sprzężonej z transkrypcją naprawie DNA i kontroli cyklu komórkowego (JASIŃSKA i KRZYŻOSIAK 2001, TING i LEE 2004). W wyniku detekcji i przekazania sygnału o uszkodzeniu DNA za pośrednictwem białek ATM i ATR oraz kinazy efektorowej CHK2, białko *BRCA1* ulega fosforylacji i aktywacji (TUTT i ASHWORTH 2002, TING i LEE 2004). Aktywny *BRCA1* współtworzy skupienia białek (ang. nuclear foci) w miejscach uszkodzeń DNA, które biorą udział w dalszym przekazywaniu informacji o uszkodzeniu DNA i jego naprawie. W rejonach tych białko *BRCA1* generuje między innymi powstanie wielobiałkowego kompleksu naprawczego zwanego BASC (ang. BRCA1-associated genome surveillance complex), który może wpływać na wybór drogi naprawy zależny od typu uszkodzeń DNA. W skład kompleksu BASC, obok *BRCA1*, wchodzi składniki systemu naprawy niesparowanych zasad *MSH2*, *MSH6*, *MLH1*, białka wykrycia i naprawy dwuniciowych pęknięć jak *ATM*, kompleks MRN złożony z białek *MRE11*, *RAD50* i *NBS1*, a także helikaza *BLM*, związana z rekombinacją DNA, i czynnik replikacyjny *C* (*RFC*) (TUTT i ASHWORTH 2002, NOWACKA-ZAWISZA i KRAJEWSKA 2009). Białko *BRCA1*, dzięki wiązaniu się z kompleksem MRN poprzez *RAD50*, reguluje proces naprawy dwuniciowych pęknięć DNA na drodze HR. Kompleks MRN wiąże się do miejsc pęknięcia i generuje powstawanie jednoniciowego DNA dokonującego inwazji na homologiczny fragment DNA. Związek *BRCA1* z HR ujawniają także badania, w których wykazano jego kolokalizację w miejscach uszkodzenia i oddziaływanie za pośrednictwem *BRCA2* z białkiem *RAD51*, będącym głównym składnikiem maszynerii biorącej udział w naprawie DSB przez HR. *BRCA1* moduluje aktywność *RAD51* choć nie ma możliwości samodzielnego wiązania tego białka (TUTT i

ASHWORTH 2002, TING i LEE 2004, NOWACKA-ZAWISZA i KRAJEWSKA 2009) (Ryc. 1). Systemy HR uczestniczą także w szlakach reperacji



Ryc. 1. Schemat przedstawiający udział białek BRCA w naprawie dwuniciowych pęknięć DNA (DSB) drogą rekombinacji homologicznej. Na podstawie BLEUYARD i współaut. 2006, NOWACKA-ZAWISZA i KRAJEWSKA 2009, zmodyfikowane.

W wyniku wykrycia uszkodzenia DNA białka BRCA ulegają aktywacji poprzez fosforylację. Zaktywowane *BRCA1* reguluje aktywność kompleksu MRN związanego w miejscu uszkodzenia, promując tworzenie fragmentów jednoniciowego DNA a także oddziałuje z *BRCA2*, dzięki czemu może wpływać na kluczowe białko tego procesu – *RAD51*. Możliwość bezpośredniego oddziaływania z *RAD51* ma białko *BRCA2*. Zaktywowane białko *BRCA2* kieruje związane białka *RAD51* w miejsce uszkodzenia oraz uczestniczy w wiązaniu *RAD51* z DNA. *RAD51* wiąże się do DNA tworząc nukleoproteinowe filamenty, które pośredniczą w homologicznej wymianie nici. Obecność genów wszystkich białek umieszczonych na schemacie stwierdzono także u roślin.

wewnątrzniowych wiązań krzyżowych ICL (ang. inter-strand cross link, ICL) indukowanych przez mitomycynę C (MMC). Wrażliwość komórek pozbawionych BRCA1 na MMC oraz wykazanie kluczowej roli BRCA1 w angażowaniu białka FANCD2 działającego w szlakach reperacji ICL wskazuje na udział BRCA1 w tym szlaku naprawy wykorzystującym system HR (TING i LEE 2004).

BRCA1 uczestniczy w regulacji ekspresji genów szlaków odpowiedzi na uszkodzenie DNA poprzez możliwość interakcji i działania jako selektywny koregulator czynników transkrypcyjnych oraz białek modyfikujących strukturę chromatyny. Do białek tych należą koaktywatory o aktywności acetylotransferazy histonowej (p300 i CBP), białko RB, RBAp46, RBAp48, deacetylazy histonowe HDAC1 i HDAC2, podjednostka kompleksu czynników SWI/SNF BRG1 oraz białko CtIP wiążące represor CtBP. BRCA1 oddziałuje także z białkiem p53, przez co stabilizuje je i stymuluje aktywność transkrypcyjną, co powoduje wzrost aktywacji genów zależnych od p53, uczestniczących w zatrzymaniu cyklu komórkowego i naprawy DNA, ale nie apoptozy (STARITA i PARVIN 2003, ROSEN i współaut. 2006). BRCA1 może wpływać na aktywność innych białek tworząc heterodimer z BARD1 o właściwościach ligazy ubikwityno-

wej E3, dzięki czemu może kierować specyficzne sobie białka na drogę degradacji w proteosomie (STARITA i PARVIN 2003, ROSEN i współaut. 2006). Dzięki ubikwitynacji heterodimer BARC1/BARD1 może także wpływać na regulację aktywności innych białek poprzez tworzenie łańcucha ubikwitynowego z wykorzystaniem lizyn innych niż w pozycji 48 ubikwityny lub monoubikwitynację białek (BILLACK i MONTEIRO 2005).

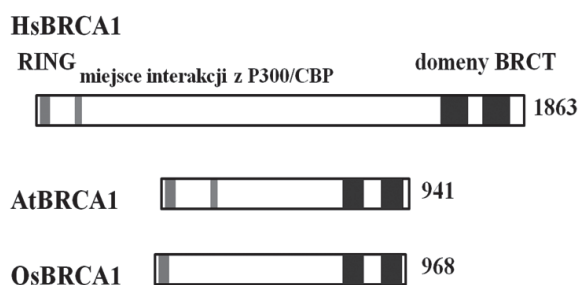
Rodzina białek BRCA1 zawiera szereg regionów odpowiedzialnych za specyficzne oddziaływanie z wieloma białkami wchodzącymi w skład szlaków kontroli cyklu komórkowego, apoptozy i naprawy DNA (TING i LEE 2004, ROSEN i współaut. 2006). Jednak szczególnie ważne znaczenie dla funkcji BRCA1 wydają się mieć dwa regiony: domena RING palca cynkowego odpowiedzialna za wiązanie białka BARD1 (ang. BRCA1-associated RING domain protein 1, BARD1) oraz dwie tandemowo powtórzone domeny BRCT (ang. BRCA1 C-terminal, BRCT) uczestniczące w interakcjach białko-białko (Ryc. 2) (BILLACK i MONTEIRO 2005). Dlatego też regiony te są najsilniej zachowanymi ewolucyjnie elementami strukturalnymi białek BRCA1 i w oparciu o wyszukiwanie tych elementów przeprowadzono poszukiwanie homologów w genomach roślin.

ROŚLINNE HOMOLOGI BRCA1

Zsekwencjonowanie genomu rzodkiewnika pospolitego (*Arabidopsis thaliana*) i ryżu siewnego (*Oryza sativa*) umożliwiło odkrycie homologów *BRCA1* u roślin przy pomocy analiz bioinformatycznych w oparciu o strukturalną organizację białek BRCA1 (LAFARGE i MONTANE 2003). W chromosomie 4 rzodkiewnika, w miejscu At4g21070, zidentyfikowano homolog genu *BRCA1* oznaczony jako *AtBRCA1*. Gen ten, zbudowany z 14 eksonów o całkowitej długości ok. 3,5 kb, koduje białko o 941 resztach aminokwasowych i masie 104 kDa. Polipeptyd ten posiada domenę RING i dwie domeny BRCT odpowiednio na jego N- i C-końcu (Ryc. 2). Zidentyfikowano także inny homologiczny region białka *AtBRCA1* odpowiadający miejscu oddziaływania *hBRCA1* z p300/CBP (Ryc. 2) (LAFARGE i MONTANE 2003). Znajduje się on w centralnej części białka charakteryzującej się słabą konserwacją wśród członków swojej rodziny u zwierząt, która także uczestniczy w interakcjach z innymi białkami. *AtBRCA1* koduje dwukrotnie krótsze białko od *hBRCA1*,

przypominające formę ludzkiego białka pozbawioną centralnego regionu odpowiadającego eksonowi 11. Wyniki te są poparciem danych wskazujących, że konserwacja sekwencji białek BRCA1 jest ważna dla domen RING i BRCT, a mniej dla sekwencji znajdującej się między nimi. Zidentyfikowany u ryżu gen *OsBRCA1* koduje hipotetyczne białko zbudowane z 968 aminokwasów. Posiada ono podobną wielkość do *AtBRCA1*, co pozwala sądzić, że roślinne homologii *AtBRCA1* i *OsBRCA1* są krótszymi członkami rodziny białek BRCA1. Porównanie całkowitej sekwencji *AtBRCA1* z *hBRCA1* z uwzględnieniem zakonserwowanych domen przedstawia Ryc. 2.

AtBRCA1 ulega ekspresji we wszystkich tkankach rośliny na poziomie zależnym od rodzaju organu. Największy poziom ekspresji tego genu obserwuje się w tkankach, w których zachodzą intensywne podziały komórkowe. Może to sugerować podobną rolę *AtBRCA1* w kontroli cyklu komórkowego do tej wykazanej dla *hBRCA1*. Przypuszczenie to



Ryc. 2. Konserwacja zwierzęcych i roślinnych białek BRCA1 na przykładzie ludzkiego BRCA1 (HsBRCA1), rzodkiewnika (AtBRCA1) i ryżu (OsBRCA1).

HsBRCA1 zbudowane jest z 1863, AtBRCA1 z 941 zaś OsBRCA1 z 968 aminokwasów. Zwierzęce jak i roślinne białka BRCA1 zawierają domenę RING (really interesting new gene) oraz BRCT (BRCA1 C-terminal). Szczegółowy opis w tekście. Na podstawie LAFARGE i MONTANE 2003, zmodyfikowane.

potwierdzają badania przeprowadzone na kulturach komórkowych charakteryzujących się wyższym tempem podziałów komórkowych, w których zanotowano wyższą ekspresję *AtBRCA1* niż w komórkach tkanek roślinnych (LAFARGE i MONTANE 2003).

W celu wykazania związku *AtBRCA1* z naprawą dwuniciowych pęknięć DNA badano zmiany ekspresji tego genu w całych roślinach poddanych działaniu promieni gamma. Stwierdzono wzrost poziomu ekspresji zależny od dawki promieniowania i rodzaju organu. Mimo że podstawowa ekspresja *AtBRCA1* w poszczególnych tkankach była różna, to pod wpływem promieni gamma ustalała się na podobnym poziomie (LAFARGE i MONTANE 2003). Korelacja między poziomem indukcji *AtBRCA1* a dawką wskazuje na istnienie precyzyjnego systemu regulacji ekspresji *AtBRCA1* związanego z naprawą DNA i/lub kontrolą cyklu komórkowego, co jest zgodne z rolą białka hBRCA1 (JASIŃSKA i KRZYŻOSIAK 2001, LAFARGE i MONTANE 2003).

Zwierzęce mutanty w genie *BRCA1* charakteryzują się niestabilnością genomową skutkującą letalnością embrionów we wczesnej fazie rozwoju. Mutanty inercyjne T-DNA genu *AtBRCA1* nie wykazują dostrzegalnych zmian fenotypowych w standardowych warunkach

wzrostu i są w pełni płodne. Obserwowano jednak u nich zwiększoną wrażliwość na mitomycynę C (MMC) i bleomycynę, substancje powodujące uszkodzenia naprawiane przez szlaki HR (REIDT i współaut. 2006, BLOCK-SCHMIDT i współaut. 2010). Żywotność homozygotycznych mutantów genu *AtBRCA1* stwarza możliwość badania roli genów *BRCA1* w mejozie. Mutanty wydają się być w pełni płodne, co oznaczać może, że białko to nie jest niezbędne w procesie mejozy u roślin. Autorzy jednakże zastrzegają, że otrzymane wyniki nie oznaczają całkowitego braku wpływu *AtBRCA1* na ten proces (REIDT i współaut. 2006).

Udział *AtBRCA1* w procesach komórkowych związanych z naprawą uszkodzonego DNA u roślin sugerują zidentyfikowane w genomie *A. thaliana* homologii genów, z produktami których hBRCA1 oddziałuje w komórkach człowieka. Należą do nich min. homologi białek RAD50, Mre11, NBS1, ATM, RAD51, BRCA2 uczestniczące w HR oraz p300/CBP pełniące funkcje w regulacji transkrypcji innych genów (BORDOLI i współaut. 2001, BLEUYARD i współaut. 2006) (Ryc. 1). W bezpośrednich badaniach wykazano, że w tkankach roślinnych traktowanych promieniami gamma wraz ze wzrostem ekspresji *AtBRCA1* następuje proporcjonalny do niego wzrost aktywności genu *AtRAD51* (LAFARGE i MONTANE 2003). Udało się także zidentyfikować w genomie rzodkiewnika przypuszczalny homolog produktu genu *BARD1* tworzący heterodimer z BRCA1 (REIDT i współaut. 2006). Analizy w drożdżowym systemie dwuhybrydowym wykazały, że *AtBRCA1* i przypuszczalny *AtBARD1* są zdolne bezpośrednio oddziaływać ze sobą poprzez domeny RING. Poparciem genetycznego związku *AtBRCA1* i *AtBARD1* jest ich ekspresja na podobnym poziomie w poszczególnych tkankach rośliny, a także podobieństwo fenotypów mutantów tych dwóch genów. Zaobserwowano, że mutanty *AtBRCA1* i *AtBARD1* ujawniają podobną wrażliwość na czynnik uszkodzający DNA - MMC. Fakt, że podwójny mutant *AtBRCA1/AtBARD1* nie jest bardziej wrażliwy na MMC niż pojedyncze mutanty wskazuje na epistatyczne działanie produktów tych dwóch genów w szlakach reperacji uszkodzeń DNA (REIDT i współaut. 2006).

BRCA2

Najbardziej znaną funkcją BRCA2 w utrzymaniu integralności genomu jest bezpośredni udział w naprawie dwuniciowych

pęknięć DNA poprzez formowanie kompleksów z RAD51 w miejscu uszkodzenia DNA (Ryc. 1). Białko RAD51 jest kluczowe

w procesie rekombinacji homologicznej, gdyż odpowiada za reakcję wymiany nici DNA między homologicznymi sekwencjami. BRCA2 reguluje wewnątrzkomórkową lokalizację białka RAD51 oraz zdolność białka RAD51 do wiązania się z DNA (POPEŁAWSKI i BŁASIAK 2006, NOWACKA-ZAWISZA i KRAJEWSKA 2009). Uważa się, że produkt genu *BRCA2* jest niezbędny do tworzenia skupisk białek RAD51, powstających w miejscach uszkodzenia DNA. Taką funkcję białek BRCA2 determinują trzy silnie zakonserwowane regiony, do których należą: powtórzenia BRC, domena wiążąca DSS1-DNA (ang. DNA/DSS1-binding domain, DBD) oraz sygnały lokalizacji jądrowej (ang. nuclear localization signal, NLS) (Ryc. 3) (JASIŃSKA i KRZYŻOSIAK 2001, VENKITARAMAN 2002). Białko BRCA2, dzięki powtórzeniom BRC, łączy się bezpośrednio z białkiem RAD51 tworząc kompleks BRCA2-RAD51. Z kolei domena DBD odpowiedzialna jest za wiązanie pojedynczych nici DNA (ang. single stranded DNA, ssDNA), przez co umożliwia interakcje białka RAD51 z ssDNA i stymuluje rekombinację (TUTT i ASHWORTH 2002; GUDMUNSDOTTIR i ASHWORTH 2004).

Mutacje w genie *BRCA2*, usuwające region zawierający motywy BRC, upośledzają powstawanie kompleksów RAD51 w miej-

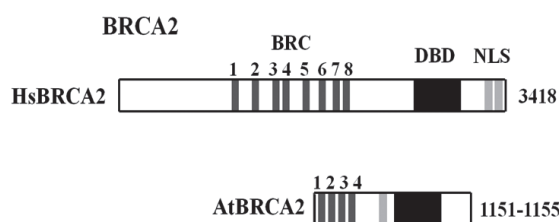
scach uszkodzenia DNA i powodują silne zaburzenia naprawy dwuniciowych pęknięć DNA (JASIŃSKA i KRZYŻOSIAK 2001, TUTT i ASHWORTH 2002). Oddziaływanie białka BRCA2 z RAD51 jest niezbędne do prawidłowego rozwoju u zwierząt. Myszy ze zmutowaną formą białka BRCA2 pozbawioną wszystkich powtórzeń BRC obumierają w czasie embriogenezy. O funkcji białka BRCA2 w utrzymaniu integralności genomu świadczą obserwowane w komórkach mysich embrionów ze zmutowanym genem *BRCA2* zaburzenia struktury chromosomów oraz nadwrażliwość tych komórek na promieniowanie jonizujące (CONNOR i współaut. 1997, SHARAN i współaut. 1997). Poza bezpośrednim udziałem w naprawie DNA, białko to bierze udział w sygnalizacji uszkodzeń DNA i regulacji ekspresji odpowiednich genów. BRCA2 pełni te funkcje poprzez interakcje z BRCA1, które wiąże się z licznymi białkami o kluczowym znaczeniu w odpowiedzi na uszkodzenie DNA i może działać jako swojego rodzaju platforma umożliwiająca wzajemne interakcje tych białek (JASIŃSKA i KRZYŻOSIAK 2001, TUTT i ASHWORTH 2002, VENKITARAMAN 2002). Jak wcześniej wspomniano, BRCA2 pełni rolę elementu łączącego białko RAD51 z BRCA1 (NOWACKA-ZAWISZA i KRAJEWSKA 2009).

ROŚLINNE HOMOLOGII BRCA2

Mimo niskiej całkowitej identyczności sekwencji białek BRCA2, posiadają one regiony o wysokiej konserwacji, które zostały wykorzystane do identyfikacji genów homologicznych u *A. thaliana*. W genomie rzodkiewnika odkryto i scharakteryzowano dwa geny podobne do *BRCA2*, które posiadają prawie identyczne sekwencje, w skutek czego prawdopodobnie powstały w wyniku duplikacji jednego z nich (SIAUD i współaut. 2004). Jedną sekwencję zlokalizowaną jest na chromosomie IV [*AtBRCA2(IV)*] blisko NOR (region organizacji jąderka), a druga na chromosomie V [*AtBRCA2(V)*]. Z analiz sekwencji wynika, że *AtBRCA2(V)* jest pierwotną kopią. Geny *AtBRCA2* kodują prawie identyczne białka (94,5% identyczności) z czterema powtórzeniami BRC, potencjalnymi domenami DBD i NLS (Ryc. 3). Białka rzodkiewnika są krótsze od ludzkiego odpowiednika; zbudowane są ze 1151 [*AtBRCA2(IV)*] lub 1155 reszt aminokwasowych [*AtBRCA2(V)*]. W ludzkim białku BRCA2 zidentyfikowano 8 powtórzeń

BRC zaś w białkach rzodkiewnika tylko cztery (SIAUD i współaut. 2004, NOWACKA-ZAWISZA i KRAJEWSKA 2009). U ryżu zidentyfikowano także hipotetyczne białka podobne do BRCA2, które zawierały 7 powtórzeń BRC. *AtBRCA2* ulegają ekspresji w pąkach kwiatowych na podobnym poziomie, co wynika z faktu duplikacji sekwencji kodującej wraz z regionem promotora. Stwierdzono jednak brak wzrostu ekspresji *AtBRCA2* w liściach pod wpływem promieni gamma w przeciwieństwie do *AtRAD51*, z którym oddziałuje w warunkach *in vitro* (SIAUD i współaut. 2004).

Pierwsze badania nad rolą BRCA2 u rzodkiewnika w regulacji rekombinacji homologicznej dotyczyły jego udziału w procesie mejozy. Rekombinacja zachodząca podczas mejozy powoduje powstanie produktów pośrednich w postaci DSB, stąd też udział białek BRCA w tym procesie. Wiedza na temat działania białka BRCA2 w mejozie u zwierząt jest ograniczona, ze względu na letalność my-



Ryc. 3. Budowa domenowa białek BRCA2 u człowieka (HsBRCA2) i rzodkiewnika (AtBRCA2).

HsBRCA2 ma długość 3418 zaś AtBRCA2 1151 lub 1155 aminokwasów. Białka te zawierają powtórzenia BRC, domenę DBD (DNA/DSS1-binding domain), oraz domeny lokalizacji jądrowej (NLS). Szczegółowy opis w tekście. Na podstawie GUDMUNSDOTTIR i ASHWORTH 2004, zmodyfikowane.

sich mutantów homozygotycznych, na których prowadzone są tego typu badania (GUDMUNSDOTTIR i ASHWORTH 2004). Nieliczne uzyskane żywotne mutanty myszy z częściową utratą *BRCA2* charakteryzują się niekompletną koniugacją meiotyczną chromosomów oraz zmianami w dystrybucji RAD51 i DMC1 w spermatocytach, co w efekcie skutkuje bezpłodnością. DMC1 jest białkiem niezbędnym do parowania się homologicznych chromosomów w biwalenty podczas mejozy. W wyniku zmian dystrybucji DMC1, rozwój spermatocytów u osobników męskich zatrzymywał się na fazie parowania homologicznych chromosomów, czyli we wczesnej profazie (SHARAN i współaut. 2004). Analizy w drożdżowym systemie dwuhybrydowym wykazały, że produkty genów *AtBRCA2* oddziałują z białkami AtRAD51 i AtDMC1 (SIAUD i współaut. 2004). Ujawnienie interakcji AtBRCA2 z AtDMC1 pozwoliło na przypisanie temu białku roli w rekombinacji meiotycznej u roślin. Dalszych dowodów dostarczyły badania transformantów, w których wyciszono ekspresję genów *BRCA2* przy użyciu interferencyjnego RNA w czasie mejozy. Brak białek BRCA2 doprowadził do częściowego zaburzenia zdolności podziałów komórek spowodowanej nieprawidłowym przebiegiem mejozy. Analiza mejozy w transformowanych komórkach roślinnych na poziomie cytologicznym ujawniła brak tworzenia biwalentów podczas profazy I, nieregularne rozmieszczenie chromosomów oraz ich fragmentację. Fenotyp meiotyczny powyższych transformantów dokładnie naśladował fenotyp mutantów pozbawionych funkcjonalnego białka DMC1 posiadających dodatkowo konstrukt wyciszający ekspresję RAD51 w czasie

trwania mejozy, co potwierdza molekularny związek tych trzech białek w rekombinacji meiotycznej (SIAUD i współaut. 2004). Badania nad BRCA2 u rzodkiewnika stanowią poparcie dla modelu, w którym BRCA2 dostarcza białka RAD51 i DMC1 w miejsca łączenia się chromosomów dla właściwej i skutecznej wymiany materiału genetycznego podczas mejozy (GUDMUNSDOTTIR i ASHWORTH 2004, SIAUD i współaut. 2004).

Przeprowadzono dokładniejsze analizy interakcji AtBRCA2 z jego roślinnymi partnerami w warunkach *in vitro* (DRAY i współaut. 2006). Badania te potwierdziły możliwość bezpośredniego oddziaływania AtBRCA2 z AtRAD51 i AtDMC1 oraz, że N-końcowy region zawierający motywy BRC jest odpowiedzialny za te interakcje. Wyniki tych badań są potwierdzeniem dużej konserwacji funkcjonalnej motywów BRC. W genomie *A. thaliana* zidentyfikowano dwa izoformy DSS1 oznaczone jako AtDSS1(I) i AtDSS1(V) biorące udział w interakcjach z BRCA2 u zwierząt (DRAY i współaut. 2006). Badania *in vitro* ujawniły, że mimo bardzo dużej konserwacji wśród dwóch białek AtBRCA2 i dwóch AtDSS1, AtBRCA2(IV) oddziałuje tylko z białkiem AtDSS1(I), podczas gdy AtBRCA2(V) z dwoma izoformami AtDSS1. Dodatkowo ustalono, że podobnie jak u zwierząt za oddziaływanie AtBRCA2 z AtDSS1 odpowiedzialny jest region C-końcowy (DRAY i współaut. 2006). Po raz pierwszy wykazano, że produkt genu *AtBRCA2* *in vitro* może wiązać jednocześnie dwa różne białka: AtRAD51 i AtDSS1 albo AtDMC1 i AtDSS1 (DRAY i współaut. 2006). Pomimo wykazania roli AtBRCA2 w komórkach rozrodczych brakowało danych na temat funkcji tych genów w komórkach somatycznych. Podobnie jak w przypadku zwierząt, przyczyną tego stanu rzeczy był brak odpowiednich modeli badawczych. Transformanty roślinne trwale pozbawione ekspresji genów *BRCA2* w komórkach somatycznych uzyskane przy użyciu interferencyjnego RNA cechują się letalnością (SIAUD i współaut. 2004). Dopiero w 2009 r. przedstawiono pierwsze wyniki badań określające rolę genów *AtBRCA2* w reperacji DNA w komórkach somatycznych u roślin (ABE i współaut. 2009). Do analiz użyto mutantów insercyjnych T-DNA dla genów *AtBRCA2a* i *AtBRCA2b* oraz rośliny transgeniczne z niecałkowicie wyciszoną ekspresją tychże genów przy zastosowaniu interferencyjnego RNA, które ulegały rozwojowi wegetatywnemu oraz były płodne. Uzyskane pojedyncze

mutanty, w porównaniu z typem dzikim, wykazywały nadwrażliwość na czynniki generujące powstawanie uszkodzeń DNA naprawianych przez szlaki HR, takie jak cisplatylna i promieniowanie gamma. Dysfunkcja obydwu genów w komórkach powodowała addytywny wzrost wrażliwości. Zjawisko to zostało potwierdzone u transformantów z interferencyjnym RNA, wskazując na rolę genów *AtBRCA2* w procesie HR. Uzyskane pojedyncze mutanty ulegały prawidłowemu rozwojowi wegetatywnemu, jednak wśród podwójnych mutantów obserwowano niewielki odsetek fenotypów o zmienionej morfologii, posiadających zaburzenia organizacji budowy łodygi oraz prawidłowej filotaksji (wzorca ulistnienia). Wykazano, że anomalie te związane są ze zmienioną organizacją merystemu wierzchołkowego pędu (ang. shoot apical meristem, SAM), wywołaną nieprawidłowym programem podziałów komórkowych

w SAM. Komórki tworzące merystem ulegały zatrzymaniu w cyklu komórkowym w skutek nagromadzenia się w nich mutacji. Zaobserwowano, że traktowanie nasion mutantów promieniowaniem gamma powoduje wzrost ilości roślin o zmienionej morfologii w sposób zależny od dawki, w stosunku do mutantów uzyskanych z nasion nie poddanych promieniowaniu (ABE i współaut. 2009). Według autorów wskazuje to na związek tych anomalii z wrażliwością roślin na promieniowanie gamma uwarunkowaną utratą *AtBRCA2*, a tym samym brakiem sprawnych mechanizmów naprawy DSB powodujących zahamowanie cyklu komórkowego części komórek tworzących SAM. Co ciekawe, w przypadku roślin typu dzikiego podanych promieniowaniu gamma także obserwuje się powstawanie fenotypów opisanych dla mutantów w genach *AtBRCA2*, choć w mniejszym stopniu (ABE i współaut. 2009).

BIAŁKO P53

Wydarzeniem istotnym z punktu widzenia transformacji nowotworowej jest przejście z fazy G1 do fazy S cyklu komórkowego, w której dochodzi do powielenia materiału genetycznego. Jest to punkt kontrolny, w którym komórki mogą się zatrzymać podczas cyklu komórkowego w wyniku wykrycia uszkodzenia DNA do czasu, kiedy nieprawidłowości zostaną usunięte z genomu (HANAHAN i WEINBERG 2000). Punkt kontrolny G1/S integruje działanie czynników rozpoznających uszkodzenia DNA i regulujących przebieg cyklu. W komórkach ssaków najbardziej znanym składnikiem tych procesów jest białko p53, produkt genu *TP53*, które postrzegane jest jako centralny element monitorujący stres i kierujący komórkę ku właściwej odpowiedzi, którą może być zatrzymanie cyklu komórkowego i indukcja procesów naprawy DNA lub apoptoza, jeżeli w czasie zatrzymania cyklu uszkodzenia DNA nie mogą być skutecznie naprawione (CHAO i współaut. 2000, GRZELAKOWSKA-SZTABERT 2000). Białko to przekazuje sygnał o uszkodzeniu, dzięki oddziaływaniu z białkami pełniącymi funkcje transducerów uszkodzenia DNA, jak ATM. Poprzez zarządzanie reakcją na uszkodzenie DNA, p53 pełni kluczową rolę w zachowaniu integralności genomu. Mutacje genu *TP53* znoszące istnienie punktu kontrolnego G1/S

są jednymi z najczęściej występujących w nowotworach u ludzi. W świetle tych działań gen *TP53* został nazwany „strażnikiem genomu” (CZAJKOWSKI i współaut. 2000).

W zależności od skali i rodzaju stresu komórkowego odpowiednio zaktywowane za pomocą modyfikacji posttranslacyjnych (fosforylacji) białko p53 działa w roli czynnika transkrypcyjnego, wiążącego się do swoistych sekwencji promotorowych wielu genów związanych z cyklem komórkowym bądź procesami apoptozy, wpływając na ich aktywację bądź represję (SZUMEL 2003, SZEMRAJ i współaut. 2005). Inicjowane przez p53 zatrzymanie cyklu komórkowego może być uważane za pierwotną odpowiedź na uszkodzenie DNA. Zatrzymanie to następuje w późnej fazie G1 i jest spowodowane głównie przez zależną od p53 transkrypcję p21. Białko p21 hamuje kinazy cyklinozależne swoiste dla fazy G1, przez co zapobiega fosforylacji białka Rb, która jest niezbędna do wejścia komórki w fazę S. Jeżeli uszkodzenie DNA zostanie skutecznie naprawione, p53 zwiększa transkrypcję białka MDM2 odpowiedzialnego za wiązanie i degradację p53, w skutek czego dochodzi do odblokowania cyklu komórkowego. W przypadku braku możliwości naprawy DNA, aktywny p53 kieruje komórkę na szlak apoptozy (SZEMRAJ i współaut. 2005).

W POSZUKIWANIU HOMOLOGÓW P53 U ROŚLIN

W celu wykrycia roślinnego p53 prowadzono analizy w komórkach traktowanych różnymi czynnikami powodującymi uszkodzenie DNA, a także badania na starych nasionach, których komórki cechują się podwyższonym poziomem uszkodzeń DNA (WHITTLE i współaut. 2001). Badania na materiale siewnym wynikały także z faktu, że większość komórek tworzących zarodek w nasionach spoczynkowych jest w fazie G1 cyklu komórkowego i podczas wczesnych faz kiełkowania (imbibicja) przechodzą one w fazę S. Założono, że procesy zachodzące podczas kiełkowania muszą wykazywać znaczące podobieństwo do tych związanych z zatrzymaniem cyklu komórkowego w fazie G1 za pośrednictwem p53 w komórkach zwierzęcych (WHITTLE i współaut. 2001).

Pierwszych prób analiz obecność białek podobnych do p53 dokonywano w oparciu o badania Western blot wykorzystując mysie przeciwciała Pab 240 przeciw ludzkiemu p53. Zidentyfikowano potencjalne homologi p53 o masach 72 kDa lub 50 kDa w spoczynkowych nasionach kukurydzy oraz białko o masie >100 kDa w różnych tkankach grochu (GEORGIEVA 1994, CRUZ-GARCIA 1998, KLOSTERMAN 2000). Uzyskane masy białek p53, które wahają się w granicach 46-73 kDa u kręgowców, wskazywały na dodatkowe różnice między zwierzęcymi a potencjalnymi roślinnymi homologami. Zaobserwowano wzrost intensywności znakowania prążków o masach 50 kDa i 72 kDa podczas wczesnych faz kiełkowania, a następnie jego stopniowy spadek podczas dalszej imbibicji, aż do najniższego poziomu w okresie przypadającym na początek replikacji (GEORGIEVA 1994, CRUZ-GARCIA 1998). Jednakże w nasionach nie dochodziło do akumulacji badanego białka po dodaniu czynników uszkadzających DNA. Wskazywało to, że analizowane białko nie uczestniczy w odpowiedziach obronnych wywołanych uszkodzeniem DNA takich jak zatrzymanie cyklu komórkowego czy indukcja programowanej śmierci komórki w reakcji nadwrażliwości (ang. hypersensitive response, HR) (KLOSTERMAN 2000).

Kolejne badania przeprowadzone na komórkach jęczmienia podważyły wcześniejsze analizy Western blot oparte na przeciwciałach Pab 240 (KORTHOUT i współaut. 2002). Wykazano bowiem, że u roślin występuje białko niespokrewnione z p53 rozpoznawa-

ne przez przeciwciała Pab 240. W analizie Western blot wykonywanej z wykorzystaniem przeciwciał Pab 240 otrzymano prążki o masach 53, 73 i 110 kDa. Przy użyciu ówczesnie dostępnych technik oczyszczania białek i analiz sekwencji aminokwasowych ustalono, że tym trzem znakowanym polipeptydom odpowiada jedno białko, dehydrogenaza α -ketoglutaranowa o masie 105 kDa, posiadająca epitop RHSVI rozpoznawany przez Pab 240. Dehydrogenaza α -ketoglutaranowa jest enzymem cyklu kwasu cytrynowego. Wykazano, że białko to ulega degradacji podczas izolacji białek, co powoduje powstanie dwóch polipeptydów o masach 53 i 73 kDa, z którymi reaguje Pab 240. Molekularna masa jednego z produktów degradacji otrzymywanych z ekstraktów jęczmienia była podobna do ssaczego p53 wskutek czego mógł on naśladować roślinne białko p53 (KORTHOUT i współaut. 2002). Ponadto uzyskane masy 73 i 110 kDa były podobne do wcześniej odnotowanego wiązania przez Pab 240 polipeptydów o masach 72 u kukurydzy i >100 kDa u grochu. Zgodnie z wcześniejszymi badaniami zaobserwowano wzrost intensywności znakowania prążków we wczesnych fazach kiełkowania nasion jęczmienia. Zwiększony poziom ekspresji dehydrogenazy podczas kiełkowania był zatem zgodny ze wzrostem, który spodziewano się zaobserwować dla poszukiwanego homologu p53 w związku z zachodzącymi w tym okresie procesami naprawy. Jednak był on wynikiem wzrostu metabolizmu, który także ma miejsce podczas kiełkowania. Obecność epitopu rozpoznawanego przez Pab 240, produkty degradacji o masach zgodnych ze zwierzęcymi homologami białek p53 oraz odpowiedni wzór ekspresji dehydrogenazy α -ketoglutaranowej sprawiły, że białko to imitowało obecność homologu p53 u roślin (KORTHOUT i współaut. 2002).

Molekularne analizy mające na celu wyznaczenie sekwencji homologicznych do p53 u roślin nie dały rezultatów. Badania z użyciem heterologicznych sond cDNA genu *TP53*, analizy PCR przy użyciu zdegenerowanych starterów silnie zakonserwowanych miejsc białka p53 nie dały żadnych produktów, co wskazuje, że o ile istnieje roślinny p53, to nie dzieli on zakonserwowanych sekwencji ze zwierzęcymi białkami p53. Nie powiodło się również przeszukiwanie bazy danych całkowicie zsekwencjonowanego ge-

nomu rzodkiewnika w celu znalezienia genu homologicznego do *TP53*. Jednakże białka o małej homologii sekwencji mogą mieć podobne funkcje, co nie wyklucza możliwości istnienia u roślin funkcjonalnego odpowiednika p53 (KORTHOUT i współaut. 2002). Ostatecznie homolog genu *TP53* nie został zidentyfikowany u roślin.

Identyfikacja niektórych roślinnych homologów wchodzących w skład ścieżek zaangażowanych w zatrzymanie cyklu komórkowego i procesy programowanej śmierci komórek, w których bierze udział p53 u zwierząt, może pośrednio wskazywać na istnienie roślinnego funkcjonalnego odpowiednika genu *TP53* (WHITTLE i współaut. 2001). W genomach roślinnych opisano co najmniej kilka składników szlaków zatrzymania komórek w punktach kontrolnych cyklu komórkowego, które oddziałują ze sobą podobnie jak u zwierząt. Należą do nich homologii inhibitorów kinaz cyklicznych u roślin, hamujące cykl komórkowy czy homologii białka RB stanowiącego o istnieniu punktu kontrolnego G1/S (DE VEYLDER i współaut. 2007, FRANCIS 2007). Udowodniono także, że ekspresja zwierzęcego genu *Bax*, aktywowanego w komórkach zwierzęcych przez

p53, prowadzi do programowanej śmierci komórek tytoniu (KAWAI-YAMADA i współaut. 2004). Obecność homologów ligazy COP1 u roślin i zwierząt może być także pewnym powiązaniem skłaniającym do postulowania obecności roślinnego odpowiednika p53. U roślin COP1 (ang. constitutively photomorphogenic 1, COP1) jest ligazą ubikwitynową pełniącą rolę represora procesów fotomorfogenezy poprzez zależną od ciemności degradację białek HY5 i LAF1, będących pozytywnymi regulatorami tych procesów (YI i DENG 2005). Prowadzone na komórkach ssaków badania wykazały, że homologiczne białko COP1 bezpośrednio ubikwitynuje p53 niezależnie od MDM2, przez co stabilizuje p53 i wpływa na zatrzymanie komórek w fazie G1 cyklu komórkowego (DORNAN i współaut. 2004a, 2004b). Wyniki tych badań prowadzą do wniosku, że COP1 jest kluczowym negatywnym regulatorem p53, utrzymującym jego ilość na niskim poziomie w komórkach niepoddanych stresowi. W badaniach na roślinach niższych (zielenicach) także pośrednio wskazano na możliwość istnienia odpowiednika białka p53 uczestniczącego w reakcjach na stres (NEDELCO 2006).

PODSUMOWANIE

Do mechanizmów odpowiedzialnych za utrzymanie integralności genomu u zwierząt i roślin możemy zaliczyć naprawę dwuniciowych pęknięć DNA, które należą do najgroźniejszych uszkodzeń DNA. Badania na *A. thaliana* wskazują, że zarówno organizmy roślinne, jak i zwierzęce posiadają białka z rodziny BRCA, które biorą udział w naprawie DSB w procesie rekombinacji homologicznej. Mimo że obecnie nieliczne znane roślinne homologii genów z rodziny *BRCA* całościowo charakteryzują się niewielkim stopniem homologii w stosunku do swoich zwierzęcych odpowiedników, to wykazują wysoką konserwację w domenach odpowiadających za ich utrwalone ewolucyjnie funkcje. Zakonserwowana budowa domenowa leżała u podstaw wykrycia roślinnych homologów. W przeciwieństwie, poszukiwania homologów genu *TP53* oparte o strukturalną konserwację tych białek nie dały oczekiwanych rezultatów, co wskazuje, że o ile istnieje funkcjonalne białko p53 w organizmach roślinnych, to nie dzieli on homologii ze zwierzęcymi. Powszechnie znanym jest, że zaburzenia po-

wyższych genów w organizmach zwierzęcych mogą prowadzić do zmian sprzyjających procesom nowotworzenia. Efekty dysfunkcji genów *BRCA1/2* w procesie naprawy dwuniciowych pęknięć zostały zaobserwowane u roślin i pokrywają się ze zwierzęcymi, jednak w świetle niewielu dostępnych wyników badań przeprowadzonych na roślinie modelowej jaką jest *A. thaliana*, nie stwierdzono żadnych tumorowatych narośli i innych widocznych efektów rozrostowych tkanek. Na podstawie analiz uzyskanych mutantów możemy jedynie ostrożnie przypuszczać, że dysfunkcja genów *BRCA1/2* jest równie znacząca dla organizmu roślinnego w porównaniu ze zwierzęcym szczególnie w warunkach stresu genotoksycznego. Nie bez znaczenia jednak pozostaje fakt, że organizmy zwierzęce i roślinne są odmiennie zorganizowane. Organizm zwierzęcy wykształca narządy odpowiedzialne za ściśle określone funkcje o ograniczonej zdolności regeneracji. Dysfunkcja jednego z kluczowych narządów na skutek rozwoju choroby nowotworowej prowadzi do śmierci całego organizmu zwierzę-

cego. W przypadku roślin, prostsza budowa, ciągły wzrost i możliwość odrzucania całych organów sprawia, że powstanie lokalnych

zmian nie zakłóca życia całego organizmu w takim stopniu jak ma to miejsce u zwierząt i człowieka.

ROŚLINNE HOMOLOGII GENÓW ZWIĄZANYCH Z DZIEDZICZNĄ PREDYSPOZYCJĄ DO RAKA PIERSI I JAJNIKA

Streszczenie

Zaburzenia mechanizmów odpowiedzi i naprawy uszkodzeń DNA powodują wzrost niestabilności genomu i predysponują do nowotworów. Krytyczną rolę w utrzymaniu stabilności genomu odgrywają geny *TP53* i *BRCA1/2*, których mutacje germinalne predysponują do nowotworów piersi i jajnika. Białka *BRCA1/2* są znanymi czynnikami podatności na nowotwory piersi, które biorą udział w utrzymaniu stabilności genomu poprzez zaangażowanie w procesy naprawy dwuniciowych pęknięć DNA na drodze rekombinacji homologicznej. Białko *p53*, produkt genu *TP53*, określane jako „strażnik genomu” odpowiedzialne jest za utrzymanie integralności genomu uczestnicząc w mechanizmach odpowiedzi na uszkodzenie DNA takich jak: zatrzymanie cyklu komórkowego, indukcja procesów naprawy DNA lub apoptozy w przypadku gdy uszkodzenia nie mogą być skutecznie naprawione. *p53* i *BRCA1/2* dzięki swoim funkcjom należą do jednych z najszerzej badanych białek ludzkich. Niemniej homologii białek *BRCA1/2* są także obecne u roślin wyższych. Analizy roślinnych i zwierzęcych białek *BRCA1/2* ujawniają

wysoką homologię w regionach domen odpowiedzialnych za zakonserwowane funkcje tych białek. Do tej pory badania funkcji *BRCA1/2* u roślin przeprowadzono wyłącznie na rzodkiewniku pospolitym (*A. thaliana*). W genomie tej rośliny odkryto dwa geny homologiczne do *BRCA2* (*AtBRCA2*), których produkty białkowe podobnie jak u zwierząt uczestniczą w reperacji dwuniciowych pęknięć na drodze rekombinacji homologicznej, a także odgrywają ważną rolę w rekombinacji mejotycznej. Z kolei pojedynczy homolog *BRCA1* obecny u rzodkiewnika (*AtBRCA1*) uczestniczy w kontroli cyklu komórkowego i reperacji DNA. Mutanty roślinne w genach *BRCA1/2* wykazują wrażliwość na substancje powodujące uszkodzenia DNA reperowane drogą rekombinacji homologicznej. Dotychczasowe wyniki badań wskazują na funkcjonalną konserwację genów *BRCA1/2* u roślin. W odróżnieniu do genów z rodziny *BRCA*, homologii białka *p53* nie zostały zidentyfikowane u roślin co wskazuje, że jeśli istnieje funkcjonalny roślinny odpowiednik białka *p53* to nie dzieli on zakonserwowanych sekwencji ze zwierzęcymi *p53*.

PLANT HOMOLOGS OF GENES ASSOCIATED WITH HEREDITARY PREDISPOSITION TO BREAST AND OVARIAN CANCERS

Summary

Defects in DNA damage response and repair mechanism increase genome instability and predispose to cancer. Critical roles in the maintenance of genome stability play *TP53* and *BRCA1/2* genes, inherited germline mutations of which predispose to breast and ovarian cancers. *BRCA1/2* are a breast tumor susceptibility factors with functions in maintaining genome stability through ensuring efficient double-strand DNA break (DSB) repair by homologous recombination. *p53* protein known as a “guardian of the genome” is involved in maintenance of genomic integrity by several major DNA damage response mechanisms including cell cycle arrest, DNA repair or induction of apoptosis when damage is excessive. By a role in preserving genomic integrity, *BRCA1*, *BRCA2* and *p53* belong to the most thoroughly analyzed human proteins. Surprisingly, *BRCA1* as well as *BRCA2* homologs are also present in higher plants. The homology between human *BRCA* genes and their plant homologs is mainly conserved in the region of their functional domains. To date, functions

of plant *BRCA*-like genes have only been studied for *Arabidopsis thaliana*. In the *Arabidopsis* genome two *BRCA2*-like genes (*AtBRCA2*) were found. Their products are essential for DSB repair in somatic cells and have a role in meiotic recombination. In the absence of functional *AtBRCA2*, plants were sterile owing to a failure to repair meiotic DSBs and chromosomal instability. Genetic studies of one *Arabidopsis* *BRCA1*-like gene (*AtBRCA1*) have shown their involvement in cell-cycle control and DNA repair. *Arabidopsis* mutant plants defective for the *AtBRCA1* or *BRCA2* are sensitive to DNA cross-linking reagents, such as mitomycin C, and to DSB inducing treatments, such as exposure to the radiomimetic bleomycin. Taken together, these studies provided the first physiological evidence that *BRCA* genes functions were conserved in plants. In contrast to *BRCA* genes, homolog of the *p53* protein has not yet been identified in plants, suggesting that, if a *p53* plant gene exists, it might share little sequence homology with its human counterpart.

LITERATURA

- ABE K., OSAKABE K., ISHIKAWA Y., TAGIRI A., YAMANOUCHI H., TAKYUU T., YOSHIOKA T., ITO T., KOBAYASHI M., SHINOZAKI K., ICHIKAWA H., TOKI S., 2009. *Inefficient double-strand DNA break repair is associated with increased fasciation in Arabidopsis BRCA2 mutants*. J. Exp. Bot. 60, 2751-2761.
- BILLACK B., MONTEIRO A. N., 2005. *BRCA1 in breast and ovarian cancer predisposition*. Cancer Lett. 227, 1-7.
- BLEUYARD J. Y., GALLEGRO M. E., WHITE C. I., 2006. *Recent advances in understanding of the DNA double-strand break repair machinery of plants*. DNA Repair (Amst.) 5, 1-12.
- BLOCK-SCHMIDT A. S., DUKOWIC-SCHULZE S., WANIECK K., REIDT W., PUCHTA H., 2010. *BRCC36A is epistatic to BRCA1 in DNA crosslink repair and homologous recombination in Arabidopsis thaliana*. Nucleic Acids Res. 3, 1-9.
- BORDOLI L., NETSCH M., LUTHI U., LUTZ W., ECKNER R., 2001. *Plant orthologs of p300/CBP: conservation of a core domain in metazoan p300/CBP acetyltransferase-related proteins*. Nucleic Acids Res. 29, 589-597.
- CHAO C., SAITO S., KANG J., ANDERSON C. W., APPELLA E., XU Y., 2000. *p53 transcriptional activity is essential for p53-dependent apoptosis following DNA damage*. EMBO J. 19, 4967-4975.
- CONNOR F., BERTWISTLE D., MEE P. J., ROSS G. M., SWIFT S., GRIGORIEVA E., TYBULEWICZ V. L., ASHWORTH A., 1997. *Tumorigenesis and a DNA repair defect in mice with a truncating Brca2 mutation*. Nat Genet 17, 423-430.
- CRUZ-GARCIA F., 1998. *Effect of stimulating maize germination on cell cycle proteins*. Physiol. Plant. 102, 573-581.
- CZAJKOWSKI R., DREWA T., OLSZEWSKA D., WOZNIAK A., 2000. *Zaburzenia kontroli fazy G1 cyklu komórkowego podczas onkogenezy*. Post Bioch 46, 309-317.
- DE VEYLDER L., BEECKMAN T., INZE D., 2007. *The ins and outs of the plant cell cycle*. Nat Rev Mol. Cell. Biol. 8, 655-665.
- DORNAN D., BHEDDAH S., NEWTON K., INCE W., FRANTZ G. D., DOWD P., KOEPPEN H., DIXIT V. M., FRENCH D. M., 2004a. *COP1, the negative regulator of p53, is overexpressed in breast and ovarian adenocarcinomas*. Cancer Res. 64, 7226-7230.
- DORNAN D., WERTZ I., SHIMIZU H., ARNOTT D., FRANTZ G. D., DOWD P., O'ROURKE K., KOEPPEN H., DIXIT V. M., 2004b. *The ubiquitin ligase COP1 is a critical negative regulator of p53*. Nature 429, 86-92.
- DRAY E., SIAUD N., DUBOIS E., DOUTRIAUX M. P., 2006. *Interaction between Arabidopsis Brca2 and its partners Rad51, Dmc1, and Dss1*. Plant Physiol. 140, 1059-1069.
- FRANCIS D., 2007. *The plant cell cycle-15 years on*. New Phytol. 174, 261-278.
- GEORGIEVA E., 1994. *Maize embryo germination II. Proteins related to nuclear proto-oncogene- and tumor suppressor gene-products*. Planta 192, 125-129.
- GRZELAKOWSKA-SZTABERT B., 2000. *Apoptoza i nowotwory*. Post. Biol. Kom. 27, 9-43.
- GUDMUNDSDOTTIR K., ASHWORTH A., 2004. *BRCA2 in meiosis: turning over a new leaf*. Trends Cell Biol. 14, 401-404.
- HANAHAN D., WEINBERG R. A., 2000. *The hallmarks of cancer*. Cell 100, 57-70.
- JASIŃSKA A., KRZYŻOSIAK W. J., 2001. *Funkcja genów BRCA1 i BRCA2 związanych z dziedziczną predyspozycją do raka piersi*. Post. Bioch. 47, 146-159.
- KAWAI-YAMADA M., OHORI Y., UCHIMIYA H., 2004. *Dissection of Arabidopsis Bax inhibitor-1 suppressing Bax-, hydrogen peroxide-, and salicylic acid-induced cell death*. Plant Cell 16, 21-32.
- KLOSTERMAN S. C. J. H. L., 2000. *Programmed cell death is not mediated by a p53 homolog in Pisum sativum*. Physiol. Mol. Plant Pathol. 56, 197-206.
- KORTHOUT H. A., CASPERS M. P., KOTTENHAGEN M. J., HELMER Q., WANG M., 2002. *A tormentor in the quest for plant p53-like proteins*. FEBS Lett. 526, 53-57.
- LAFARGE S., MONTANE M. H., 2003. *Characterization of Arabidopsis thaliana ortholog of the human breast cancer susceptibility gene 1: AtBRCA1, strongly induced by gamma rays*. Nucleic Acids Res. 31, 1148-1155.
- NEDELCO A. M., 2006. *Evidence for p53-like-mediated stress responses in green algae*. FEBS Lett. 580, 3013-3017.
- NOWACKA-ZAWISZA M., KRAJEWSKA W. M., 2009. *Rola białek BRCA1, BRCA2 i RAD51 w zachowaniu stabilności genomu*. Post. Biol. Kom. 36, 679-694.
- POPŁAWSKI T., BŁASIAK J., 2006. *Naprawa DNA przez rekombinację homologiczną w komórkach ssaków*. Post. Bioch. 52, 180-193.
- REIDT W., WURZ R., WANIECK K., CHU H. H., PUCHTA H., 2006. *A homologue of the breast cancer-associated gene BARD1 is involved in DNA repair in plants*. EMBO J. 25, 4326-4337.
- ROSEN E. M., FAN S., MA Y., 2006. *BRCA1 regulation of transcription*. Cancer Lett. 236, 175-185.
- SHARAN S. K., MORIMATSU M., ALBRECHT U., LIM D. S., REGEL E., DINH C., SANDS A., EICHELE G., HASTY P., BRADLEY A., 1997. *Embryonic lethality and radiation hypersensitivity mediated by Rad51 in mice lacking Brca2*. Nature 386, 804-810.
- SHARAN S. K., PYLE A., COPPOLA V., BABUS J., SWAMINATHAN S., BENEDICT J., SWING D., MARTIN B. K., TESAROLLO L., EVANS J. P., FLAWS J. A., HANDEL M. A., 2004. *BRCA2 deficiency in mice leads to meiotic impairment and infertility*. Development 131, 131-142.
- SIAUD N., DRAY E., GY I., GERARD E., TAKVORIAN N., DOUTRIAUX M. P., 2004. *Brca2 is involved in meiosis in Arabidopsis thaliana as suggested by its interaction with Dmc1*. EMBO J. 23, 1392-1401.
- STARITA L. M., PARVIN J. D., 2003. *The multiple nuclear functions of BRCA1: transcription, ubiquitination and DNA repair*. Curr. Opin. Cell. Biol. 15, 345-350.
- STRATTON M. R., RAHMAN N., 2008. *The emerging landscape of breast cancer susceptibility*. Nat. Genet. 40, 17-22.
- SZEMRAJ J., ROZPONCZYK E., BARTKOWIAK J., GREGER J., OSZAJCA K., 2005. *Znaczenie białka MDM2 w cyklu komórkowym*. Post. Bioch. 51, 44-51.
- SZUMEL I., 2003. *Układ nadzorujący genom*. Post. Biol. Kom. 30, 359-374.
- TING N. S., LEE W. H., 2004. *The DNA double-strand break response pathway: becoming more BRCAish than ever*. DNA Repair (Amst.) 3, 935-944.
- TUTT A., ASHWORTH A., 2002. *The relationship between the roles of BRCA genes in DNA repair and cancer predisposition*. Trends Mol. Med. 8, 571-576.
- VENKITARAMAN A. R., 2002. *Cancer susceptibility and the functions of BRCA1 and BRCA2*. Cell 108, 171-182.

WHITTLE C. A., BEARDMORE T., JOHNSTON M. O., 2001. *Is G1 arrest in plant seeds induced by a p53-related pathway?* Trends Plant Sci. 6, 248-251.

YI C., DENG X. W., 2005. *COP1 – from plant photomorphogenesis to mammalian tumorigenesis.* Trends Cell Biol. 15, 618-625.